



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

PROTOCOLO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA SOLUCIÓN CONSTITUIDA POR LA MEZCLA DE UN EXTRACTO DE *CANNABIS SATIVA* ALTO EN CANNABIDIOL JUNTO A NITRITO DE AMILO, COMO COADYUVANTE EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES OCASIONADAS POR EL VIRUS SARS-CoV-2

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Edgardo Andrés Riveros Ahumada

PROFESOR PATROCINANTE

DRA. GABRIELA VALENZUELA B.
Dpto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

DIRECTORAS DE MEMORIA

DRA. GABRIELA VALENZUELA B.
Dpto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

PROF. ANTARA GUAJARDO H.
Dpto. de Química y biología
Universidad de Santiago de Chile

Santiago, Chile

2023

Dedicada a mi familia, a las personas que creyeron en mí y sobre todo a Dios.

“El hombre nada puede aprender sino en virtud de lo que sabe”. Aristóteles

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a mi familia que ha sido parte importante de este largo viaje durante todos estos años académicos, por siempre motivarme a luchar por mis sueños y no me rendirme ante las adversidades de la vida, a mis padres; María mi madre, gracias por tu entrega infinita y tu amor incondicional y a Pedro quien me acompaña desde el cielo, quienes siempre me dieron amor y lucharon por mi formación académica, educacional y valórica. A mis hermanas por estar siempre cuando las necesite y brindarme su apoyo incondicional. A mis sobrinos por darme alegrías inconmensurables y recordarme siempre que debemos sonreír. A mis animales y en especial a mi perro Kepler, quién me acompaña desde el cielo y me entregó siempre su amor en los momentos más difíciles de la vida.

A la profesora Gabriela Valenzuela por ser un ejemplo de docente, por su temple, la entrega y la confianza puesta en mí, por brindarme apoyo y contención absoluta cuando quise darme por vencido. A la profesora Antara por apoyarme en el proyecto y creer en mí, por darme ánimos cuando daba todo por perdido y por estar ahí siempre cuando tenía miles de dudas.

Agradezco a la universidad de Chile y a la universidad de Santiago de Chile por el conocimiento, formación y educación. Y por sobre todas las cosas agradezco a Dios, por siempre ser el refugio, la fuerza y principal foco de resiliencia en mi vida.

Índice

| | |
|---|------|
| Agradecimientos | iii |
| Índice | iv |
| Índice de figuras..... | vi |
| Índice de tablas..... | vii |
| Abreviaturas..... | viii |
| Resumen | x |
| Abstract..... | xi |
| I. Introducción..... | 1 |
| II. Hipótesis..... | 3 |
| III. Objetivos | 4 |
| III.I General | 4 |
| III.II Específicos | 4 |
| IV. Materiales y métodos. | 5 |
| V. Marco teórico..... | 6 |
| 1. SARS-CoV-2..... | 6 |
| 1.1. Clasificación y estructura | 6 |
| 1.2. Mecanismo de acción | 7 |
| 1.3. Transmisión | 9 |
| 1.4. Patogénesis..... | 9 |
| 1.5. Patología | 10 |
| 2. <i>Cannabis sativa</i> | 11 |
| 2.1. Generalidades | 11 |
| 2.2. Sistema endocannabinoide..... | 15 |
| 2.2.1 Receptores cannabinoides | 16 |
| 2.2.2 Endocannabinoides | 17 |
| 2.3 Actividad farmacológica | 18 |
| 2.4 CBD y SARS-CoV-2 | 20 |
| 3. Tratamiento de la materia vegetal..... | 23 |
| 3.1 Secado | 23 |
| 3.2 Tamaño de partícula | 24 |

| | |
|--|--------------------------------------|
| 3.3 Descarboxilación | 25 |
| 4. Técnicas de extracción de cannabinoides..... | 27 |
| 4.1 Extracción con fluidos supercríticos | 29 |
| 4.2 Efectos de la presión y temperatura en la extracción con fluidos supercríticos | 29 |
| 5. Técnicas de cuantificación | 30 |
| 5.1 Determinación de cannabinoides mediante GC | 30 |
| 5.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)-UV/DAD/MS..... | 32 |
| 6. Nitrito de amilo | 34 |
| 6.1 Óxido nítrico y SARS-CoV-2..... | 34 |
| 6.2 NO, estrés oxidativo e inflamación..... | 36 |
| 6.3 Rol del NO en el sistema respiratorio | 37 |
| VI. Resultados y discusiones | 39 |
| 1. Resultados de las principales investigaciones de CBD aislado y extractos en SARS-CoV-2 y COVID-19 desde el año 2020. | 39 |
| 2. Estudios clínicos activos desde octubre 2020 que utilizan NO para el tratamiento o la prevención de las complicaciones ocasionadas por el SARS- CoV-2. | 43 |
| 3. Extracción seleccionada para protocolo..... | 47 |
| 3.1 Proceso de obtención del extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD | 49 |
| 3.2 Proceso de análisis y cuantificación del extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD | 50 |
| 3.3 Formulación de la solución compuesta por un extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD junto a nitrito de amilo | 51 |
| VII. Conclusiones..... | 53 |
| 1. Acción coadyuvante de un extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD en SARS- CoV-2 | ¡Error! Marcador no definido. |
| 2. Acción coadyuvante de nitrito de amilo en SARS-CoV-2 . | ¡Error! Marcador no definido. |
| 3. Protocolo para el desarrollo de una solución de un extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD junto a amil nitrito | ¡Error! Marcador no definido. |
| VIII. Bibliografía | 56 |

Índice de figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Estructura del SARS-CoV-2 (SARS2)..... | 7 |
| Figura 2. | Interacción SARS-CoV-2 con receptores..... | 8 |
| Figura 3. | Estructura molecular de algunos cannabinoides..... | 13 |
| Figura 4. | Principales resultados de la interacción entre cannabinoides y distintos receptores..... | 19 |
| Figura 5. | Potencial del CBD en SARS-CoV-2..... | 22 |
| Figura 6. | Impacto del tamaño de partícula en la eficiencia de un extracto de <i>C. sativa</i> | 24 |
| Figura 7. | Proceso de descarboxilación de cannabinoides | 25 |
| Figura 8. | Cuatro posibles mecanismos en la etiología de COVID-19 que regulan los niveles y biodisponibilidad del NO..... | 37 |
| Figura 9. | Actividad del NO como terapia en la mitigación del COVID-19 en el sistema respiratorio..... | 38 |
| Figura 10. | Protocolo para el desarrollo del extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD..... | 48 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Principales cannabinoides, estructura química y sus usos farmacológicos..... | 18 |
| Tabla 2. Ejemplo de técnicas de extracción de cannabinoides..... | 29 |
| Tabla 3. Resumen de investigaciones del CBD en SARS-CoV-2 y COVID-19..... | 40 |
| Tabla 4. Resumen de estudios clínicos de NO en SARS-CoV-2 y COVID-19..... | 43 |
| Tabla 5. Extracción de cannabinoides a partir de diferentes condiciones de operación con fluidos supercríticos..... | 47 |
| Tabla 6. Extracción de aceites esenciales a partir de diferentes condiciones de operación con fluidos supercríticos..... | 48 |
| Tabla 7. Condiciones de operación del protocolo de extracción de <i>C. sativa</i> | 50 |
| Tabla 8. Condiciones de análisis del extracto de <i>C. sativa</i> alto en CBD..... | 51 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| 2-AG: | 2-araquidonilglicerol |
| ACN: | Acetonitrilo |
| AEA: | Anandamida |
| ALDH: | Aldehído deshidrogenasa |
| AMPc: | Adenosin monofosfato cíclico |
| BCP: | β -Cariofileno |
| CBC: | Cannabicromeno |
| CBD: | Cannabidiol |
| CBDA: | Ácido cannabidiólico |
| CBDV: | Cannabidivarina |
| CBG: | Cannabigerol |
| CBN: | Cannabinol |
| <i>C. sativa:</i> | <i>Cannabis sativa</i> |
| CCL: | Ligandos de quimioquinas |
| COX-2: | Ciclooxigenasa 2 |
| DAGL: | Diacilglicerol lipasa |
| ECA-2: | Enzima convertidora de angiotensina 2 |
| eNOS: | Óxido nítrico sintasa endotelial |
| FAAH: | Amida hidrolasas de ácidos grasos |
| FID: | Detector de ionización de la llama |
| GC: | Cromatografía de gases |
| GMPc: | Guanosin monofosfato cíclico |
| GPCR: | Receptor acoplado a proteína G |
| GPR55: | Receptor acoplado a proteína G 55 |
| Hb: | Hemoglobina |
| HPLC: | Cromatografía líquida de alto rendimiento |
| IFN: | Interferón |
| IL: | Interleuquina |
| iNOS: | Óxido nítrico inducible |

LPS: Lipopolisacáridos
MAGs: Monoacilgliceroles
MGLs: Monoacilglicerol lipasa
MS: Espectroscopia de masas
NADPH: Nicotinamida adedina dinucleótido fosfato
NAES: N-aciletanolaminas
NAPE-PLD N-acil-fosfatidil-etanolamina
NK: Natural killer
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NO: Óxido nítrico
NORS: Solución liberadora de óxido nítrico
PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SARS: Síndrome respiratorio agudo grave
SD: Síndrome de Dravet
SEC: Sistema endocannabinoide
SLG: Síndrome Lennox-Gastaut
TGF: Factor de crecimiento transformante
THC: Tetrahidrocannabinol
THCA: Ácido tetrahidrocannabinólico
THCV: Tetrahidrocannabivarina
TLR: Receptores tipo toll
TMPRSS2: Enzima proteasa transmembrana de serina 2
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRP: Receptor de potencial transitorio

Resumen

La enfermedad por coronavirus (COVID-19) es una enfermedad infecciosa provocada por el virus SARS-CoV-2. Este virus produjo desde el 2019 una pandemia que generó alrededor de 674 millones de personas infectadas y 6,86 millones de muertes a nivel mundial hasta febrero 2023. Ante sus efectos a nivel inmune e inflamatorio y la posible mortalidad producto del virus en los humanos, se encendieron las alarmas en el ámbito de la investigación científica, teniendo como foco principal la búsqueda de tratamientos que pudieran ser de utilidad tanto en forma de tratamiento, como en la prevención del SARS-CoV-2. Actualmente se están realizando diversas investigaciones en estudios preclínicos y clínicos, sobre potenciales moléculas para el tratamiento y/o prevención de este virus.

Se realizó una revisión bibliográfica en PubMed, MEDLINE, Scielo, Elsevier, SCOPUS, IBECS, EBSCOhost, y manualmente a través de internet de artículos, libros y revistas, sobre dos compuestos de interés por sus efectos farmacológicos positivos en distintas dianas moleculares del SARS-CoV-2. Los extractos de *Cannabis sativa* (*C. sativa*) alto en cannabidiol (CBD) y su forma aislada, se presentaron como posibles candidatos coadyuvante en el tratamiento de COVID-19 por sus efectos inmunomoduladores y sus efectos antiinflamatorios, además de presentar también a un efecto preventivo antiviral, por su efecto directo sobre la unión del virus a las células hospederas mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA-2). El nitrito de amilo, un precursor de óxido nítrico (NO), el cual ha sido un medicamento olvidado, presenta un mecanismo de acción que podría tener un efecto positivo en la regulación de los niveles de óxido nítrico endógeno, los cuales se ven afectados ante la infección y a distintas comorbilidades.

Finalmente, en base a los resultados de la investigación bibliográfica, se afirma que ambos compuestos presentan un efecto coadyuvante en el tratamiento y prevención del SARS-CoV-2, proponiéndose un protocolo para la elaboración de una solución compuesta por la mezcla de un extracto de *C. sativa* alto en CBD con el nitrito de amilo.

Abstract

Protocol for the elaboration of a solution consisting of a mixture of a *Cannabis sativa* extract high in cannabidiol together with amyl nitrite, as an adjuvant in the prevention and treatment of complications caused by the SARS-CoV-2 virus.

Coronavirus disease (COVID-19) is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. This virus provoked since 2019 a pandemic that generated about 674 million infected people and 6.86 million deaths worldwide until february 2023. Given its immune and inflammatory effects and the possible mortality resulting from the virus in humans, alarms were turned in the field of scientific research, having as main focus the search for treatments that could be useful both in the form of treatment and prevention of SARS-CoV-2. Currently, several investigations are being carried out in preclinical and clinical studies on potential molecules for this virus.

A literature review was conducted in PubMed, MEDLINE, Scielo, Elsevier, SCOPUS, IBECS, EBSCOhost, and manually through the internet of articles, books and journals on two compounds of interest for their positive pharmacological effects on different molecular targets of SARS-CoV-2. *Cannabis sativa* (*C. sativa*) extract high in cannabidiol (CBD) and their isolated form were presented as possible adjuvant candidates in the treatment of COVID-19 disease because of their immunomodulators effects and its anti-inflammatory effects, which then was also extended to an antiviral preventive effect, for its direct effect on the binding of the virus to host cells by the angiotensin-converting enzyme (ACE-2). Amyl nitrite, a precursor of nitric oxide (NO), a forgotten drug, presents a mechanism of action that could have a positive effect on the regulation of endogenous nitric oxide levels which are affected due to infection and different comorbidities.

Finally, based on the results of the bibliographic research both compounds are stated to have a positive adjuvant effect in the treatment and prevention of SARS-CoV-2 proposing a protocol of the elaboration of a solution composed by a mixture of *C. sativa* high in CBD with amyl nitrite.

I. Introducción

La aparición reiterada de emergencias sanitarias producidas por enfermedades virales durante nuestra historia y el aumento sustancial de estas durante el transcurso del XXI, ha hecho visible la necesidad de nuevos enfoques en la investigación científica debido a la recurrencia de pandemias en un corto periodo de tiempo. Uno de los primeros brotes virales fue el síndrome respiratorio agudo grave (SARS) en el año 2002, producido por un tipo de coronavirus el cual produjo miles de casos y tuvo una mortalidad alrededor del 10%. Otra de las importantes infecciones virales que se han presentado en este siglo ha sido la influenza H1N1 o gripe porcina, lo que causó alrededor de 250.000 defunciones a nivel global, y de manera más reciente, en el año 2019 se produce la reaparición de un brote de coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo SARS-CoV-2, causando la actual pandemia de la enfermedad ocasionada por COVID-19, produciéndose hasta el momento alrededor de 674 millones de contagios y 6,86 millones de defunciones (Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, 2023). En Chile las cifras alcanzan a 5,14 millones de contagios y alrededor de 64 mil muertes (Ministerio de salud, 2023), las consecuencias de esta pandemia han encendido la alarma en el desarrollo de nuevas perspectivas de tratamiento, buscando nuevas formulaciones, con las cuales se pueda obtener una respuesta positiva en la reducción tanto de la sintomatología, como de la patología misma. Ante la ausencia de una terapia farmacológica efectiva contra el COVID-19 y debido a la importancia del tiempo en esta emergencia sanitaria, con el fin de evitar mayores tasas de mortalidad, es razonable la necesidad de innovar en nuevas estrategias de intervención farmacológica para el tratamiento de estas nuevas patologías virales más complejas (Ebrahimi, S., 2020; Phadke, M. & Saunik, S., 2020).

Las plantas medicinales juegan un papel importante en el cuidado de la salud de las personas. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades. La sociedad humana en todas las épocas ha acumulado un vasto arsenal de conocimientos tradicionales

sobre el uso de plantas medicinales. Aproximadamente el 80% de la población de la mayor parte de los países en desarrollo, aún utilizan la medicina tradicional derivada de plantas para satisfacer las necesidades primarias de salud (Zambrana, T., 2005). Un ejemplo de lo señalado anteriormente corresponde a la búsqueda de un tratamiento para el SARS-CoV-2 por China, país en el cual se están realizando más de 80 estudios clínicos para testear posibles tratamientos para este virus, ejecutando pruebas tanto de nuevas moléculas, como de otras obtenidas desde especies vegetales empleadas por la medicina herbaria tradicional de este país (Maxmen, A., 2020).

Para combatir los coronavirus y sus posibles variantes, se necesitan urgentemente medicamentos y el desarrollo de vacunas. En este contexto el sistema endocannabinoide (SEC) actúa como un modulador en la activación de la microcirculación, el sistema inmunológico y el sistema nervioso autónomo, junto con el control de las funciones farmacológicas como las respuestas emocionales, la homeostasis, las funciones motoras, la cognición y la motivación (Onay, A., 2021). En los últimos años ha surgido evidencia científica del uso medicinal de la planta *Cannabis sativa*, esto a partir de la compleja mezcla de sus componentes activos más abundantes, los cannabinoides, terpenos, flavonoides, entre otros, estas moléculas nos ofrecen nuevos recursos terapéuticos para diversas patologías, generando nuevos enfoques de investigación en este recurso natural. Los cannabinoides, son los principales constituyentes de la planta y corresponden a metabolitos secundarios que han recibido atención internacional en el campo de la salud debido a sus propiedades terapéuticas. Recientemente, se han realizado pruebas para el tratamiento de COVID-19, debido a sus propiedades antivirales y antiinflamatorias. De hecho, se plantea la hipótesis de que los compuestos de tipo cannabinoide, y en particular el cannabidiol (CBD), aislados de tricomas glandulares, son una opción terapéutica contra el SARS-CoV-2 (Mahmud, M. S., *et al*, 2021).

II. Hipótesis

El protocolo de una solución compuesta por un extracto de *Cannabis sativa* alto en cannabidiol (CBD), junto a nitrito de amilo, tendría una acción coadyuvante en la prevención y/o tratamiento de las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2.

III. Objetivos

III.I General

Proponer un protocolo para el desarrollo de una solución compuesta por un extracto de *Cannabis sativa* alto en cannabidiol (CBD) junto a nitrito de amilo, como terapia coadyuvante en la prevención y/o tratamiento de las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2.

III.II Específicos

1. Evidenciar bibliográficamente la acción coadyuvante que posee un extracto de *Cannabis sativa* alto en cannabidiol (CBD), en la prevención y/o tratamiento de las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2.
2. Demostrar bibliográficamente un posible efecto coadyuvante del nitrito de amilo, en la prevención y/o tratamiento de las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2.
3. Establecer un protocolo para el desarrollo de una solución constituida por un extracto de *Cannabis sativa* alto en cannabidiol (CBD) junto a nitrito de amilo en la prevención y/o tratamiento de las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2.

IV. Materiales y métodos.

Mediante una revisión sistemática de artículos científicos consultados en distintas bases de datos, se definieron criterios de inclusión y exclusión, y un conjunto de variables para analizar las características de los artículos e información seleccionada, estos fueron los siguientes:

- Tipos de estudio: revisión sistemática y descriptiva en la que se incluyeron revisiones sistemáticas, investigaciones originales, editoriales, revisiones de tema, opiniones y comentarios.
- Estrategia de búsqueda bibliográfica: se realizó una búsqueda en PubMed, MEDLINE, Scielo, Elsevier, SCOPUS, IBECS, EBSCOhost, y manualmente a través de internet de artículos, libros y revistas.
- Las búsquedas se limitaron a los idiomas inglés y español, sin limitaciones en cuanto a fechas.
- Términos claves: cannabinoides, cannabidiol, COVID-19, SARS-CoV-2, extractos, extractos medicinales, nitrito de amilo, óxido nítrico, donantes de óxido nítrico y mezcla de estas palabras, así también su respectiva traducción al inglés.
- Métodos de revisión: se estudiaron títulos, artículos, resúmenes y textos completos de los documentos que fueron seleccionados en base a los criterios de búsqueda.

V. Marco teórico.

1. SARS-CoV-2

1.1. Clasificación y estructura

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, estos son un tipo de virus ARN monocatenario encapsulado. Esta familia está compuesta por cuatro géneros: α , β , γ y δ , de los cuales los α y β -CoV pueden infectar a los mamíferos incluidos los humanos (Ludwig, S. & Zarbock, A., 2020). En este último, se encuentran los coronavirus SARS-1, SARS-2 y síndrome respiratorio del oriente medio (MERS). Los α -coronavirus producen normalmente una clínica de catarro común mientras, que los β -coronavirus en algunos casos pueden ocasionar un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Fernández-Pérez, G., 2021). El coronavirus SARS-CoV-2 es un síndrome producido por un nuevo tipo de coronavirus, que puede afectar a las personas y que se detectó por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China. Este nuevo virus que pertenece a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, y al subgénero *Sarbecovirus* (β -coronavirus, β -2b), está mucho más próximo genéticamente a los coronavirus de los murciélagos que del SARS humano y se ha relacionado con el genoma del virus encontrado en el “murciélago en herradura” (*Horseshoe bats*), de la especie *Rhinolophus*, con una similitud del 96% y localizado en la provincia de Yunnan.

Estructuralmente los coronavirus son virus esféricos envueltos en una bicapa lipídica y que contiene un ARN monocatenario (ssRNA). El genoma del virus SARS-CoV-2 codifica 4 proteínas estructurales: la proteína S (spike), la proteína E (envelope), la proteína M (membrane) y la proteína N (nucleocapside), como se puede observar en la figura 1.

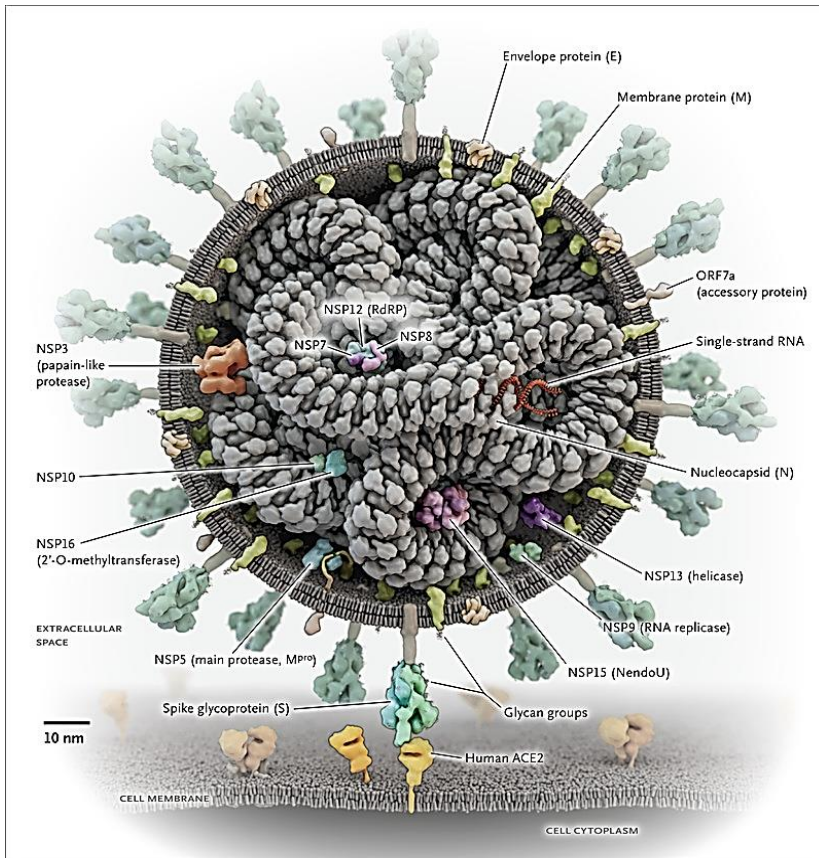


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2 (SARS-2). Virus ARN monocatenario encapsulado con glicoproteínas de superficie. La proteína spike (S) es la que le confiere la característica morfología en corona y la que establece la unión con los receptores celulares, tal como la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) (Parks, J. M., & Smith, J. C., 2020).

1.2. Mecanismo de acción

El SARS-CoV-2 infecta y se replica de forma eficiente en los neumocitos, macrófagos y células dendríticas de las partes más profundas del parénquima pulmonar en las que reside el receptor celular ECA-2, el cual es utilizado por este virus, para unirse a estas células e iniciar el proceso infeccioso. Este es un paso crítico para la entrada del virus, en el cual, la glicoproteína S utiliza sus dos subunidades funcionales para lograrlo: La subunidad S1, responsable de la unión con el receptor de la célula hospedera y la subunidad S2, responsable de la fusión del virus con las membranas celulares. Cuando la glicoproteína S del SARS-CoV-2

se une al receptor ECA-2, el complejo resultante es procesado proteolíticamente por la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2), lo que conduce a la escisión de ECA-2 y a la activación de la glicoproteína S, iniciándose así el proceso de unión y fusión del virus con la membrana celular, finalizando posteriormente con la entrada del virus a la célula como se puede observar en la figura 2.

Una vez que el virus logra entrar en las células del tracto respiratorio por un mecanismo de endocitosis, el genoma ARN del virus SARS-CoV-2 se libera en el citoplasma para su replicación. El ARN genómico, actuando sobre el ribosoma, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, elabora nucleocápsides para formar viriones intracelulares y nuevas partículas virales que salen de la célula por exocitosis. Las partículas virales son liberadas por la célula y proceden a infectar nuevas células. La célula se altera funcional y estructuralmente y llega a una muerte celular programada o apoptosis celular, esto durante un ciclo repetitivo que culmina con la recuperación o la muerte del paciente (Oliva Marín, J.E., 2020).

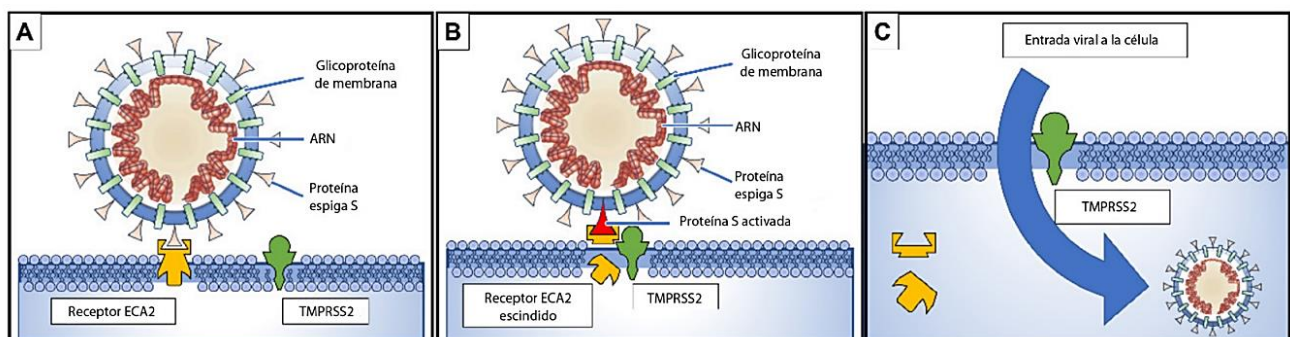


Figura 2. Interacción de SARS-CoV-2 con receptores. (A) Las proteínas spike (S) en la superficie del coronavirus se unen a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) en la superficie de la célula diana; (B) La proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) se une y escinde el receptor ECA-2. En el proceso, la proteína S se activa; (C) El receptor ECA-2 escindido y la proteína S activada facilitan la entrada viral. La expresión de TMPRSS2 aumenta la captación celular del coronavirus (Rabi, F. A., *et al.*, 2019).

1.3. Transmisión

El SARS-CoV-2 se transmite mediante gotas del tracto respiratorio y el contacto cercano con personas o superficies donde se encuentre el patógeno. También, el contagio puede ocurrir mediante transmisión aérea, cuando las personas son expuestas a una alta concentración del virus en ambientes cerrados por un tiempo prolongado. La transmisión vía gotas se produce por estornudos, tos, o contacto estrecho con otra persona. Se ha observado también una transmisión fecal-oral, ya que se encontró el virus en aguas residuales en Europa, y el ARN del SARS-CoV-2, se ha detectado consistentemente en el tejido gastrointestinal de pacientes con COVID-19 (Harrison, A. G., *et al.*, 2020; Errecalde, J. O., *et al.*, 2020).

1.4. Patogénesis

El virus al ingresar a las membranas de la mucosa nasal, laríngea y orofaríngea llega a los pulmones y luego a la sangre periférica, donde se produce la viremia. Esto, produce finalmente que el virus comience a atacar los órganos donde se expresa la ECA-2, la cual, se encuentra adherida a la membrana celular de células ubicadas en el cerebro, corazón, arterias, endotelio respiratorio, pulmones (células alveolares tipo I y II), hígado, intestinos, riñones y testículos. Su función principal, es reducir la presión arterial al catalizar la escisión de angiotensina II (péptido vasoconstrictor) en angiotensina 1-7 (un vasodilatador).

El SARS-CoV-2 se une en todos los sitios donde se exprese la ECA-2, produciendo con esto una respuesta inflamatoria en todos los sistemas, generándose consecuentemente niveles sanguíneos significativamente elevados de citoquinas y quimioquinas quimioatrayentes en dichos sitios, comenzando con esto, una respuesta a nivel fisiológico que inicia con una tormenta de citoquinas, la cual produce grandes cantidades de sustancias proinflamatorias tales como, interferón- α (IFN- α), interferón- γ (IFN- γ), interleuquinas (IL); IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), ligando de quimioquinas (CCL); CCL2,

CCL4, CCL5, CXCL7, CXCL9, CXCL10), etc. Este proceso, se traduce en un fuerte ataque al sistema inmunitario, causando daño primeramente a niveles alveolares y pulmonares y luego daño a nivel orgánico pudiendo causar graves problemas, incluso la muerte.

La unión del SARS-CoV-2 a las células del tracto respiratorio mediante la ECA-2, produce una cascada inflamatoria a nivel de las vías respiratorias inferiores, causando el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Se produce con esto, la incapacidad de la ECA-2 de ejercer su acción protectora sobre las células pulmonares, generándose en consecuencia una acumulación de angiotensina II y también, una renovación desfavorable del miocardio y vasoconstricción periférica (Oliva Marín, J. E., 2020).

1.5. Patología

La cascada de intermediarios proinflamatorios causa daño en células epiteliales impidiendo a los pulmones el intercambio gaseoso O_2 - CO_2 y la limpieza de mucosidad a nivel pulmonar, influenciando con esta alteración un posible desarrollo de neumonía. La sintomatología clínica del COVID-19 incluye fiebre (observado en aproximadamente 99% de los casos), escalofríos, tos seca (observado aproximadamente en 59% de los casos), producción de expectoración o flema (observado en aproximadamente 27% de los casos), fatiga (observado en aproximadamente 70% de los casos), letargia, artralgia, mialgia (observado en aproximadamente 35% de los casos), dolor de cabeza, disnea, náusea, vómitos, anorexia (observado aproximadamente en 40% de los casos), y diarrea (observado en aproximadamente 3,7 % de los casos), estos síntomas y sus porcentajes fueron informados a partir de los primeros casos que se presentaron en China (Yang, Y., *et al.*, 2020).

2. *Cannabis sativa*

2.1. Generalidades

La *C. sativa* es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Cannabaceae. Es una de las plantas más representativas debido a su composición química, la cual se encuentra en constante estudio y actualmente cuenta con más de 500 compuestos, entre los que destacan terpenos, flavonoides, alcaloides, estílbidos, amidas fenólicas y cannabinoides (Radwan, M. M., *et al.*, 2009). La *C. sativa*, ha sido ampliamente usada en la etnomedicina y a pesar de los innumerables beneficios de la especie vegetal, el uso recreativo de ésta a raíz de sus efectos psicoactivos ha llevado en el siglo XX a que sea clasificada como una droga de carácter ilegal en algunos países, afectando el desarrollo de la investigación en este campo. En Chile, la Ley 20.000 promulgada el año 2005 regula el cultivo, tráfico, uso, consumo, porte y tenencia de estupefacientes, entre las que se encuentra la *C. sativa*. La Ley se complementa con el código sanitario y decretos derivados, entre los que destaca el Decreto 404 y 405 (Zamorano, N., *et al.*, 2019). El uso medicinal de *C. sativa* ha adquirido atención y desarrollo desde el año 2014, donde se tornó un punto importante de debate, a raíz los efectos farmacológicos benefactores que podría traer a los pacientes y el aumento de estudios que demostraban su efecto beneficioso. El principal beneficio que se vislumbraba en ese entonces era en pacientes en los cuales, los analgésicos tradicionales no les brindaban el alivio suficiente. A partir de estos debates, se decidió otorgar los primeros permisos de cultivo de *C. sativa* con fines medicinales en la comuna de la Florida y posteriormente a la comuna de Santiago. A pesar de que cada día son más los pacientes interesados en este tipo de medicina, no se ha logrado un acuerdo que mejore las condiciones que establece la Ley (Alcaíno, C., 2019).

Aún son muchos los pacientes que debido a que la Ley 20.000 que indica portar, cultivar y distribuir *C. sativa* es ilegal, han cruzado la línea de la legalidad para abastecerse y mantener un tratamiento que mejora su vida frente a una enfermedad. Últimamente con los cambios que se han presentado en cuanto a la

legalidad de *C. sativa* en los distintos países del mundo y extendiéndose su legalidad con fines medicinales, existe un interés revivido y creciente en esta planta siendo hoy utilizada por varios pacientes en diversas patologías.

Los cannabinoides son sustancias que suelen tener una estructura carboxílica con 21 carbonos y están formados generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno, tal como se observa la estructura de los principales cannabinoides en la figura 3. Estos, se acumulan en la resina de tricomas glandulares de las inflorescencias femeninas de la planta de *C. sativa*.

El primer representante de esta familia fue el tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni, Y. & Mechoulam, R., 1964) y más tarde el CBD, cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidivarina (CBDV), y tetrahidrocannabivarin (THCV). Los más estudiados desde el punto de vista de sus aplicaciones terapéuticas son el THC y el CBD, aunque otros cannabinoides están comenzando a mostrar al menos en estudios preclínicos, sus efectos potenciales en el campo de la medicina (Walsh, K. B., *et al.*, 2021). Entre las propiedades terapéuticas del THC clínicamente probadas, destacan la supresión de náuseas y vómitos inducidos por quimioterapias, la estimulación del apetito, la inhibición del dolor y la espasticidad. Sin embargo, el potencial terapéutico de este cannabinoide es mucho mayor y extendido, en pruebas preclínicas se ha vislumbrado que este compuesto podría ser neuroprotector, antitumoral, antiinflamatorio, entre otros (Ligestri, A., *et al.*, 2016). Por otra parte, el CBD ha demostrado en estudios preclínicos tener efectos antipsicóticos, ansiolíticos y anticonvulsivantes en pacientes, además de presentar propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antieméticas, antitumorales y neuroprotectoras, por mencionar algunas (Legare, C., *et al.*, 2022).

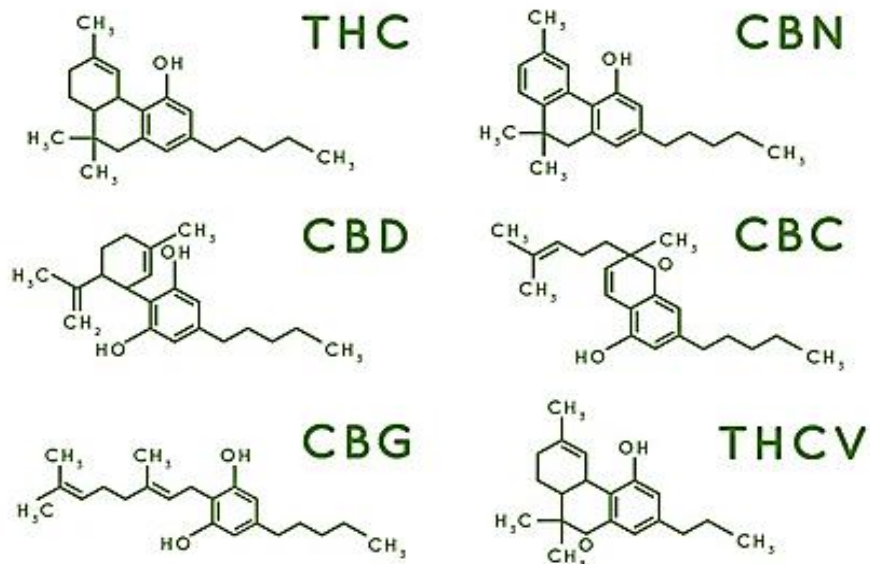


Figura 3. Estructura molecular de algunos cannabinoides. THC: tetrahidrocannabinol, CBN: cannabinol, CBD: cannabidiol, CBC: cannabicromeno, CBG: cannabigerol, THCv: tetrahidrocannabivarina

Cabe destacar que existen en el mercado medicamentos registrados con cannabinoides. El primer medicamento de CBD purificado derivado de plantas, Epidiolex®, fue aprobado en los Estados Unidos por la FDA el 25 de junio de 2018. Su aprobación para pacientes ≥ 2 años con síndrome de Dravet (SD) o el síndrome de Lennox-Gastaut (LGS), demostró una mejora notable en el tratamiento de las convulsiones que presentan estos pacientes. Poniendo de manifiesto su eficacia y el perfil de seguridad que tiene el uso de este cannabinoide incluso en niños.

Además de cannabinoides, la *C. sativa* produce otra familia de compuestos químicos con potencial terapéutico denominados terpenos, estos, son compuestos mayoritariamente volátiles responsables de las características organolépticas de la planta. El estudio de estos compuestos está muy poco explorado, pero algunas de las investigaciones han demostrado prometedores efectos farmacológicos en estudios preclínicos, por ejemplo, el potencial antiinflamatorio y antiviral, que presenta el terpeno eucaliptol (1,8-cineol), presente en *C. sativa* (Juergens, U. R., et al., 2004). Esta composición tan compleja hace que esta planta tenga un amplio abanico de efectos farmacológicos y una fuente de potenciales efectos

farmacológicos entre los propios constituyentes de la planta, que pueden presentarse de manera sinérgica, como también antagónica. Varios estudios han validado esta hipótesis, sugiriendo que los preparados de cannabinoides o extractos de *C. sativa* son mejores herramientas terapéuticas que los cannabinoides aislados, ya sea en términos de eficacia, como de tolerabilidad. Esta interacción, se denomina efecto “séquito” o “entourage”, término el cual fue utilizado por primera vez por el científico Raphael Mechoulam en 1998. Más recientemente, se ha extendido el uso de este término para describir de forma general la sinergia de los compuestos presentes en la *C. sativa*. Uno de los mejores ejemplos de este efecto lo demuestra la relación que presenta el THC y CBD, por una parte, el CBD aumenta los efectos terapéuticos del THC mejorando su distribución y biodisponibilidad. Este punto, debido a la alta lipofilia que presenta el CBD, el cual penetra en las membranas biológicas aumentando su fluidez y con ello la capacidad del THC de penetrar en los tejidos. Además, el CBD inhibe la metabolización del THC en el hígado, produciendo así un aumento de la vida media del THC mediante la inhibición de algunas isoformas del citocromo p450.

El efecto séquito también puede deberse a la interacción que existe entre cannabinoides y componentes no cannabinoides de la planta, como se indicó anteriormente. Algunos componentes, como los terpenos poseen efectos terapéuticos per se, los cuales pueden contribuir al efecto terapéutico que presentan los cannabinoides. El α -pineno, por ejemplo, presente en la *Salvia officinalis* (salvia) presenta efectos terapéuticos como antiinflamatorio, broncodilatador y antibiótico, este, inhibe la acetilcolinesterasa lo que podría contrarrestar los déficits en la memoria a corto plazo inducidos por el THC (Asim, K., 2021).

En un estudio *in vitro*, se examinó el efecto que produjo la utilización de una formulación que consistía en 30 terpenos naturales que se encuentran en la *C. sativa*, principalmente β -cariofileno (BCP), eucaliptol y citral. La actividad antiviral de la formulación mejoró cuando se aplicó junto con el CBD, lo que sugiere un efecto sinérgico o aditivo entre la formulación de terpenos y el CBD (Chatow, L., *et al.*,

2021). En diversas investigaciones se ha visto que, dentro de todos los terpenos, el BCP es el que al parecer presenta el potencial terapéutico más prometedor en SARS-CoV-2. El BCP, ya que es un ligando cannabinoide natural se une a varios receptores, como el receptor cannabinoide de tipo 2 (CB2), los receptores activados por proliferadores de peroxisoma- α y γ (PPAR- α y PPAR- γ), receptores opioides, receptores histaminérgicos, receptor de potencial transitorio vaniloide (TRPV) y receptores tipo toll (TLR). Se demostró que el BCP se dirige a la proteasa principal del SARS-CoV-2 denominada M^{pro}, y que puede prevenir la replicación viral en las células del huésped. Además, parece dirigirse a los genes inmunes involucrados en la regulación de numerosas vías de señalización, y por lo tanto se sugirió que puede ser útil como un posible agente contra COVID-19. También, podría considerarse como un potencial candidato terapéutico en COVID-19, debido a sus propiedades antivirales y antiinflamatorias que pueden resultar en la inhibición de la tormenta de citoquinas en pacientes con COVID-19 (Janecki, M., *et al.*, 2022).

2.2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema neuromodulador del metabolismo que se conforma por receptores cannabinoides de tipo 1 y 2 (CB1 y CB2), ligandos endógenos o endocannabinoides, sistemas enzimáticos responsables de su síntesis y degradación, las vías de señalización intracelular y sus sistemas de transporte.

Con el avance en la investigación durante las últimas décadas y el descubrimiento de nuevos componentes, el conocimiento sobre este sistema se ha ampliado significativamente. Se ha visto que, este sistema dinámico desempeña varias funciones homeostáticas modulando la expresión de receptores, así como la biosíntesis de ligandos para satisfacer las necesidades de nuestro sistema. El SEC, ya se encontraba presente en vertebrados primitivos con una red neuronal, lo que es consistente con su antigua filogenética. El SEC, es un sistema básicamente bioquímico que influye sobre varios procesos fisiológicos de gran importancia, tal como en el apetito y la ingesta de alimentos, la sensación de dolor, la función

cardiovascular, la función respiratoria, la función reproductiva, el estado de ánimo, la neuroprotección, la transmisión sináptica, el control motor, la memoria, el aprendizaje, el sistema inmune, la inflamación, la liberación y acción hormonal, la proliferación, la adhesión y la apoptosis celular, entre otros (Katz, J., *et al.*, 2018).

Existen tres tipos diferentes de cannabinoides, el primero son los endocannabinoides que son generados por el propio organismo, el segundo son los fitocannabinoides que son producidos por medio de las plantas y finalmente los cannabinoides sintéticos que son provenientes de laboratorios farmacéuticos. Todos estos cannabinoides de diferentes procedencias, una vez en el cuerpo interactúan con los receptores cannabinoides, para actuar mediante el SEC regulando así una variedad de procesos fisiológicos.

2.2.1 Receptores cannabinoides

En 1965, Gaoni & Mechoulam ambos investigadores de la especie vegetal *C. sativa*, comenzaron a dar luz sobre nuevas y prometedoras investigaciones en esta área, primeramente, con el aislamiento y caracterización de la molécula THC. Más de 20 años después, se aisló el primer receptor cannabinoide, el cual demostró una alta afinidad al THC en ratas. A este receptor se le dio el nombre de CB1. Este tipo de receptores se encuentra predominantemente en el sistema nervioso central y periférico, pero también está localizado en otras zonas del cuerpo. Estos receptores están relacionados con una gran cantidad de procesos biológicos como el movimiento, la reproducción, las emociones, la memoria, la recompensa, el dolor, la ingesta de alimentos, las náuseas y vómitos.

CB1, es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), que utiliza la familia G (i/o) como mediador principal disminuyendo el adenosin monofosfato cíclico (AMPC), a través de la inhibición de las adenilil ciclasas y regulando los canales de calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+), reduciendo así la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico (Devane, W. A., *et al.*, 1988).

En un estudio Munro *et al.* (1993), descubrió un segundo tipo de receptores cannabinoides, el receptor denominado receptor CB2, el cual está altamente expresado en células inmunes, como linfocitos B, linfocitos CD8⁺, células natural killer (NK), monocitos, linfocitos CD4⁺ y neutrófilos. Los receptores CB2 presentan un efecto antiinflamatorio al reducir la liberación de citoquinas proinflamatorias y aumentar la producción de citoquinas antiinflamatorias, además de inhibir la migración de macrófagos y regular la activación de linfocitos T.

Además de unirse a los receptores CB1 y CB2, los cannabinoides afectan alternativamente a muchos otros receptores, como el receptor acoplado a la proteína G 55 (GPR55), los canales TRPV y receptores PPARs. Además, exhiben afinidad con el receptor de serotonina 1A (5-HT1A), así como con los receptores de adenosina y glicina (Janecki, M., *et al.*, 2022).

2.2.2 Endocannabinoides

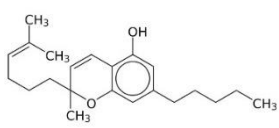
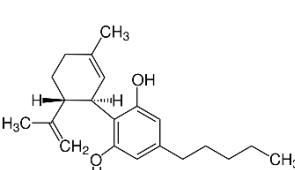
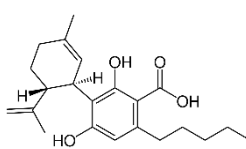
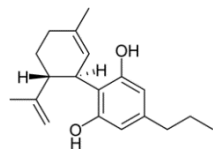
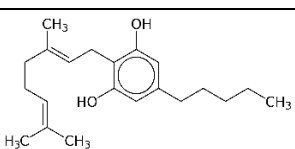
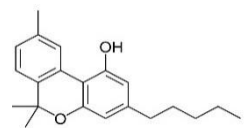
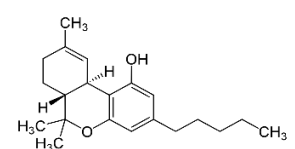
Los agonistas endógenos de los receptores de cannabinoides conforman una amplia familia que tienen en común, que son sintetizados a demanda y se liberan inmediatamente al espacio extracelular. Los endocannabinoides, son compuestos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados de los cuales los más importantes son los derivados del ácido araquidónico, la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), que pertenecen al grupo de las N-aciletanolaminas (NAEs) y de los 2-mononacilgliceroles (MAGs) respectivamente. Ambos ligando son sintetizados y degradados por diferentes vías enzimáticas conformando una maquinaria mucho más compleja que la de los clásicos neurotransmisores.

Además, las tres enzimas responsables de su biosíntesis, fosfolipasa D selectina de N-acil-fosfatidil-etanolamina (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasas (DAGL) α y β , (para AEA y 2-AG, respectivamente), y de su inactivación hidrolítica (amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MGL), entre otras), determinan que la implicación fisiológica y fisiopatológica de ambos endocannabinoides sea distinta (Ramos, A. J., 2017).

2.3 Actividad farmacológica

A continuación, en la tabla 1. Se presenta el efecto farmacológico que presentan algunos de los principales cannabinoides en diversas patologías. Además, en la figura 4. Se expone el efecto antiinflamatorio, antioxidante e inmunomodulador de los cannabinoides al interactuar con distintos receptores.

tabla 1. Principales cannabinoides, estructura química y usos farmacológicos:

| Cannabinoides | Estructura química | Uso farmacológico |
|-----------------------------|---|---|
| Cannabicromeno (CBC) |  | Dolor crónico, migraña y trastornos de la piel |
| Cannabidiol (CBD) |  | Insomnio, ansiedad, síndrome post-ébola, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, afecciones de la piel |
| Ácido cannabidiólico (CBDA) |  | Náuseas, cáncer, y agente antiinflamatorio |
| Cannabidivarin (CBDV) |  | Convulsiones, Síndrome de Rett, náuseas y trastornos del espectro autista |
| Cannabigerol (CBG) |  | Enfermedad inflamatoria intestinal, disfunción de la vejiga, enfermedad de Huntington y tumores |
| Cannabinol (CBN) |  | Agente antimicrobiano, analgésico y antiinflamatorio |
| Tetrahidrocannabinol (THC) |  | Cáncer, insomnio, pérdida de apetito, náuseas y enfermedad de Alzheimer |

adaptado por autor (Walsh, K. B., *et al.*, 2021).

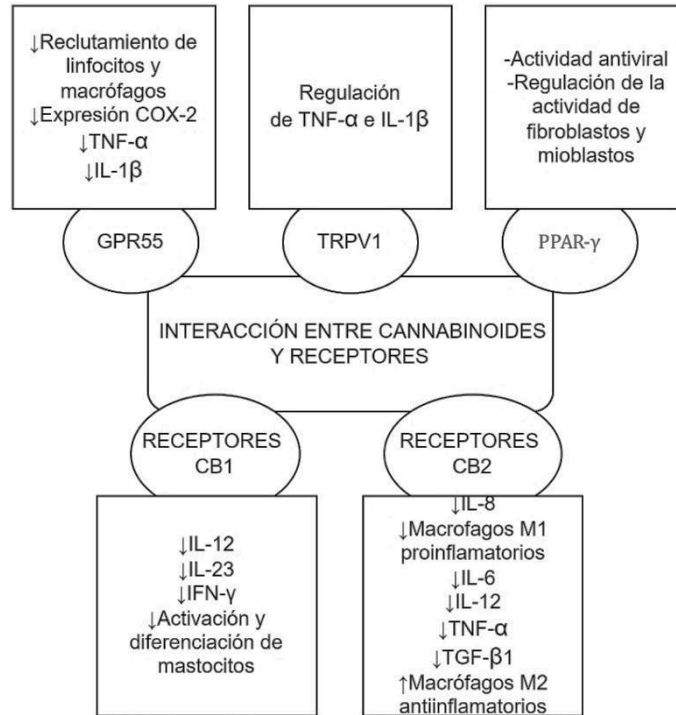


Figura 4. Principales resultados de la interacción entre cannabinoides y distintos receptores. La interacción con el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) produce un efecto inmunomodulador a nivel de linfocitos y macrófagos, presenta también un efecto en el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), modulando así la inflamación y apoptosis, disminuye la expresión de ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), produciendo un efecto antiinflamatorio, además de reducir la interleuquina 1- β (IL-1 β), disminuyendo con esto el efecto proinflamatorio. En los receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) se produce regulación mediante la disminución de TNF- α e IL-1 β . En receptores activados por proliferadores de peroxisomas- γ (PPAR- γ) se presenta una respuesta positiva a nivel de actividad antiviral y una regulación de la actividad de fibroblastos y mioblastos en el proceso de fibrosis. La relación con CB1, se observa una disminución de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 12 y 23 (IL-12 e IL-23), se produce una disminución de interferón- γ (IFN- γ) y una disminución en la actividad inmune a través de los mastocitos. La interacción con CB2 muestra una respuesta reguladora a nivel inmunológico, a través de una disminución de interleuquinas 8, 6 y 12 (IL-8, IL-6, IL-12), macrófagos proinflamatorios y del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), el cual tiene un efecto directo en el control de la proliferación, activación y diferenciación de células T. Otro efecto de esta interacción se observa en el aumento de macrófagos M2, los cuales tienen un efecto antiinflamatorio, debido a que secretan interleuquina 10 (IL-10), que inhibe la acción citotóxica de células T, inhibiendo los linfocitos Th1 y la citotoxicidad de células natural killer (NK) activadas por interleuquinas (Janecki, M., et al., 2022).

2.4 CBD y SARS-CoV-2

El último tiempo ha cobrado interés farmacológico la posible utilización de fitocannabinoides como el CBD en diversas patologías. Este, es un cannabinoide no psicotrópico que presenta poca afinidad de unión a los receptores cannabinoides, el cual actúa como modulador alostérico de los receptores cannabinoides CB1 y posee un perfil de seguridad favorable demostrado en estudios clínicos. Este cannabinoide, es considerado como una de las moléculas emergentes más prósperas en el área farmacológica a raíz de su amplio rango de efectos terapéuticos, los cuales van desde una acción anticonvulsivante, sedante, hipnótica, antipsicótica, antiinflamatoria, anticancerígena, analgésica hasta una actividad neuroprotectora (Iffland, K. & Grotenhermen, F., 2017). Se ha observado un efecto farmacológico prometedor de extractos de *C. sativa* con un alto contenido de CBD, mediante una acción reguladora en la ECA-2 y en la enzima TMPRSS2, cruciales en la puerta de entrada viral del epitelio oral, pulmonar e intestinal que constituyen importantes vías de penetración del SARS-CoV-2 (Wang, B., *et al.*, 2020).

Se realizó una comparación en la acción moduladora de la ECA-2 mediante la administración de un extracto de *C. sativa* alto en CBD versus dexametasona en una línea celular epitelial alveolar, hallándose mejores resultados en *C. sativa* con una reducción en los niveles de expresión de ECA-2 de hasta 4-6 horas post tratamiento. Dexametasona, también redujo su expresión, pero menos extendida post administración del tratamiento (Anil, S., *et al.*, 2021). A nivel de inmunomodulación, en la primera fase de la enfermedad de COVID-19, la respuesta inmune adaptativa es necesaria para eliminar el virus y para prevenir la progresión de ésta a estadios más severos. La disfunción alveolar de macrófagos está entre las características anormales más preponderantes en pacientes severos de COVID-19, generándose en estos pacientes una abundancia de macrófagos inflamatorios derivados de monocitos, sustituyendo a macrófagos residentes (Merad, M. & Martin, J. C., 2020). El extracto de *C. sativa* con un alto contenido de CBD presenta una actividad en el epitelio alveolar y en modelos celulares de macrófagos, disminuyendo la secreción en células epiteliales alveolares de IL-8 y IL-6, ambas

interleuquinas involucradas en la activación de la cascada de citoquinas proinflamatorias asociadas a pacientes con COVID-19. También, se observa un efecto de disminución en el reclutamiento de macrófagos a nivel alveolar, esta reducción se observó en extractos con alto contenido de CBD, con concentraciones mayores a 3 ug/mL, sugiriendo que existe una relación dependiente entre la dosis y su actividad antiinflamatoria (Gallily, R., *et al.*, 2015). El CBD, también actúa como un agente antioxidante, que interacciona a nivel de varios receptores incluyendo PPAR- γ , receptor 5-HT1A, receptor de adenosina A2A y TPRV1, ocasionando directa o indirectamente un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador. Al actuar sobre receptores de adenosina A2A, el CBD causó una marcada mejoría en la función pulmonar, mediante la disminución en la resistencia y elastancia pulmonar, debido a la reducción de la migración de leucocitos al pulmón acompañada por una inhibición en la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α e IL-6 y de las quimioquinas MCP-1/MIP-2/CXCL2 (Ribeiro, A., *et al.*, 2012; Ribeiro, A., *et al.*, 2015), toda esta acción potencial del CBD se presenta resumida en la figura 5.

El CBD y otros cannabinoides ejercen su actividad a través de la interacción con receptores PPARs, los cuales regulan la expresión de genes relacionados con la homeostasis de lípidos, glucosa y respuestas inflamatorias. El agonismo de PPAR- γ en macrófagos residentes alveolares, limita de manera significativa la inflamación y favorece la recuperación del huésped tras infecciones víricas respiratorias. También, es responsable del control de la excesiva secreción de citoquinas, obteniendo una mejora en tejidos dañados (Huang, S., *et al.*, 2019). Una administración de manera profiláctica de agonistas de PPAR- γ , mostró una reducción en la morbilidad y mortalidad durante la infección viral en la influenza A (Bassaganya-Riera, J., *et al.*, 2010) y también, se evidenció un efecto terapéutico en la inhibición de la replicación viral en diferentes tipos de virus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus respiratorio sincicial, hepatitis B y hepatitis C (Lowe, H., *et al.*, 2017).

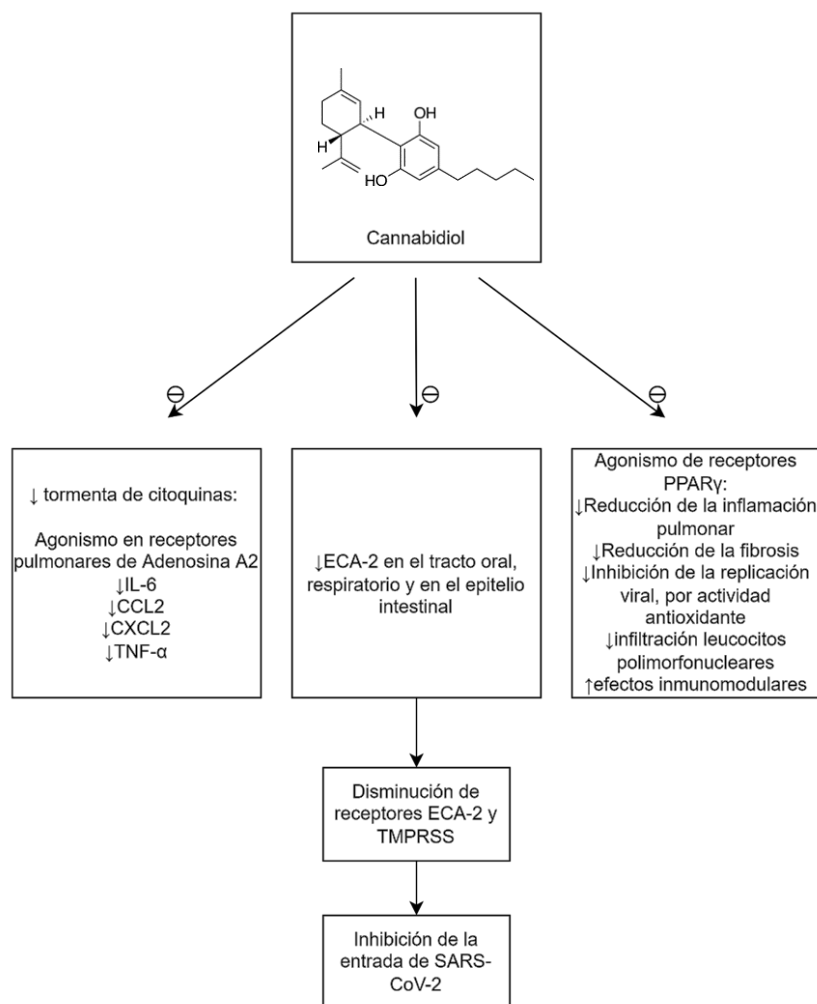


Figura 5. Potencial del cannabidiol (CBD) en SARS-CoV-2. El CBD reconoce varios objetivos de receptores y muestra una actividad inmunomoduladora multifacética que podría limitar la gravedad de la infección por SARS-CoV-2: regula a la baja los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2), la puerta de entrada del SARS-CoV-2. Por otro lado, se reduce la inflamación pulmonar, la fibrosis y la infiltración de leucocitos polimorfonucleares, a través del agonismo de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR- γ). Se presenta también disminución de la tormenta de citoquinas mediante la disminución de interlequina-6 (IL-6), ligando de quimioquina 2 CC (CCL2), ligando de quimioquina 2 CX (CXCL2) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Esposito, G., *et al.*, 2020).

3. Tratamiento de la materia vegetal

El material vegetal que será utilizado para la extracción y obtención de un extracto de *C. sativa* alto en CBD, será de quimiotipo III con alto contenido de CBD y cantidades mínimas de THC, esto a partir de la caracterización que realizaron Hilig & Mahlberg (2004) los cuales identificaron tres quimiotipos de plantas de *C. sativa* en función de la relación THC/CBD: una relación THC/CBD > 1 es característica de las plantas clasificadas como "tipo droga" (quimiotipo I), un relación THC/CBD cercana a 1 es para plantas "tipo intermedio" (quimiotipo II) y una relación THC/CBD < 1 es característica de las plantas "tipo fibra" (quimiotipo III). El material vegetal, en específico las inflorescencias se obtienen de forma fresca, por lo que es necesario un proceso de secado, reducción y uniformidad del tamaño de las partículas, y además, de un método de descarboxilación mediante un horno con temperatura y tiempo controlado.

3.1 Secado

Generalmente, el secado de las ramas con las inflorescencias se lleva a cabo con aireación en habitaciones cerradas colgadas boca abajo, con niveles de temperatura que oscilan entre 18 y 21 °C, humedad relativa del 50 al 55 % y circulación de aire con ventilador durante al menos 5 o 6 días y hasta 2 semanas. En los últimos años se han propuesto métodos de secado alternativos para ahorrar tiempo, reducir el riesgo de carga microbiana, mejorar la uniformidad y consistencia del producto. Entre estos se encuentran el microondas (MW) y la radiofrecuencia (RF), que no dependen de la conducción y la convección para entregar energía térmica como en el secado convencional. Más bien, las ondas electromagnéticas se transfieren directamente al producto calentándolo, proporcionando un calentamiento rápido, uniforme y volumétrico (Uziel, A., *et al.*, 2022). Algunos estudios, indican que esto se realiza aplicando calor volumétrico y creando un gradiente de temperatura y una frecuencia de microondas estándar establecida en

915 MHz y 240 W para mantener el cannabis medicinal de alta calidad (Al Ubeed, H., *et al.*, 2022)

3.2 Tamaño de partícula

Reducir el tamaño de partícula aumenta la eficiencia, ya que produce una mejora en la utilización del espacio presente en la interacción con el solvente y reduce la distancia necesaria para que el solvente penetre hasta el centro de la partícula. Una muestra no molida puede abarcar densidades de 100 a 125 g/L, mientras que una molida llega a densidades de 225 a 250 g/L.

En el trabajo de Roggen & Glauerbloz (2017), presentado en la figura 6. Se puede encontrar una comparación entre diferentes tamaños de partícula para la extracción de *C. sativa* bajo las mismas condiciones de presión y temperatura, estas partículas estaban entre 1 y 6 mm, tamaños superiores a este quedan fuera puesto que no se consideran efectivos para la extracción. Se concluye en la investigación que el mejor tamaño de partícula a utilizar es de 2 mm, ya que con este tamaño se permite operar con buena eficiencia la extracción. En otro estudio, Rovetto (2017) utiliza un tamaño de partícula de 1,216 mm, obteniendo rendimiento (g extracto/g alimentación) de hasta 19% y eficiencias de extracción de hasta 92% para las muestras estudiadas.

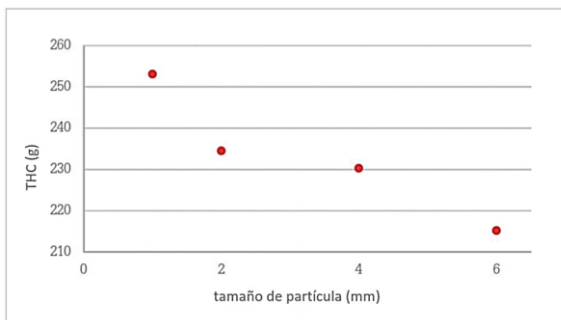


Figura 6. Impacto del tamaño de partícula en la eficiencia de extracción de un extracto de *C. sativa*. Eficiencia de extracción para diferentes tamaños de partículas. Todas las demás entradas son idénticas, por ejemplo, tipo de material, peso del material (2,0 kg) y parámetros de extracción, como temperatura (34 °C), presión (124 bar) y tiempo de ejecución (6 h). (Roggen, M. & Glauerbloz, B., 2017).

3.3 Descarboxilación

La descarboxilación, es un proceso que se realiza preferiblemente calentando el material vegetal a una temperatura definida durante un periodo de tiempo adecuado y definido también, esto, con el fin de convertir las formas ácidas de los cannabinoides, tales como el ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA), a su forma neutral el THC y CBD, los cuales son los encargados de las variadas propiedades medicinales asociadas a la *C. sativa*, como se evidencia en la figura 7. Para esto, se suministra calor o luz de manera controlada a la muestra vegetal. La descarboxilación de cannabinoides ácidos es una función del tiempo y la temperatura, así, a temperaturas más altas se tomará un periodo más corto de tiempo para la descarboxilación completa de una muestra de materia vegetal. En la selección de las condiciones apropiadas para la descarboxilación debe considerarse, sin embargo, la reducción mínima de la degradación térmica de cannabinoides y terpenos, deseables farmacológicamente en productos degradados indeseables. Preferiblemente, la descarboxilación se realiza en un procedimiento de calentamiento de múltiples etapas, en este caso divididas en dos en las cuales la materia vegetal es procesada de la siguiente forma:

1. Calentando a una primera temperatura durante un primer periodo de tiempo (relativamente corto) para evaporar el agua retenida, permitiendo así el calentamiento uniforme de la materia vegetal. Preferiblemente, la primera etapa se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 100°C a 110°C durante 10 a 20 minutos. Más preferiblemente, la primera temperatura será aproximadamente 105°C y el primer periodo de tiempo es aproximadamente 15 minutos.
2. La temperatura se aumenta a una segunda temperatura durante un segundo periodo de tiempo, hasta que haya ocurrido una conversión de al menos el 95% de ácidos cannabinoides en su forma neutra. Los tiempos óptimos y las temperaturas para la segunda etapa pueden variar según la naturaleza del material vegetal y más en particular, según el cannabinoide que se quiere

aislar desde la planta. Si la materia vegetal es derivada de una planta de *C. sativa* alta en CBD (definiendo alto como un porcentaje de cannabinoide CBD mayor a 90%) la segunda temperatura estaría preferiblemente en el rango de 115° C a 125° C, preferiblemente a 120° C, y el segundo periodo de tiempo está en el rango de 45 a 75 minutos, preferiblemente alrededor de 60 minutos.

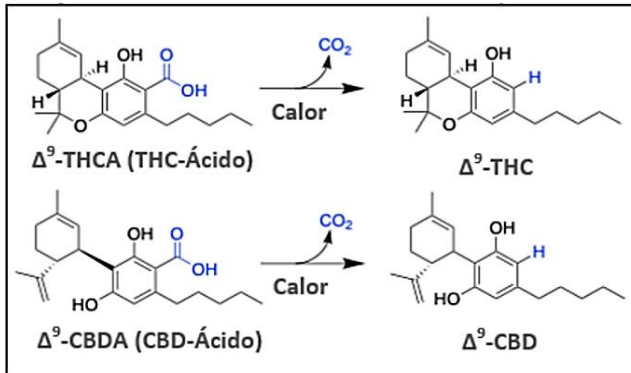


Figura 7. Proceso de descarboxilación de cannabinoides. Conversión de los cannabinoides desde sus formas ácidas a su forma neutra, como consecuencia de la pérdida de CO₂ en la estructura molecular por la aplicación de calor. MEDISENOL. The Science of Decarboxylation & Extraction. [En línea]

La descarboxilación demuestra un aumento en la obtención de cannabinoides neutros como el THC y CBD principalmente, en el estudio de Ribeiro *et al.* (2018), se realizaron dos estrategias para la extracción de aceite por CO₂ supercrítico, la primera consistió en descarboxilar la muestra antes de realizar la extracción, y la segunda en no descarboxilar, pero usar etanol como co-solvente en la extracción. Como se esperaba, la primera estrategia extrajo un orden de THC y CBD mucho mayor, en el orden de 5 a 10 veces más. A partir de estos resultados, se prefiere la descarboxilación antes de realizar la extracción si el objetivo es recuperar todos los cannabinoides activos posibles en su forma neutra, CBD principalmente.

4. Técnicas de extracción de cannabinoides

El proceso de extracción se utiliza normalmente con el fin de la obtención de compuestos activos objetivos a partir de materia vegetal compleja. En general, la metodología más adecuada para obtener un preparado medicinal debe seleccionarse de acuerdo con las propiedades y características del producto de interés. En gran parte de estas técnicas de extracción, se deben tener en cuenta factores relevantes a la hora de realizar una extracción, tales como la temperatura, la presión, el tiempo de extracción y la naturaleza del disolvente, parámetros que pueden modificar la selectividad y así aumentar la concentración de un compuesto específico que se extrae desde una matriz.

La extracción de fitoquímicos de *C. sativa* es un paso vital para separar las moléculas bioactivas de la matriz vegetal y para mejorar las diversas aplicaciones de estos compuestos en las industrias farmacéutica y alimentaria. La extracción, se puede realizar utilizando técnicas convencionales y avanzadas. Las eficiencias de los métodos convencionales y avanzados dependen principalmente de los parámetros críticos mencionados anteriormente. Por lo tanto, es necesario comprender la naturaleza de la matriz vegetal y la química de sus compuestos, con el fin de mejorar la eficiencia de extracción y reducir eficazmente los costos de extracción, así como también, tener extracciones amigables con el medio ambiente se torna algo trascendental a la hora de seleccionar una técnica extractiva (Al Ubeed, H., *et al.*, 2022). Algunas de las técnicas extractivas, las condiciones y procedimientos de extracción de cannabinoides desde la planta de *C. sativa*, se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplo de diferentes técnicas en la extracción de cannabinoides

| Técnica de extracción | Condiciones/procedimientos de extracción |
|---|---|
| Extracción con solvente | La materia vegetal (0,9-1,1 g) se tritura y se extrae en 45 ml de etanol durante 15 minutos con agitación a 400 rpm. Luego se centrifuga el extracto en un corto periodo de tiempo de 30 segundos a 2000 rpm. El sobrenadante se recoge y se filtra |
| Extracción con solvente | La materia vegetal se extrae en etanol a temperatura ambiente durante 45 minutos para obtener el extracto |
| Extracción con solvente | La muestra vegetal se extrae en una mezcla de hexano y etanol a 7:3 (v/v), se agita durante 45 minutos a 225 rpm en una incubadora con agitador orbital TU-400 a temperatura ambiente para obtener el extracto |
| Extracción Soxhlet | La materia vegetal seca y molida (2 g) se extrae con un extractor Soxhlet durante 1, 2 o 3 horas con 75 ml de n-hexano o metanol y luego se enfría a temperatura ambiente para obtener el extracto |
| Extracción asistida por ultrasonido (EAU) | La materia vegetal (0,25 g) se mezcla con 10 ml de etanol y luego se extrae 3 veces usando EAU a 40° C durante 15 minutos. Luego se filtra la solución a través de un filtro de papel para la obtención del extracto final |
| Extracción asistida por microondas | La materia vegetal se extrae con metanol y las siguientes condiciones: Potencia de microondas de 375 W, temperatura 109 °C y tiempo de extracción de 30 minutos |

(Al Ubeed, H., *et al.*, 2022; Chang, C. W., *et al.*, 2017)

4.1 Extracción con fluidos supercríticos

Esta técnica, se basa en la obtención de compuestos químicos a través de la utilización de un fluido supercrítico, el cual se entiende como cualquier sustancia que está a una temperatura y presión por encima de su punto crítico. Este fluido, tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Además, tiene la capacidad de cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades, le confieren la capacidad de extraer compuestos químicos con la utilización de determinados solventes específicos, bajo la combinación de una temperatura y presión específica.

Este proceso de extracción es de tipo sólido-líquido, el cual se realiza dentro de una cámara, donde el solvente está en condiciones supercríticas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, la mezcla soluto-solvente que sale de la cámara, es separada en un recipiente donde el soluto extraído es colectado en el fondo y el solvente es retirado como gas, debido al cambio de fase generado con la despresurización (Fathordoobady, F., *et al.*, 2019).

4.2 Efectos de la presión y temperatura en la extracción con fluidos supercríticos

La presión y la temperatura son los factores que toman mucha relevancia en la extracción con CO₂, estos parámetros, se pueden variar para alterar la selectividad del solvente hacia distintos componentes, sin embargo, los cannabinoides encontrados en la planta presentan diferentes solubilidades entre sí, y varían conforme se hacen cambios de temperatura y presión. Por lo general, la solubilidad aumenta en el orden CBD>THC, por lo que se requiere mayor presión para la extracción en muestras con alta cantidad de THC. Según Perrotin-Brunel *et al.* (2010), se explica este fenómeno debido a la composición química y peso molecular. Se presenta además, un efecto opuesto al aumentar la temperatura respecto a la solubilidad del THC, a presiones menores a 15 MPa, incrementar la

temperatura disminuye la densidad del CO₂, y por lo tanto disminuye la solubilidad de los cannabinoides, mientras que a presiones mayores a 15 MPa, el aumentar la temperatura, aumenta la volatilidad de los cannabinoides, y por lo tanto aumenta la solubilidad, este mismo efecto se puede esperar para el CBD a una presión diferente, dificultando la elección de condiciones óptimas para el proceso.

En general para el CBD los mejores resultados de extracción en este experimento se obtuvieron a las temperaturas intermedias entre 315 K y 334 K el autor explica esto como una transición en el equilibrio supercrítico de sólido a líquido, puesto que el punto de fusión del CBD se encuentra a 340 K, y posiblemente a 334 K se encuentre una fusión parcial, resultando con esto en una solubilidad menor. Por otro lado, se hace la comparación con la solubilidad del THC, el cual no es afectado por el fenómeno mencionado anteriormente, y su solubilidad aumenta conforme aumenta la temperatura.

5. Técnicas de cuantificación

Debido a la aparición y a la identificación de más de 100 cannabinoides distintos en la planta *C. sativa*, estos compuestos han sido determinados mediante técnicas cromatográficas utilizando diferentes métodos de detección. En general, los métodos cromatográficos más utilizados son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Cualquiera de estas dos técnicas puede ser utilizada para analizar y cuantificar los cannabinoides en el extracto final.

5.1 Determinación de cannabinoides mediante GC

La técnica de GC fue aplicada ya en 1963 por Davis *et al.*, con el fin de separar los cannabinoides, aunque la resolución obtenida no fuese la más próspera, durante esa época ya se vislumbró como las altas temperaturas conducían a un cambio en la estructura química de los cannabinoides, produciendo la pérdida del grupo carboxilo de los cannabinoides ácidos, por consiguiente, era muy difícil poder

separar a los cannabinoides desde su naturaleza ácida y su forma neutra, a menos que se realizara una derivatización previa. En el análisis de cannabinoides, es muy habitual el uso de un detector de ionización de llama (FID), éste, utiliza una llama de hidrógeno colocada al final de la columna cromatográfica, que descompone los compuestos orgánicos gaseosos a medida que entran en la llama. Esto, hace que los compuestos orgánicos se descompongan en sus cationes y electrones constituyentes, generando corriente entre dos electrodos colocados a cada lado de la llama. La cantidad de corriente generada en este proceso se usa para inferir el número de carbonos en la molécula.

Recientemente, un método de GC-FID, ha sido desarrollado por Ibrahim *et al.* (2018) para la cuantificación y determinación cannabinoides de carácter neutros y ácidos, principalmente los siguientes fitocannabinoides: CBD, THC, CBG, CBN, CBDA Y THCA. Este método envuelve la sililación de los extractos y expone una sensibilidad y reproducibilidades elevadas, presentando una idoneidad para el análisis de este tipo de moléculas.

Baranauskaite *et al.* (2020) publicó su investigación, la cual se basó en un método GC-FID, a través del cual no se requiere derivatización previa, pero a pesar de eso presenta la desventaja del tiempo de duración del cromatograma (30 minutos), a través de este procedimiento obtuvo la cuantificación de CBD y CBG.

En GC, la derivatización es una parte clave, debido a que muchos de los compuestos cannabinoides no son volátiles, el proceso de derivatización posibilita que los cannabinoides adquieran la condición de volatilidad para el análisis. En este contexto Cardenia *et al.* (2018) pudieron desarrollar y validar un método de GC-MS (espectrometría de masas acoplada al cromatógrafo de gases) para analizar cannabinoides, en esta investigación se probaron diferentes métodos de derivatización con el objetivo de evitar la descarboxilación de los cannabinoides. Mediante este proceso, se pudieron detectar y cuantificar cannabinoides, tales como CBN, CBD, CBDA, CBGA, CBG, THC, THCA. Cabe destacar también que se logró un análisis rápido de alta sensibilidad y robustez.

El GC-FID proporciona una cuantificación de cannabinoides más precisa, porque utiliza estándares auténticos relativamente baratos, mientras que la espectrometría de masas generalmente requiere estándares deuterados equivalentes, que son caros y no disponible para todos los cannabinoides (Pourseyed, M., *et al.*, 2020).

5.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)-UV/DAD/MS

Este análisis, se realiza para cuantificar y determinar la composición de cannabinoides en extractos obtenidos provenientes del material vegetal, mediante la utilización de estándares de las sustancias de interés. La “potencia” o concentración del material se expresa usualmente por el porcentaje total de cannabinoides neutros o ácidos presentes en la muestra (Rovetto, L. J., & Aieta, N. V., 2017).

Los métodos de detección comunes incluyen la espectroscopia de masas (MS) y la absorbancia ultravioleta (UV), que va desde 190 nm a 400 nm. Los cannabinoides ácidos muestran picos de absorción en alrededor de 270 nm y 310 nm, mientras que los cannabinoides neutros muestran picos de absorción en alrededor de 220 nm.

Se ha aplicado la técnica de HPLC asociado a un detector de matriz de fotodiodos (DAD), para identificar y cuantificar formas neutras y ácidas de los cannabinoides de *C. sativa*. Para ello, se utilizó una columna de C18 y una fase móvil metanol/agua con formiato de amonio (NH_4HCO_2) 50 mM ajustada a pH 5.2. La técnica, fue optimizada y ajustada con el fin de obtener condiciones analíticas apropiadas, puesto que la selectividad de los compuestos puede ser modificada mediante modificaciones de pH del eluyente. Mediante este análisis, se obtuvo una separación óptima de todos los cannabinoides, excepto THCA y CBG donde se presentó una superposición de los picos, como resultado del análisis mediante este método, se puede obtener un perfil cromatográfica completo en 36 minutos aproximadamente (De Backer, B., *et al.*, 2009).

Basado en la utilización de la técnica HPLC-UV/DAD, se usó como fase móvil agua (A) y ACN (B) ambos con 0,1% de ácido fórmico (CH_2O_2), para el análisis y cuantificación de cannabinoides en inflorescencias de la planta *C. sativa*. El gradiente de elución se inició con un 60% de ACN, seguido por un aumento gradual hasta el 90%. Se obtuvo con esto, un cromatograma completo en un tiempo aproximado de 30 minutos, obteniendo buenos resultados y robustez, por lo que es una herramienta muy útil para el análisis de cannabinoides (Brighenti, V., *et al.*, 2017).

HPLC en conjunto con espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), fue propuesto y utilizado por Aizpurua-Olaizola *et al.* (2014) para el análisis de cannabinoides desde extractos. Aquí se identificaron los compuestos cannabinoides después de su aislamiento cuantitativo a partir de su extracción mediante fluidos supercríticos. Los datos de regresión lineal múltiple revelaron que había factores significativos que afectan las áreas pico de análisis, como lo es la temperatura calentada del vaporizador y la presión del nebulizador. En este experimento, se cuantificaron seis cannabinoides principalmente: THCA, THC, CBDA, CBD, CBG y CBN. Para la separación de los cannabinoides se utilizó una columna C18, y la fase móvil consistió en un 0,1% de CH_2O_2 , tanto en agua como en metanol. Mediante este método se pudo registrar un perfil cromatográfico completo en 30 minutos.

6. Nitrito de amilo

El nitrito de amilo es un fármaco en solución de naturaleza orgánica que se utilizó inicialmente como agente terapéutico en el tratamiento de la angina de pecho en 1867, este, fue el primer donante de NO introducido por Sir Thomas Lauder Brunton en el tratamiento de pacientes con enfermedad arterial coronaria (Nossaman, V., *et al.*, 2010). Este compuesto orgánico volátil, tiene una vida media corta alrededor de 2 a 8 minutos y su mecanismo de acción se presenta mediante la enzima glutatión S-transferasa, la cual puede desnitrificar el compuesto orgánico de nitrato en el músculo liso y otras células. Una enzima mitocondrial, la aldehído deshidrogenasa isoforma 2 (ALDH2) y posiblemente su isoforma 3 (ALDH3), parecen ser clave en la activación y liberación de NO desde el nitrito de amilo. Otra de las enzimas que puede estar relacionada es la xantina oxidorreductasa que junto a su cofactor NADH, se activan en condiciones hipóxicas para la transformación de nitritos en NO (Millar, T. M., *et al.*, 1998). Como consecuencia de estos procesos metabólicos se produce la liberación del ion de nitrito libre, que luego se convierte a NO. El NO, se combina con el grupo hemo de la guanilil ciclasa soluble, activando esa enzima y provocando un aumento de guanosin mono fosfatocíclico (GMPc). La formación de GMPc representa un primer paso hacia la relajación del músculo liso, su efecto farmacológico más conocido (Lundberg, J., *et al.*, 2008).

6.1 Óxido nítrico y SARS-CoV-2

El NO es una molécula gaseosa de vida corta endógena, que actúa como una molécula de señalización en el cuerpo humano, esta molécula, es sintetizada por la acción de tres enzimas, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esta, juega un importante rol en varios procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo relajación del músculo liso, control de la vasodilatación, control de la neurotransmisión, control de la comunicación celular, citotoxicidad de microbios y

células tumorales mediado por macrófagos, además se le adjudican propiedades terapéuticas como efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios con funciones claves en la función vascular pulmonar. En el contexto de infecciones virales, el NO regula funciones inmunológicas importantes, induciendo la proliferación de linfocitos T y B, moderando la producción de citoquinas y la migración leucocitaria (Bogdan, C., 2001).

En pacientes graves de COVID-19, se ha visto un aumento en la cantidad de nitrato y nitrito (metabolitos de NO), esto, debido a que la activación de macrófagos, que a partir de un proceso inflamatorio pueden activar la iNOS produciendo niveles de 2 a 3 veces más altos de NO, causando un aumento a nivel local y sistémico de nitratos y nitritos. Aunque la infección que se produce a raíz del COVID-19 se centra en el epitelio bronquial y las células pulmonares tipo II, se ha detectado con tecnología de imágenes electrónicas, partículas virales en células endoteliales generándose la infección a este nivel celular, promoviendo un aumento de apoptosis y una disminución de producción de NO endotelial (Fang, W., *et al.*, 2021).

La proteína S del SARS-CoV-2 infecta a las células huésped a través de la unión con la ECA-2. Como resultado de esta unión, se produce una disminución en los productos ascendentes que promueve la ECA-2. Esta, es una enzima unida a la membrana y un contrarregulador endógeno de la cascada hormonal renina-angiotensina. Esta enzima, degrada la Ang II a Ang 1-7 que ejerce efectos beneficiosos, tales como vasodilatación, efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antifibróticos y antitrombóticos, opuestos a los efectos de la Ang II. La Ang 1-7 actúa a través del receptor acoplado a la proteína G MAS y, en menor medida, los receptores Ang II tipo 2 (AT2). ECA y ECA-2 y sus principales productos, Ang II y Ang 1-7, respectivamente, están vinculados en casi un proceso ying/yang, es decir, cuando uno disminuye, el otro aumenta y viceversa. Un desbalance de estas enzimas, debido a una mayor concentración de la ECA y disminución de la ECA-2, produce mayor riesgo y predisposición a mayor gravedad en la infección por COVID-19 (Rajendran, R., *et al.*, 2022).

6.2 NO, estrés oxidativo e inflamación

Se entiende como disfunción endotelial, la disminución de sustancias vasodilatadoras como por ejemplo el NO, teniendo como consecuencia una mayor abundancia de sustancias vasoconstrictoras. La disminución de la biodisponibilidad de NO puede deberse a la deficiencia de eNOS y/o también, a la descomposición o inactivación por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), como se observa en la figura 8. En estados patológicos, como el ataque viral, se producen ROS en exceso imposibilitando muchas veces la neutralización de estos por las especies antioxidantes, generándose un cuadro de estrés oxidativo que puede afectar de manera negativa la función celular y tisular.

Las citoquinas proinflamatorias, pueden activar la NADPH-oxidasa en las células endoteliales, lo que conlleva a un estrés oxidativo local, ante este estado oxidativo, las células endoteliales generan superóxido de dismutasa, glutatión peroxidasa y hemooxigenasa con el fin de neutralizar las especies reactivas. Se ha visto también, que el aumento de la Ang II y una disminución de Ang 1-7 puede causar estrés oxidativo. En el SARS-CoV-2, se ha visto una relación directa entre el estrés oxidativo y el aumento de la afinidad del virus con la ECA-2, llevando a la hipótesis que al producirse una disfunción mitocondrial y estrés oxidativo por el SARS-CoV-2, podría producirse una retroalimentación que promueve un estado persistente de inflamación y disfunción endotelial, debido a una activación persistente de NADPH-oxidasa, así como la producción de citoquinas inflamatorias.

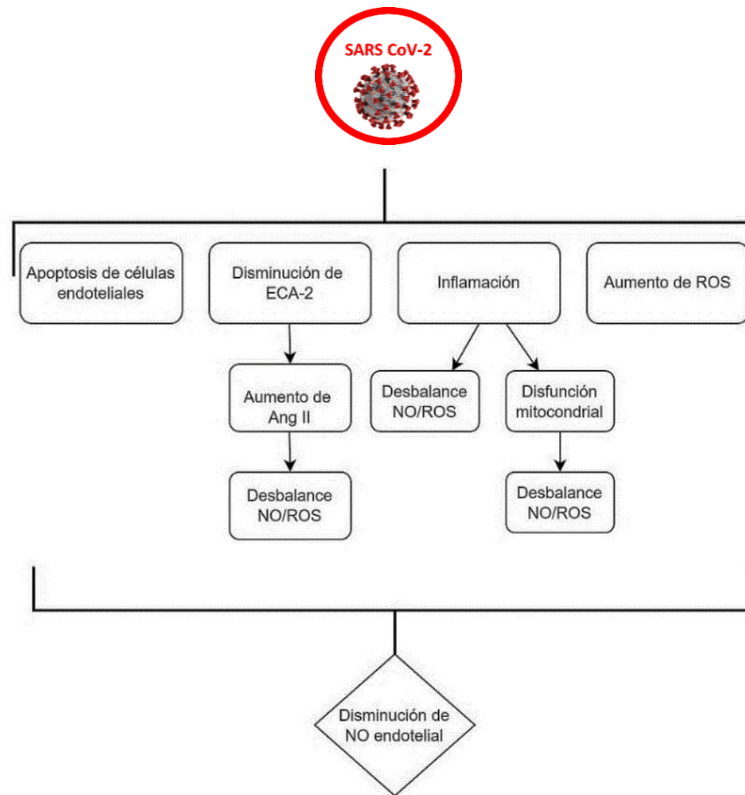


Figura 8. Posibles mecanismos en la etiología de COVID-19, que regulan los niveles y la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Efectos del SARS-CoV-2 a nivel del endotelio vascular y su repercusión en los niveles de NO, como producto de alteraciones que se producen a nivel vascular (Rajendran, R., et al., 2022). ROS: especies reactivas de oxígeno, Ang II: angiotensina II, ECA-2: enzima convertidora de angiotensina 2

6.3 Rol del NO en el sistema respiratorio

El papel del NO en el sistema respiratorio es de suma importancia, como se puede observar en la figura 9. Las células epiteliales sanas del seno paranasal expresan NOS y generan continuamente NO, el cual ingresa a las áreas profundas de los pulmones a bajas concentraciones a través del aire inhalado, produciendo dilatación a nivel bronquial y de las vías respiratorias, promoviendo así la absorción de oxígeno y actuando también, como un anticoagulante y agente antiplaquetario. Otra de sus funciones es a nivel de inflamación, inhibiendo la inmunidad inespecífica temprana modificando los eventos inflamatorios vasculares y la proliferación celular. También, el NO modula la actividad del movimiento ciliar y la secreción de

mucosidad, lo que puede aumentar la eliminación de partículas extrañas y partículas virales del tracto respiratorio.

El NO inactiva los virus modificando proteínas, ácidos nucleicos y proteasas que son esenciales para la replicación viral, mediante la S-nitrosilación en residuos de cisteína (Guimarães, L. M. F., *et al.*, 2021). En los seres humanos, se ha visualizado que niveles más altos de NO exhalado, se asocian con menos síntomas del resfrío común, lo que sugiere que el NO exhalado por la nariz representa uno de los mecanismos de defensa endógenos del cuerpo contra los virus de las vías respiratorias (Martel, J., *et al.*, 2020).

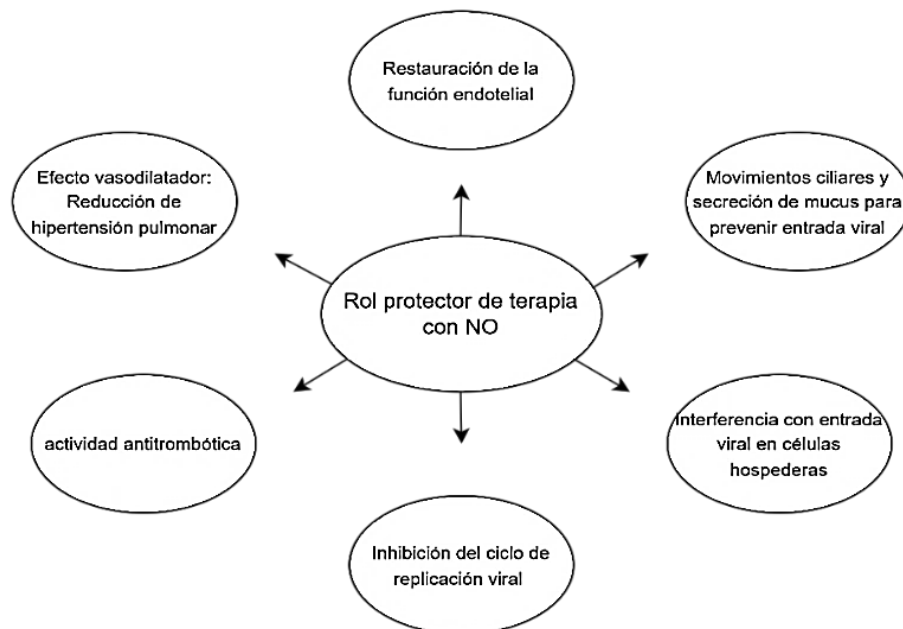


Figura 9. Actividad del NO como terapia en la mitigación del COVID-19 en el sistema respiratorio. Potenciales efectos positivos que se produce en el sistema respiratorio mediante la terapia con NO o con precursores de NO, se puede observar que existen diversas consecuencias fisiológicas que favorecen la protección de nuestro organismo ante los efectos del SARS-CoV-2. La interferencia con la entrada viral en las células y la inhibición del ciclo viral, demuestran el efecto antiviral de NO. Otros efectos importantes, se observan a nivel vascular del sistema respiratorio en la actividad antitrombótica, la restauración de la función endotelial y su efecto vasodilatador (Rajendran, R., *et al.*, 2022).

VI. Resultados y discusiones

1. Resultados de las principales investigaciones de CBD aislado y extractos en SARS-CoV-2 y COVID-19 desde el año 2020. Se resumen en tabla 3.

Tabla 3. Resumen de investigaciones del CBD en SARS-CoV-2 y COVID-19.

| Propiedad | Modelo | Conclusión | Referencia |
|--|---|--|-------------------------------------|
| Antiinflamatorio (Extracto alto en CBD) | Modelo de tejido artificial humano 3D (EpiDermFTTM) expuestos a rayos UV para inducir inflamación. | Se observó una disminución de la tormenta de citoquinas a través de la regulación de TNF- α e IL-6, además de efectos inhibitorios también de COX-2 y CCL2. | Kovalchuk, A., <i>et al.</i> , 2021 |
| Antiinflamatorio (Extracto alto en CBD, más CBG y THCV) | Línea celular de carcinoma de pulmón humano (A549). | Reducción dependiente de la dosis en la secreción de IL-6 e IL-8, además se redujo los niveles de expresión de CCL2 y CCL7. | Anil, S. M., <i>et al.</i> , 2021 |
| Antiinflamatorio (CBD puro) | Células Caco-2 tratadas con SARS-CoV-2. | Disminución de la actividad de la proteína S del SARS-CoV-2 por acción dependiente de PPAR- γ , inhibición de IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α . CBD reduce expresión de ECA-2. | Corpetti, C., <i>et al.</i> , 2021 |
| Antiinflamatorio (CBD puro) | Se utilizó ácido polirriboninosínico:polirribonitidílico [poli(I:C)] en modelo murino para simular el estado fisiopatológico de la enfermedad viral y los síntomas clínicos del SDRA. | Disminución de la tormenta de citoquinas, mediante la baja de IL-6, TNF- α e IFN- γ . | Khodadadi, H., <i>et al.</i> , 2020 |
| Antiinflamatorio (Extracto alto en CBD) | Modelos humanos artificiales 3D de tejidos orales, aéreos e intestinales. | Regulación a la baja de ECA-2 y TMPRSS2. | Wang, B., <i>et al.</i> , 2020 |
| Antiinflamatorio (CBD puro) | Ratones sometidos a lipopolisacáridos (LPS) para producir lesión pulmonar aguda. | Disminución de tormenta de citoquinas mediante la baja de TNF- α e IL-6, además disminución de CCL2 y CXCL2. | Ribeiro, A., <i>et al.</i> , 2015 |
| Antiviral (CBD puro) | Modelos 3D de células pulmonares con interacción entre CBD y la proteasa del SARS-CoV-2 M ^{Pro} . | Se observó una conformación estable en la región de unión con la proteasa, produciendo el bloqueo de traducción viral al inhibir SARS-CoV-2 M ^{Pro} . | Raj, V., <i>et al.</i> , 2021 |

| Propiedad | Modelo | Conclusión | Referencia |
|---|---|--|--|
| | | El CBD es una molécula antiviral más potente contra el SARS-CoV-2 comparada con los fármacos de referencia lopinavir, cloroquina y remdesivir. | |
| Antiviral (CBD puro) | Línea celular de carcinoma de pulmón humano (A549) que expresan ECA-2. | Inducción y regulación de la vía de señalización del interferón conduciendo a la degradación del ARN viral e inhibición de la inducción de citoquinas. | Nguyen, L. C., <i>et al.</i> , 2021 |
| Antiviral (CBD puro y su metabolito 7-OH-CBD) | Ratones hembra K18-hACE2 y células (A549) que expresan ECA-2. | el 7-OH-CBD inhibió eficazmente la replicación del SARS-CoV-2 en las células A549-ECA-2, no se observó toxicidad. En los ratones el CBD inhibió significativamente la replicación viral en los pulmones y los cornetes nasales el día 5 después de la infección de manera dependiente de la dosis. | Nguyen, L. C., <i>et al.</i> , 2022 |
| Antiviral (Solución de terpenos NT-VRL-1 junto a CBD) | Células MRC-5 fibroblastos pulmonares humanos tratadas con la cepa viral HCoV-229E <i>in vitro</i> . | Solución NT-VRL-1 con CBD potenció el efecto antiviral mejor que los controles positivos pirazofurina y glicirricina. | Chatow, L., <i>et al.</i> , 2021 |
| Antiinflamatorio (Extracto alto en CBD) | Ratones sometidos a LPS para producir lesión pulmonar aguda. | Reducción en los leucocitos, incluida la migración de neutrófilos a los pulmones y una disminución de los niveles de IL-1 β , CCL2, IL-6 y TNF- α , además de observarse un aumento en IL-10, una interleuquina antiinflamatoria. | Aswad, M., <i>et al.</i> , 2022 |
| Antiviral (Mezcla de terpenos y CBD) | líneas celulares humanas alveolares basales epiteliales, de colon, riñón y queratinocitos tratadas con SARS-CoV-2. | Se observó un efecto viricida, disminución de la proteína S del SARS-CoV-2, además de una disminución de expresión de ECA-2 y TMPRSS2. | Santos, S., <i>et al.</i> , 2022 |
| Antiviral (CBD puro) | Células HEK293 transfectadas con plásmidos de ácido [Poli(I:C)] que expresan el vector de control, <i>ORF8</i> , <i>ORF10</i> o proteína M. | Se encontró una reducción del número de células y un aumento de la apoptosis temprana y tardía cuando la expresión de genes virales se combinó con un tratamiento con CBD. | Fernandes, M. F., <i>et al.</i> , 2022 |

| Propiedad | Modelo | Conclusión | Referencia |
|---|---|---|---|
| Antiinflamatorio (CBD puro como inhalador de dosis media (CBD-MDI)) | Macrófagos alveolares (NR8383) y cocultivo de macrófagos alveolares (NR8383) y línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) | CBD-MDI redujo efectivamente la generación de citoquinas en células inmunes tratadas con antígeno viral S-RBD, antígeno bacteriano LPS, partículas de sílice y alquitrán de hulla. La eficacia de CBD-MDI fue comparable a la budesónida. | Srichana, T., <i>et al.</i> , 2022 |
| Antiinflamatorio (CBD oral 150 mg dos veces al día durante 14 días) | Pacientes mayores de 18 años con enfermedad crítica, definidos como individuos con insuficiencia respiratoria o neumonía que requieren ventilación mecánica. | Se espera que el tratamiento con CBD, para la infección pulmonar grave y crítica por COVID-19 presente un perfil óptimo en la reducción de citoquinas proinflamatorias y estimulación de citoquinas antiinflamatorias. | Kagan, I. & Yeshurun, M., 2021 ClinicalTrials.gov Identificador: NCT04731116. |
| Antiinflamatorio. Se analiza el perfil de seguridad y adherencia (MediCabilis: 50 mg/ml de CBD y 2 mg/ml de THC. 1 ml dos veces al día (dosis total 2 ml = 100 mg de CBD y 4 mg de THC) | Pacientes mayores de 18 años diagnosticados con COVID prolongado, confirmado por la clínica y diagnóstico del médico de cabecera o asistencia y evaluación por una clínica de COVID prolongado. | Se analiza la seguridad y tolerabilidad del CBD de espectro completo en el tratamiento de los síntomas asociados con el COVID prolongado: un estudio de viabilidad. | Iveson, E., 2022 ClinicalTrials.gov Identificador: NCT04997395. |
| Antiinflamatorio y antiviral (Gotas de aceite compuesta por CBD puro sintético) | Pacientes mayores de 18 años con COVID-19. | Se espera un efecto del CBD como terapia para la infección leve a moderada por SARS-CoV-2. Evaluación de Eficacia antiinflamatoria y antiviral, además del perfil seguridad. | Howard, A., 2022 ClinicalTrials.gov Identificador: NCT04686539 |
| Antiinflamatorio y protector de enfermedad cardiovascular (CBD producido farmacéuticamente con < 5 ppm de THC) | Pacientes mayores de 18 años. Hospitalizados por COVID-19, con o sin intervención de ventilación mecánica. Antecedentes de al menos 1) ECV [diagnósticos cardiovasculares, cerebrovasculares o vasculares | Prevención y acción coadyuvante del CBD en los síntomas de pacientes con enfermedad cardiovascular que den positivos a COVID-19. | McNamara, D., 2022 ClinicalTrials.gov Identificador: NCT04615949 |

| Propiedad | Modelo | Conclusión | Referencia |
|--|---|---|--|
| CardiolRx 2,5 mg/kg a 7,5 mg/kg de peso corporal dos veces al día por vía oral o placebo | periféricos], 2) Edad > 64, 3) Diabetes, 4) Hipertensión, 5) Lípidos séricos anormales, 6) Obesidad (IMC > o igual a 30 o circunferencia de cintura >102 cm [40"] para hombres y >88 cm [35"] para mujeres), 7) Actual fumador. | | |
| Antiinflamatorio y antiviral (CBD 300 mg al día, dos dosis de 150 mg: 1 ml de formulación o placebo) | Pacientes mayores de 18 años, con infección por SARS-CoV-2 confirmada en secreción de vías respiratorias altas o bajas, mediante transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), con manifestaciones leves o moderadas de COVID- 19. | Se espera 1) Disminuir la carga viral; 2) Modificar parámetros inflamatorios, tales como citoquinas medidas en suero; 3) Reducir los síntomas clínicos y emocionales a través de la evaluación clínica diaria; 4) Mejorar el sueño; 5) Reducir la hospitalización y la gravedad de la enfermedad; 6) Vigilar los posibles efectos adversos del uso de CBD en estos pacientes. | De Souza, J. A., 2021 ClinicalTrials.gov Identificador: NCT04467918 |

Los resultados obtenidos a partir de los diversos estudios, tanto en extractos de CBD, como en CBD puro, muestran un claro efecto positivo a nivel celular en el SARS-CoV-2 y COVID-19, encontrándose no solo un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador en el organismo, sino también un efecto a nivel de la viremia de la enfermedad, pudiendo disminuir principalmente la unión de este a los principales receptores donde interactúa el virus para comenzar su patogenia. Se observa a partir de la literatura, un efecto coadyuvante del CBD en la prevención y/o tratamiento ante las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2 en distintos cultivos celulares, animales y también, en estudios preclínicos y clínicos, así como su acción comparada con otras moléculas que poseen una respuesta a nivel fisiológico similar en las complicaciones ocasionadas por este virus.

2. Estudios clínicos activos desde octubre 2020 que utilizan NO para el tratamiento o la prevención de las complicaciones ocasionadas por el SARS-CoV-2. Se resumen en tabla 4.

tabla 4. Resumen de estudios clínicos de NO en SARS-CoV-2 y COVID-19.

| Estado del estudio | Droga utilizada | Vía administración | Objetivos | Resultados previstos |
|---------------------------------|-----------------|--------------------|---|--|
| En curso | NO | Inhalación | Medir la diferencia en el tiempo de tratamiento en pacientes con ventilador en SDRA. | Disminución en la duración del tratamiento continuo con ventilador del grupo tratado con óxido nítrico inhalado (iNO) en comparación con el grupo control. |
| En curso | NO | Inhalación | Evaluación clínica de iNO para pacientes con COVID-19, mediante valoración de criterios clínicos e imágenes (tomografía computarizada de alta resolución). | Mejora de los parámetros funcionales de las imágenes pulmonares, incluido el volumen de las vías respiratorias con imágenes, la resistencia de las vías respiratorias con imágenes y el volumen de los vasos sanguíneos. |
| En curso | NO | Inhalación | Evaluar la tasa de cambio en la oxigenación en pacientes con SDRA con ventilación mecánica. | Aumento de la oxigenación del grupo tratado con iNO en comparación con el grupo control. |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Evaluar la eficacia de iNO en la prevención de la desoxigenación sistémica y la inflamación, con escalada a niveles más altos de oxígeno y soporte ventilatorio o muerte. | Prevención de la progresión de la enfermedad (tiempo estimado: 28 días). El tratamiento se administrará hasta 14 días a menos que el paciente se deteriore y necesite una escala en su tratamiento. |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Evaluar la eficacia de 80 ppm de NO administrado cuatro veces al día, además de la atención estándar de cada paciente. | Aumento del tiempo hasta el deterioro de los síntomas respiratorios (tiempo estimado: 14 días) determinado por la escala a ventilación no invasiva, cánula nasal de alto flujo o intubación. |

| Estado del estudio | Droga utilizada | Vía de administración | Objetivos | Resultados previstos |
|---------------------------------|------------------------|------------------------------|---|---|
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Determinar si iNO mejora la oxigenación en pacientes con SDRA. | Mejora de la oxigenación arterial a las 48 horas desde la administración. |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Determinar si iNO mejora el estado respiratorio a corto plazo y previene futuras hospitalizaciones en pacientes diagnosticados con COVID-19, específicamente en salas de urgencia. | Disminución de la probabilidad de regresar a salas de urgencia con empeoramiento de los síntomas. |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Evaluar la eficacia de iNO pulsado versus placebo en sujetos con COVID-19 leve o moderada que están hospitalizados y requieren oxígeno suplementario sin ventilación asistida. | Disminución de la proporción de sujetos que mueren o sufren de insuficiencia respiratoria (tiempo estimado: 28 días). |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Evaluar si la administración intermitente de gas iNO en el aire a una dosis alta antes y después del turno de trabajo, puede proteger a los trabajadores de la salud de la infección de SARS-CoV-2. | Disminución del porcentaje de sujetos con diagnóstico de COVID-19 en el grupo de tratamiento. |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Evaluar la eficacia del NO en la actuación como agente antiviral, lo que resulta en la reducción de la incidencia de oxigenoterapia. | Reducción de la incidencia de ventilación mecánica durante el tratamiento con NO. |

| Estado del estudio | Droga utilizada | Vía de administración | Objetivos | Resultados previstos |
|------------------------------------|-----------------|--|---|---|
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Probar si la dosis alta de iNO es segura y puede revertir la carga viral y la insuficiencia respiratoria en pacientes con ventilación mecánica. | PCR COVID-19 negativo al finalizar el tratamiento (día 7) por aspirado traqueal. |
| En curso y reclutando pacientes | NO | Inhalación | Evaluar la eficacia de 150 ppm de NO administrado, además del estándar de atención de los pacientes con COVID-19. | Disminución del tiempo hasta el deterioro (hasta 14 días) para pacientes tratados con NO. |
| En curso y no reclutando pacientes | NO | Inhalación | Probar si la terapia con iNO previene la progresión de la enfermedad en pacientes con respiración espontánea con COVID-19 leve a moderado. | Reducción de la incidencia de pacientes que requieren intubación y ventilación mecánica. |
| En curso y reclutando pacientes | NORS | Gárgaras + aerosol nasal + enjuague nasofaríngeo | Evaluar la eficacia del tratamiento NORS para la prevención de las infecciones por SARS-CoV-2 en trabajadores sanitarios. | Disminución de la proporción de sujetos con COVID-19 positivo en grupo tratado con NORS frente al grupo control (tiempo estimado: 21 días). |
| En curso y reclutando pacientes | NORS | Inhalación con nebulizador | Evaluar la eficacia de NORS para reducir la tasa de progresión a un nivel más grave de COVID-19. | Aumento de la proporción de participantes con niveles seguros de saturación de oxígeno para el día 14, versus una atención estándar sin NORS. |
| Aún no se está reclutando | NORS | Aerosol nasal + irrigación nasal | Evaluar la eficacia de NORS para tratar y prevenir la exacerbación de las infecciones leves por COVID-19. | Reducción de los síntomas clínicos en comparación con placebo salino. |

SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda, iNO: óxido nítrico inhalado, NORS: solución liberadora de óxido nítrico. (Fuente: Lisi, F., *et al.*, 2021)

Según los resultados en base a los estudios que fueron analizados, cuando se administra a la población correcta y en la etapa correcta de la enfermedad, el tratamiento con NO exógeno puede ser una opción viable para los pacientes, siendo una alternativa fácil y poderosa en la administración pulmonar directa de NO gaseoso mediante inhalación. En catorce de estos estudios el tratamiento se basa en la inhalación de NO gaseoso, concentrados en la administración continua de dosis bajas de NO (30 ppm), mientras otros utilizan dosis altas del gas (300 ppm). Los tres estudios restantes se basan en el donante de NO nitrito de sodio, que se administra como un aerosol nasal, llamada solución liberadora de óxido nítrico (NORS), siendo estas estrategias posibles herramientas de mitigación del COVID19. La mayoría de los estudios que utilizaban NO inhalado, a la fecha han sido concluidos con resultados positivos frente al SARS-CoV-2 y sus complicaciones, dejando de manifiesto que el NO presenta acciones farmacológicas a nivel antiinflamatorio, inmunomodulador y antiviral. Además, se vio una mejoría en todos los síntomas clínicos que se producen al contraer el COVID-19 y una disminución importante en la progresión de la enfermedad, lo que confirma la utilización de NO o sustancias que aumenten los niveles de NO en SARS-CoV-2 y sus repercusiones. En cuanto a las soluciones NORS, siguen en estudios clínicos, aunque han avanzado en el número de su fase. Estos resultados abren la opción de desarrollar posibles tratamientos a través de esta vía, mediante la utilización de potenciadores de NO y/o sustancias liberadoras de NO, que se encuentren clínicamente autorizadas con el fin de administrar y mejorar los niveles de este en el organismo.

Más recientemente, se ha demostrado la combinación de NO con nanopartículas, un ejemplo claro ha sido el trabajo de donantes de NO unidos a nanopartículas de metal o metal/óxido, como el cobre (CuNPs), plata (AgNPs) y nanopartículas poliméricas. En un trabajo de magister se utilizó el nitrito de amilo en liposomas, poniendo de manifiesto el poder utilizar tecnología de nanopartículas en esta molécula (Natarajan, S., 2015). Las nanopartículas han traído como ventaja el poder modificar parámetros como la liberación, la solubilidad y la biodisponibilidad de NO, pudiendo mejorar o modificar terapias existentes.

3. Extracción seleccionada para protocolo

Se han realizado diferentes estudios basados únicamente en la aplicación de fluidos supercríticos para la extracción de cannabinoides y terpenos, encontrándose óptimos resultados en la obtención de extractos más puros y selectivos en un analito de interés. Aunque el coste de este tipo de procedimientos dificulta su uso a gran escala, ésta hace que la extracción sea más eficiente, lo que a largo plazo se traduce en una disminución en los costos a nivel industrial.

A continuación, en la tabla 5. y 6. Se presentan un resumen de trabajos y patentes encontradas en la literatura en relación a la extracción de cannabinoides y aceite esencial de *C. sativa*, utilizando CO₂ supercrítico y subcrítico.

Tabla 5. Extracción de cannabinoides a partir de diferentes condiciones de operación con fluidos supercríticos y subcríticos

| Condiciones de operación: Presión y temperatura | Disolvente de extracción | Gasto de CO ₂ |
|--|---|--------------------------|
| 128-249 bar; 50-70°C | CO ₂ supercrítico (0-6 % etanol) | 2,5 ml/min |
| 100-1300 bar; 50°C | CO ₂ supercrítico (0-5% etanol) | -- |
| 100-500 bar; 35-70°C | CO ₂ supercrítico | 2-3 L/min |
| 250-450 bar; 45°C | CO ₂ supercrítico | 7 kg/h |
| 170-340 bar; 55°C | CO ₂ supercrítico (25% etanol) | 200 g/min |
| 80-400 bar; 35-65°C | CO ₂ supercrítico | 35 g/min |
| 150-330 bar; 40-80°C | CO ₂ supercrítico (0-5% etanol) | 0,55 kg/h |
| 75-500 bar; 31-80°C | CO ₂ supercrítico | -- |
| 100-350 bar; 20-30°C | CO ₂ subcrítico | -- |
| 52-1723 bar; 15-200°C | CO ₂ supercrítico | -- |
| 55-65 bar; 8-12°C | CO ₂ subcrítico | -- |
| 30-49,9 bar; -5-10°C | CO ₂ subcrítico | -- |

(Baldino, L., *et al.*, 2020).

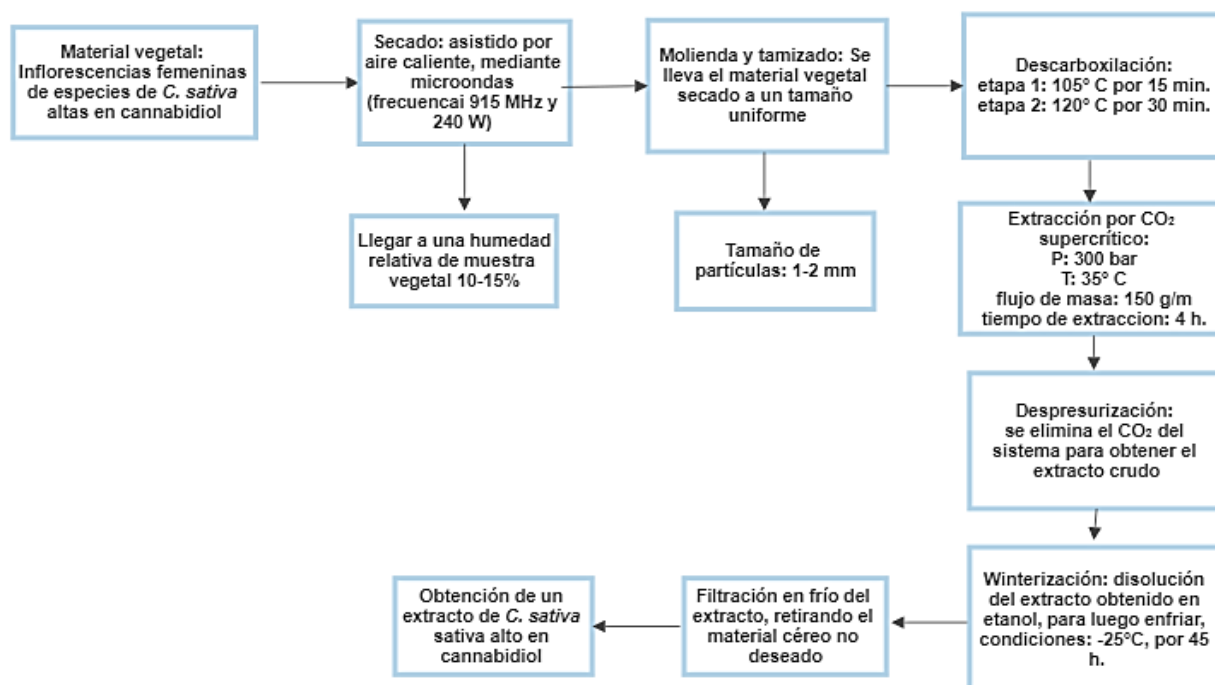
Tabla 6. Extracción de aceites esenciales a partir de diferentes condiciones de operación con fluidos supercríticos

| Condiciones de operación: Presión y temperatura | Disolvente de extracción | Gasto de CO ₂ |
|--|------------------------------|--------------------------|
| 80-90 bar; 45°C | CO ₂ supercrítico | -- |
| 100 bar; 35°C | CO ₂ supercrítico | 1ml/min |
| 100-140 bar; 40°C | CO ₂ supercrítico | 3kg/h |

(Baldino, L., *et al.*, 2020).

A continuación, en la figura 10. Se presenta el flujograma del protocolo propuesto para la obtención de un extracto de *C. sativa* alto en CBD. Las condiciones de operación fueron escogidas, luego de ser revisados los diferentes artículos sobre extracción con fluidos de CO₂, supercrítica y subcrítica, además a partir de la revisión se establecieron los parámetros, procesos y condiciones de operación para el desarrollo del extracto, así mismo se fijaron también los tratamientos previos y posteriores que se deben realizar a la materia vegetal y al extracto crudo.

Figura 10. Protocolo para el desarrollo del extracto de *C. sativa* alto en CBD



3.1 Proceso de obtención del extracto de *C. sativa* alto en CBD

El protocolo, como se puede observar en la figura 10. Comienza con la obtención del material vegetal de partida, las cuales son inflorescencias femeninas de especies de *C. sativa* alta en CBD (quimiotipo III), cosechadas y utilizadas de forma fresca. El primer tratamiento que se le entregará es el secado para llevar las flores a una humedad que oscile entre un 10 y 15%, esta acción, se realizará mediante aire caliente asistido por un microondas utilizando una frecuencia de 915 MHz y 240 W (Chang, C., *et al.*, 2021). Al obtener las inflorescencias secas de la muestra vegetal, se someten posteriormente a su molienda mediante un molino de cuchillas el cual lleve a un tamaño de partícula promedio de 1-2 mm, para lograr la uniformidad de tamaño se utiliza un tamizador con dicho tamaño de filtro. Las partículas obtenidas, se llevan a un horno para realizar el total secado de la materia vegetal y la posterior descarboxilación, esto se realiza en dos etapas, la primera llevando las partículas a 105°C por 15 minutos y una segunda etapa de calentamiento utilizando una temperatura de 120°C por 50 minutos, tiempo en el cual se llevarán los cannabinoides ácidos a su forma neutra, desde CBDA a CBD mayoritariamente. Obteniendo como resultado la materia vegetal descarboxilada y seca. Esta, se lleva al extractor donde este es alimentado por CO₂ supercrítico mediante condiciones de presión de 300 bar, 35°C y un flujo de masa de 150g/m, proceso el cual está estipulado en una duración de 4 horas, posteriormente se realiza el despresurizado, eliminando la alimentación de CO₂ al sistema, obteniéndose así el extracto crudo. Durante el proceso de extracción, el procedimiento no suele ser 100% selectivo al analito de interés, por lo que no solo se van a extraer cannabinoides, sino que también junto con esto se extraen ceras y otros compuestos que pueden interferir en la calidad final del extracto, por lo que el extracto obtenido se somete al proceso de winterización, mediante la adición de 10 ml etanol por cada gramo de extracto, llevando este a congelación a una temperatura de -25°C por 45 horas, precipitando así impurezas en el extracto crudo final principalmente lípidos, grasas y ceras. Posteriormente, se realiza filtrado en frío con filtro de 20 mm, obteniendo un extracto de mayor pureza. El extracto obtenido,

se lleva a 70°C para la evaporación del etanol. Obteniendo finalmente un extracto de *C. sativa* alto en CBD para su análisis cuantitativo.

Tabla 7. Etapas del proceso y condiciones de operación del protocolo de extracción de *C. sativa*

| ETAPAS DEL PROCESO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN | CONDICIONES |
|---|---|
| PRESIÓN PARA EXTRACCIÓN | 300 bar |
| DESCARBOXILACIÓN | 120°C por 50 minutos |
| TEMPERATURA PARA EXTRACCIÓN | 35°C |
| TAMAÑO DE PARTICULA | 1-2 mm |
| WINTERIZACIÓN | 10 mL de etanol por gramo de extracto. -25°C por 45 horas Filtración y posterior evaporación a 70°C |

3.2 Proceso de análisis y cuantificación del extracto de *C. sativa* alto en CBD

Una vez obtenido el extracto purificado se somete a un proceso de análisis y cuantificación para la obtención de la concentración de CBD en el extracto. Para este proceso, se propone realizar el análisis mediante GC, ya que es un método cromatográfico empleado con frecuencia para separar, identificar y cuantificar los compuestos constituyentes de una muestra mediante vaporización a la fase gaseosa. Para el análisis y cuantificación del extracto obtenido, se escogió el protocolo propuesto por Baranauskaite *et al.* (2020), el cual se muestra en la tabla 9. La caracterización se realizó utilizando GC-FID con un programa de temperatura de columna que comenzó a 80°C durante 1 minuto, que luego se incrementó a 250°C a una velocidad de 10°C/min, luego a 310°C a una velocidad de 30°C/min y se mantuvo constante durante 7 minutos. Se utilizó helio como gas portador a un caudal de 1,0 mL/min. El tiempo total de análisis es de 30 minutos. Las temperaturas del inyector y del detector se mantienen a 290°C y 330°C, respectivamente. Se inyectó un volumen de 1 µL de las muestras para cromatografía en modo dividido (1:10). Se realizaron tres inyecciones para cada muestra.

Tabla 8. Condiciones de análisis del extracto de *C. sativa* alto en CBD

TÉCNICA DE ANÁLISIS GC-FID

| | |
|---|--|
| PROPIEDADES DE LA COLUMNA CAPILAR | Columna capilar Rxi-5 MS (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interior y espesor de película de 0,25 µm) |
| RESUMEN CONDICIONES DE ANÁLISIS | Temperatura inicial de 80 °C y temperatura final de 310 °C. Volumen inyectado: 1 µl a 290 °C. |
| TIPO DE GAS | Helio |
| CANNABINOIDES QUE SERÁN ANALIZADOS | CBD |

3.3 Formulación de la solución compuesta por un extracto de *C. sativa* alto en CBD junto a amil nitrito

Luego de ser analizado el extracto de *C. sativa* alto en CBD, se estandariza de manera de encontrar en 1 ug/mL concentraciones de CBD sobre 35% y menos de 0,3 % de otros cannabinoides. se procede a establecer las dosis a las que se utilizaría en la solución. A partir de los diferentes estudios que fueron analizados las dosis utilizadas a nivel celular se encontraban en rangos entre 1 µM - 10 µM aproximadamente para distintos cultivos celulares y epitelios. En otro estudio se trabajó con concentraciones *in vitro* de entre 3 ug/mL- 7 ug/mL. En el caso del artículo con la forma farmacéutica en inhalador de dosis media presurizado, las dosis utilizadas fueron 250 ug/dosis para su efecto inmunomodulador. Otra de las dosis mencionadas en los estudios, son las dosis utilizadas in vivo, por ejemplo, en ratones estas fluctuaron entre 20 mg - 80 mg vía intranasal, encontrado resultados antivirales prósperos. Mientras las dosis orales utilizadas en pacientes fluctúan entre 100 mg - 300 mg por día, con el fin de observar mejoras en los diferentes parámetros producidos por el COVID-19.

Las dosis del nitrito de amilo no se han estudiado, ni determinado en una acción antiviral ni antiinflamatoria, pero se podría realizar soluciones con dosis que

varíen a partir de dosis que han sido administradas para otro tipo de patologías con el fin de obtener efectos en los niveles de NO. En cuanto a las dosis que se utilizaban de manera inhalatoria mediante la inhalación de vapores para producir cambios en los niveles de NO en pacientes con angina de pecho, se les administraba nitrito de amilo en ampollas de 0,3 ml que contenían una dosis aproximada de 200 mg - 300 mg. En relación con la utilización de nitrito de amilo en un estudio *in vitro* en formulación de liposomas sus concentraciones fueron 4,5 mM, 18 mM y 38 mM para obtener acciones farmacológicas según sus distintos mecanismos de acción

En el caso de la solución propuesta, la combinación de efectos farmacológicos en entre los dos compuestos activos, el perfil terpenos del extracto y el efecto sequito que tiene este con el CBD, se propone estudiar dosis relativamente más bajas que las que se presentan anteriormente. Se propone trabajar primeramente *in vitro* con combinaciones de dosis de extracto de *C. sativa* alto en CBD que comiencen desde 2 ug/mL - 5 ug/mL, en conjunto con nitrito de amilo en concentraciones que comiencen entre 4 mM - 50 mM diluidas en medio etanólico, de manera de establecer primeramente si se presenta un efecto positivo en el SARS-CoV-2 y establecer posible toxicidad en las distintas concentraciones. Luego de obtener posibles resultados prósperos y establecer dosis estándares para utilización *in vivo*, la utilización se recomendaría de manera inhalatoria, para establecer dosis que puedan ser utilizadas de manera local en las vías respiratorias.

VII. Conclusiones

1.

Teniendo en cuenta todos los estudios realizados sobre las respuestas inmunitarias y la inflamación en SARS-CoV-2 y COVID-19, los datos demuestran de manera clara que el CBD y extractos de *C. sativa* con concentraciones sobre 35% de CBD presentan efectos farmacológicos como inmunosupresor, antiinflamatorio y potenciales efectos antivirales. Los objetivos críticos de supresión a nivel inmunológico incluyen citoquinas, como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 y quimioquinas, como CCL2 y CXCL2. El mecanismo general del CBD implica la supresión directa de las células diana, como las células T efectoras y las células microgliales, a través de la supresión de las cascadas de quinasas y varios factores de transcripción. Además, también se observa un efecto directo en la disminución de la unión entre la ECA-2 con la proteína S del SARS-CoV-2. Concluyentemente sería un medio de tratamiento para paciente, que sean portadores del virus.

Hasta el momento las vacunas son la única forma de contrarrestar los síntomas que produce el COVID-19, pero es importante encontrar complementos terapéuticos para tratar a los pacientes, que ya se encuentran afectados por la infección por SARS-CoV-2.

2.

En cuanto al nitrito de amilo no se ha encontrado información bibliográfica sobre su uso como agente coadyuvante en la prevención y/o tratamiento en SARS-CoV-2, debido a que no se encontró bibliografía este tipo de donantes o precursores de óxido nítrico. A pesar de esto, existe una relación entre el óxido nítrico y el SARS-CoV-2, encontrándose que a menudo la producción endógena de NO parece tener un efecto antiviral contra los virus respiratorios humanos. En tanto, se concluye, que el NO tanto endógeno como exógeno demuestra potencial para el tratamiento de pacientes infectados con COVID-19, tanto en condiciones graves como no graves,

a través de la mejora en la oxigenación y los mecanismos antivirales, previniendo también, el agravamiento de la enfermedad. Se constata, que, a niveles menores de NO, la administración externa directa o mediante donantes de NO, puede tener un efecto beneficioso interrumpiendo el progreso de la enfermedad hacia estadios más severos de esta. No se han realizado estudios con este tipo de donantes de NO (nitrito de amilo), pero se han utilizado otro tipo de donantes, como lo es la S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), un S-nitrosotiol sintético, que ha demostrado inhibir *in vitro* la replicación de los virus de la influenza A, el dengue, el herpes, VIH, el SARS-CoV y el SARS-CoV-2. Se ha visto que, en modelos de enfermedades pulmonares, el NO ha demostrado el potencial antiinflamatorio y antiviral, a través de la S-nitrosilación de residuos de cisteína, que son claves en la replicación del virus y también en la activación de enzimas, que activan vías de señalización de mediadores inflamatorios, esto queda de manifiesto en la serie de estudios clínicos y preclínicos que se realizan con NO o con NORS como tratamiento y/o prevención de COVID-19.

3.

Se concluye que, a partir de la información recopilada en base a la búsqueda bibliográfica, se establecen las bases para la propuesta del protocolo para la formulación de la solución propuesta y las conclusiones obtenidas referente a la información sobre la acción positiva que tiene el uso de extractos de *C. sativa* altos en CBD, como también el uso de CBD aislado y la utilización de NO a nivel fisiológico en SARS-CoV-2. Se concluye, que el protocolo establecido para la formulación de la solución constituida por un extracto de *C. sativa* alto en CBD, junto a nitrito de amilo estandarizado, puede ser probado con el fin de obtener resultados prácticos a fin de confirmar los mecanismo de acción como agente coadyuvante en la prevención y/o tratamiento ante las complicaciones que produce el SARS-CoV-2, que se presenta a partir de la literatura revisada. Se establece en base a estos resultados, que sería interesante y necesario, seguir la investigación *in vitro*, *in vivo* y clínica de la solución propuesta si esta diese resultados positivos en cada tipo de

prueba. Esta podría ser revisada en las etapas en las diferentes etapas de estudio y dilucidando así los mecanismos de acción involucrados de la solución propuesta.

Según los mecanismos de acción revisados en los distintos artículos y la posible acción farmacológica de la solución, esta se podría utilizar en pacientes adultos que se encuentren en estadios tempranos de la infección, con el fin de disminuir la carga viral (viremia) y reducir la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias, evitando así las complicaciones que se puedan producir a raíz del virus.

La solución, si se encontrarán resultados prósperos en las diferentes etapas de la investigación, podría utilizarse para la formulación de un inhalador de dosis media presurizada con la dosis determinadas de ambos activos de la solución, como por ejemplo la propuesta del inhalador de dosis media presurizada encontrado en la literatura con el CBD como componente activo, utilizando etanol como disolvente y la utilización de propulsores, que puedan administrar dosis a la cuales no se produzcan reacciones adversas o de toxicidad.

VIII. Bibliografía

1. Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(29), 7549–7560.
2. Alcaíno, C. S. (2019). *Cannabis Medicinal En Chile: Los Pacientes como delincuentes*. [Tesis para optar al título de Periodista]. Escuela de periodismo, universidad Academia de Humanismo Cristiano.
3. Al Ubeed, H., Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Basu, A., & Vuong, Q. V. (2022). A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 604.
4. Anil, S.M., Shalev, N., Vinayaka, A.C. et al. (2021). Cannabis compounds exhibit antiinflammatory activity in vitro in COVID-19-related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages. *Sci Rep* 11, 1462.
5. Asim K. Duttaroy, (2021). *Health effects of terpenoids, Evidence-Based Nutrition and Clinical Evidence of Bioactive Foods in Human Health and Disease*, Academic Press, 413-424.
6. Aswad M, Hamza H, Pechkovsky A, Zikrach A, Popov T, Zohar Y, Shahar E and Louria-Hayon I. (2022). High-CBD Extract (CBD-X) Downregulates Cytokine Storm Systemically and Locally in Inflamed Lungs. *Front. Immunol.* 13:875546.
7. Baldino, L., Scognamiglio, M., & Reverchon, E. (2020). Supercritical fluid technologies applied to the extraction of compounds of industrial interest from *Cannabis sativa* L. and to their pharmaceutical formulations: A review. In *Journal of Supercritical Fluids (Vol. 165)*.
8. Baranauskaite, J., Marksa, M., Ivanauskas, L., Vitkevicius, K., Liaudanskas, M., Skyrius, V., & Baranauskas, A. (2020). Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in Cannabis

- sativa L. spp. santicha (hemp). *Phytochemical analysis : PCA*, 31(4), 516–521.
9. Bassaganya-Riera, J., Song, R., Roberts, P. C., & Hontecillas, R. (2010). PPAR- γ activation as an anti-inflammatory therapy for respiratory virus infections. *Viral Immunology*, 23, 343–352.
 10. Bogdan C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907–916.
 11. Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., & Benvenuti, S. (2017). Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 143, 228–236.
 12. Cardenia, V., Toschi, T. G., Scappini, S., Rubino, R. C., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2018). Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *Journal of food and drug analysis*, 26(4), 1283–1292.
 13. Chang, C. W., Yen, C. C., Wu, M. T., Hsu, M. C., & Wu, Y. T. (2017). Microwave-Assisted Extraction of Cannabinoids in Hemp Nut Using Response Surface Methodology: Optimization and Comparative Study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 1894.
 14. Chatow, L., Nudel, A., Neshet, I., Hayo Hemo, D., Rozenberg, P., Voropaev, H., Winkler, I., Levy, R., Kerem, Z., Yaniv, Z., & Eyal, N. (2021). In Vitro Evaluation of the Activity of Terpenes and Cannabidiol against Human Coronavirus E229. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(4), 290.
 15. Chen, C., Wongso, I., Putnam, D., Khir, R., & Pan, Z. (2021). Effect of hot air and infrared drying on the retention of cannabidiol and terpenes in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 172 (September), 114051.
 16. Corpetti, C., Del Re, A., Seguella, L., Palenca, I., Rurgo, S., De Conno, B., Pesce, M., Sarnelli, G., & Esposito, G. (2021). Cannabidiol inhibits SARS-Cov-2 spike (S) protein-induced cytotoxicity and inflammation through a

- PPAR γ -dependent TLR4/NLRP3/Caspase-1 signaling suppression in Caco-2 cell line. *Phytotherapy Research*, 35(12), 6893–6903.
17. COVID-19 *map*. (s/f). Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. [Visitado el 17 de febrero de 2023] <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
18. Davis, T. W. M., Farmilo, C. G., Osadchuck, M. (1963). Identification and Origin Determinations of Cannabis by Gas and Paper Chromatography. *Anal. Chem.* 35, 6, 751-755.
19. De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Verstraete, A., Hubert, P., & Charlier, C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877(32), 4115–4124.
20. De Souza, J.A. (2021). NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (INH) US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, CLINICAL TRIALS. Centro Médico Serviço de Assistência Médica e Social do Pessoal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, Brasil [en línea] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04686539> [consulta 10 octubre 2022]
21. Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, 34(5), 605–613.
22. Errecalde, J. O.; Eddi, C.S.; Marin, G. H. (2020); Covid-19: Etiología, Patogenia, Inmunología, diagnóstico y tratamiento; Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Médicas; 114
23. Esposito, G., Pesce, M., Seguella, L., Sanseverino, W., Lu, J., Corpetti, C., & Sarnelli, G. (2020). The potential of cannabidiol in the COVID-19 pandemic. *British journal of pharmacology*, 177(21), 4967–4970.

24. Fang, W., Jiang, J., Su, L., Shu, T., Liu, H., Lai, S., Ghiladi, R. A., & Wang, J. (2021). The role of NO in COVID-19 and potential therapeutic strategies. *Free radical biology & medicine*, 163, 153–162.
25. Fathordoobady, F., Singh, A., Kitts, D. D., & Pratap Singh, A. (2019). Hemp (Cannabis Sativa L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Reviews International*, 35(7), 664–684.
26. Fernandes, M. F., Chan, J. Z., Hung, C., Tomczewski, M. V., & Duncan, R. E. (2022). Effect of cannabidiol on apoptosis and cellular interferon and interferon-stimulated gene responses to the SARS-CoV-2 genes ORF8, ORF10 and M protein. *Life sciences*, 301, 120624.
27. Fernández-Pérez, G. C., Oñate Miranda, M., Fernández-Rodríguez, P., Velasco Casares, M., Corral de la Calle, M., Franco López, Á., Díez Blanco, M., & Cuchat, J. (2021). SARS-CoV-2: cómo es, cómo actúa y cómo se expresa en la imagen. *Radiología*, 63(2), 115–126.
28. Gallily, R., Yekhtin, Z. & Hanuš, L. O. (2015). Overcoming the bell-shaped dose-response of cannabidiol by using cannabis extract enriched in cannabidiol. *Pharmacol. Pharm.* 6, 75.
29. Guimarães, L. M. F., Rossini, C. V. T., & Lameu, C. (2021). Implications of SARS-Cov-2 infection on eNOS and iNOS activity: Consequences for the respiratory and vascular systems. *Nitric Oxide*, 111–112, 64–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.04.003>
30. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12), 1100–1115.
31. Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American journal of botany*, 91(6), 966–975.
32. Howard, A. (2022). NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (INH) US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, CLINICAL TRIALS. Centro Médico Sheba, Tel Hashomer, Tel Aviv, Israel [en línea]

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04686539> [consulta 10 octubre 2022]

33. Huang, S., Goplen, N. P., Zhu, B., Cheon, I. S., Son, Y., Wang, Z., Sun, J. (2019). Macrophage PPAR- γ suppresses long-term lung fibrotic sequelae following acute influenza infection. *PLoS ONE*, 14(10), e0223430.
34. Ibrahim, E. A., Gul, W., Gul, S. W., Stamper, B. J., Hadad, G. M., Abdel Salam, R. A., Ibrahim, A. K., Ahmed, S. A., Chandra, S., Lata, H., Radwan, M. M., & ElSohly, M. A. (2018). Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of *Cannabis sativa* Using GC-FID. *Planta médica*, 84(4), 250–259.
35. Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An update on safety and side effects of cannabidiol: A review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2, 139–154.
36. Ivenson, E. (2022). NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (INH) US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, CLINICAL TRIAL. ciencia de las drogas, York, Reino unido [en línea] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04997395> [consulta: 10 de octubre 2022]
37. Janecki, M., Graczyk, M., Lewandowska, A. A., & Pawlak, Ł. (2022). Anti-Inflammatory and Antiviral Effects of Cannabinoids in Inhibiting and Preventing SARS-CoV-2 Infection. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4170.
38. Juergens, U. R., Engelen, T., Racké, K., Stöber, M., Gillissen, A., & Vetter, H. (2004). Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 17(5), 281–287.
39. Kagan, I. & Yeshurun, M. (2021). NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (INH) US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, CLINICAL TRIALS. Centro Médico Rabin, Israel, [en línea] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04731116> [consulta: 12 de octubre 2022].

40. Kovalchuk, A., Wang, B., Li, D., Rodriguez-Juarez, R., Ilnytsky, S., Kovalchuk, I., & Kovalchuk, O. (2021). Fighting the storm: could novel anti-TNF α and anti-IL-6 *C. sativa* cultivars tame cytokine storm in COVID-19? *Aging*, 13(2), 1571–1590.
41. Kratz, J., García de Palau, M., Peguero, B., & Parés, J. (2018). *Manual sobre cannabis medicinal (Primera Ed)*. Barcelona, España: Kalapa Clinic S.L.
42. Khodadadi, H., Salles, É. L., Jarrahi, A., Chibane, F., Costigliola, V., Yu, J. C., Vaibhav, K., Hess, D. C., Dhandapani, K. M., & Baban, B. (2020). Cannabidiol Modulates Cytokine Storm in Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Simulated Viral Infection Using Synthetic RNA. *Cannabis and cannabinoid research*, 5(3), 197–201.
43. Legare, C. A., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2022). Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107(3-4), 131–149.
44. Ligresti, A., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiological reviews*, 96(4), 1593–1659.
45. Lisi, F., Zelikin, A. N., & Chandrawati, R. (2021). Nitric Oxide to Fight Viral Infections. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 8(7), 2003895.
46. Lowe, H. I., Toyang, N. J., & McLaughlin, W. (2017). Potential of cannabidiol for the treatment of viral hepatitis. *Pharmacognosy Research*, 9(1), 116–118.
47. Lundberg, J. O. & Govoni, M. (2004) Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 395–400.
48. Martel, J., Ko, Y. F., Young, J. D., & Ojcius, D. M. (2020). Could nasal nitric oxide help to mitigate the severity of COVID-19?. *Microbes and infection*, 22(4-5), 168–171.
49. McNamara, D., (2022). NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (INH) US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, CLINICAL TRIALS, *Cardiol therapeutics, Brasil, México, Estados Unidos [en línea]*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04615949?term=cannabidiol&cond=covid-19&draw=2&rank=3> [consulta: 12 de octubre 2022].

50. Mahmud, M. S., Hossain, M. S., Ahmed, A., Islam, M. Z., Sarker, M. E., & Islam, M. R. (2021). Antimicrobial and Antiviral (SARS-CoV-2) Potential of Cannabinoids and Cannabis sativa: A Comprehensive Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(23), 7216.
51. MEDISENOL. The Science of Decarboxylation & Extraction. [En línea]; [Consultado en: 03 de abril de 2022] Disponible en: <https://www.medisenol.com/science-of-extraction>
52. Merad, M. & Martin, J. C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: A key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 355–362.
53. Millar, T. M., Stevens, C. R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R., & Blake, D. R. (1998). Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Letters*, 427(2), 225–228.
54. Ministerio de salud de Chile, casos confirmados en Chile COVID-19 (2022) [en línea] <https://www.minsal.cl/nuevo-coronavirus-2019-ncov/casos-confirmados-en-chile-covid-19/> [Consultada 17 de febrero 2023]
55. Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61–65.
56. Nguyen, L. C., Yang, D., Nicolaescu, V., Best, T. J., Ohtsuki, T., Chen, S. N., Friesen, J. B., Drayman, N., Mohamed, A., Dann, C., Silva, D., Gula, H., Jones, K. A., Millis, J. M., Dickinson, B. C., Tay, S., Oakes, S. A., Pauli, G. F., Meltzer, D. O., Randall, G., ... Rosner, M. R. (2021). Cannabidiol Inhibits SARS-CoV-2 Replication and Promotes the Host Innate Immune Response. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2021.03.10.432967.
57. Nguyen, L. C., Yang, D., Nicolaescu, V., Best, T. J., Gula, H., Saxena, D., Gabbard, J. D., Chen, S.-N., Ohtsuki, T., Friesen, J. B., Drayman, N., Mohamed, A., Dann, C., Silva, D., Robinson-Mailman, L., Valdespino, A., Stock, L., Suárez, E., Jones, K. A., ... Rosner, M. R. (2022). Cannabidiol

- inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. *Science Advances*, 8(8).
58. Nossaman, V. E., Nossaman, B. D., & Kadowitz, P. J. (2010). Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. *Cardiology in review*, 18(4), 190–197.
59. Oliva Marin, J. E. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta*; 3 (2):79-86
60. Parks, J. M., & Smith, J. C. (2020). How to Discover Antiviral Drugs Quickly. *New England Journal of Medicine*, 382(23), 2261–2264.
61. Perrotin-Brunel, H., Kroon, M. C., Van Roosmalen, M. J. E., Van Spronsen, J., Peters, C. J., & Witkamp, G. J. (2010). Solubility of non-psychoactive cannabinoids in supercritical carbon dioxide and comparison with psychoactive cannabinoids. *Journal of Supercritical Fluids*, 55(2), 603–608.
62. Pourseyed Lazarjani, M., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, C., Young, O., & Seyfoddin, A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. *Journal of Cannabis Research*, 2(1).
63. Rabi, F. A., Al Zoubi, M. S., Kasasbeh, G. A., Salameh, D. M., & Al-Nasser, A. D. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(3), 231.
64. Radwan, M. M., Elsohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Khan, I. A., & Ross, S. A. (2009). Biologically active cannabinoids from high-potency Cannabis sativa. *Journal of natural products*, 72(5), 906–911.
65. Rajendran, R., Chathambath, A., Al-Sehemi, A. G., Pannipara, M., Unnikrishnan, M. K., Aleya, L., Raghavan, R. P., & Mathew, B. (2022). Critical role of nitric oxide in impeding COVID-19 transmission and prevention: a promising possibility. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(26), 38657–38672. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19148-4>
66. Raj, V., Park, J. G., Cho, K. H., Choi, P., Kim, T., Ham, J., & Lee, J. (2021). Assessment of antiviral potencies of cannabinoids against SARS-CoV-2 using computational and in vitro approaches. *International journal of biological macromolecules*, 168, 474–485.

67. Ramos A. J. (2017). Efectos terapéuticos de los cannabinoides. Madrid. España. Instituto universitario de investigación en Neuroquímica de la universidad Complutense de Madrid.
68. Ribeiro, A., Almeida, V. I., Costola-de-Souza, C., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M. L., Vitoretti, L. B., Palermo-Neto, J. (2015). Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS- induced acute lung injury. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 37(1), 35–41.
69. Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M. L., Vitoretti, L. B., Mariano-Souza, D. P., Quinteiro-Filho, W. M., Palermo-Neto, J. (2012). Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: Role for the adenosine A(2A) receptor. *European Journal of Pharmacology*, 678(1–3), 78–85.
70. Ribeiro Grijó, D., Vieitez Osorio, I. A., & Cardozo-Filho, L. (2018). Supercritical extraction strategies using CO₂ and ethanol to obtain cannabinoid compounds from Cannabis hybrid flowers. *Journal of CO₂ Utilization*, 28(August), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.09.022>
71. Roggen M., Glauerbloz B., (2017) Optimization of cannabis extraction yield by controlled milling. En: *The Cannabis Scientist*. vol. 3. p. 15.
72. Rovetto, L.J., & Aieta, N.V. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L. *Journal of Supercritical Fluids*, 129, 16-27.
73. Santiago Villaverde, P. (2020). Técnicas de extracción y caracterización de cannabinoides a partir de la planta Cannabis Sativa L. [Trabajo fin de grado, para obtener el grado de químico]. Universitat de les Illes Balears.
74. Santos, S., Barata, P., Charmier, A., Lehmann, I., Rodrigues, S., Melosini, M. M., Pais, P. J., Sousa, A. P., Teixeira, C., Santos, I., Rocha, A. C., Baylina, P., & Fernandes, R. (2022). Cannabidiol and Terpene Formulation Reducing SARS-CoV-2 Infectivity Tackling a Therapeutic Strategy. *Frontiers in immunology*, 13, 841459.
75. Srichana, T., Chunchachaichana, C., Suedee, R., Sawatdee, S., & Changsan, N. (2022). Oral inhalation of cannabidiol delivered from a metered dose

- inhaler to alleviate cytokine production induced by SARS-CoV-2 and pollutants. *Journal of drug delivery science and technology*, 76, 103805.
76. Shyam Natarajan (2015), Liposomal formulations of alkyl nitrites and their efficacy in nitrosylation of blood. [Thesis of master of science]. Department of biomedical engineering. Case Western Reserve University.
77. Uziel, A., Milay, L., Procaccia, S., Cohen, R., Burstein, A., Sulimani, L., Shreiber-Livne, I., Lewitus, D., & Meiri, D. (2022). Solid-State Microwave Drying for Medical Cannabis Inflorescences: A Rapid and Controlled Alternative to Traditional Drying. *Cannabis and cannabinoid research*, 10.1089/can.2022.0051.
78. Shreiber-Livne, I., Lewitus, D., & Meiri, D. (2022). Solid-State Microwave Drying for Medical Cannabis Inflorescences: A Rapid and Controlled Alternative to Traditional Drying. *Cannabis and Cannabinoid Research*
79. Walsh, K. B., McKinney, A. E., & Holmes, A. E. (2021). Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12).
80. Wang, B., Kovalchuk, A., Dongping, L., Ilnytskyy, Y., Kovalchuk, I., & Kovalchuk, O. (2020). In search of preventative strategies: Novel anti-inflammatory high-CBD Cannabis sativa extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues Preprints, 2020040315.
81. Yang, Y., Peng, F., Wang, R., Yange, M., Guan, K., Jiang, T., Xu, G., Sun, J., & Chang, C. (2020). The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *Journal of autoimmunity*, 109, 102434.
82. Yeshurun, M., Shpilberg, O., Herscovici, C., Shargian, L., Dreyer, J., Peck, A., Israeli, M., Levy-Assaraf, M., Gruenewald, T., Mechoulam, R., Raanani, P., & Ram, R. (2015). Cannabidiol for the Prevention of Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Results of a Phase II Study. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21(10), 1770–1775.

83. Zamorano Maldonado, N., Nahum, Cuadrado, C., & Huneus, J. (2019). Documento De Posición Del Colegio Médico De Chile Sobre El Proyecto De Ley Que “Modifica El Código Sanitario Para Incorporar Y Regular El Uso Medicinal De Productos Derivados De Cannabis.” 13–29.