

***Cannabis* Medicinal: Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Cannabis sativa* que se cultiva en el departamento del Cauca**



Universidad del Cauca, Popayán, Cauca
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación

M.Sc. Paola Andrea Arango Romero

***Cannabis* Medicinal: Evaluación Fitoquímica y Actividad
Biológica de *Cannabis sativa* que se cultiva en el departamento
del Cauca**

**Tesis o trabajo de Investigación presentada (o) como requisito parcial para optar al
título de:
Doctora en Ciencias Químicas**

M.Sc. Paola Andrea Arango Romero

Director:

Ph.D. Ricardo Benítez Benítez

Ph.D. Jaime Martín Franco

Universidad del Cauca - Colombia

Ph.D. Luis Espinoza

Universidad Técnica Federico Santa María - Chile

Línea de Investigación: Productos Naturales

Grupo de Investigación: Química de Productos Naturales-QPN-Unicauca
Departamento de Química

Universidad del Cauca
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación
Departamento de Química
Popayán, Cauca

NOTA DE ACEPTACION

JURADO 1

JURADO 2

JURADO 3

Popayán (Julio de 2022)

DEDICATORIA

A mi hijo Manuel, que con su amor, ternura y sabiduría me alentó cada día, a mi compañero y amigo Jairo Andrade, por su confianza y apoyo, a mis padres; Ana Lucia Romero y William Arango por su amor y apoyo incondicional, a Gusta, mis hermanos y sobrinos por su amor y motivación permanente. A mi abue, por su amor incondicional, a todos y cada uno de mis familiares, quienes con su amor a Manuel, me brindaron la seguridad para culminar este camino. A mis profes queridos y grandes amigos, quienes me acompañaron en cada una de estas etapas y me alentaron a continuar siempre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy especialmente y con todo mi aprecio a mi director, Ricardo Benítez por confiar en mí, por todo su conocimiento, amistad y paciencia.

Al PhD Luis Espinoza, profesor de la Universidad Técnica Federico Santa María de Chile, por su confianza y ayuda incondicional.

A los Doctores Juan Villena y Carlos Jara de la Universidad de Valparaiso en Chile, por abrirme las puertas de su laboratorio y acogerme con el mayor cariño y compromiso.

Al Ph.D. Jaime Martín Franco de la Universidad del Cauca, por su apoyo y compromiso.

A la Ph.D. Diana Chito, coordinadora del Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad del Cauca, por todo su apoyo, compromiso y proactividad en cada proceso.

A Jhan Carlos y Sandra del Grupo de Investigación Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca, por todo su apoyo y acompañamiento en este camino.

A Andrés Bustamante del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo y conocimiento compartido.

Al Ph.D. Gonzalo H. Arboleda B. del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por abrirme las puertas del laboratorio de Genética.

A los doctores Yesid Ramírez y Guillermo León Montoya de la Universidad ICESI de Cali, por el trabajo colaborativo realizado.

A Diego Enríquez de la Universidad ICESI, por su conocimiento y compromiso incondicional.

Al Ph.D Jorge Cortez del Laboratorio EmpiriaLab en Rionegro, Antioquia.

Al Grupo de Investigación Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca.

A la Universidad del Cauca y su Vicerrectoría de Investigación por el apoyo financiero a través de los proyectos: ID-4961 del 2018 y ID:5507 del 2020.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia por el apoyo económico a través de la beca de Excelencia Doctoral del Bicentenario 2019-COLCIENCIAS.

Agradezco a todos mis compañeros del Departamento de Química, pues de una u otra forma me ayudaron y acompañaron en este largo camino.

A Jackie, Leidy, Rodrigo, Diana, Fer y cada uno de los amigos que estuvieron siempre, con sus palabras de aliento, regaños, consejos y mucho cariño.

A Mary, tía Pato, Sofy, Jesid, Florecita, Lau, Luisi y toda mi familia por cuidar de Manu cuando estuve lejos, por cada palabra de aliento, amor y ayuda incondicional.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Cannabis; es un grupo de plantas con gran cantidad de aplicaciones tanto industriales como medicinales: dentro de los efectos terapéuticos se encuentran antiemético, analgésico, relajante muscular, el tratamiento de la esclerosis múltiple y algunos tipos de cáncer, efectos que se atribuyen a su amplio espectro de metabolitos secundarios, entre los que se destacan los cannabinoides, terpenos y flavonoides. La comunidad científica ha desarrollado numerosos estudios evaluando el potencial terapéutico de los cannabinoides y recientemente, se han realizado estudios sobre el efecto sinérgico o efecto séquito de las plantas de *Cannabis*. Actualmente se realizan estudios preclínicos y clínicos para evaluar la eficacia y seguridad del consumo de los cannabinoides, especialmente cannabidiol (CBD) y tetrahidrocannabinol (THC), pero existen pocas investigaciones sobre cannabinoides ácidos como el ácido cannabidiólico (CBDA). El Departamento del Cauca posee variedades de *Cannabis* con actividad psicoactiva, la cual contiene concentraciones de Tetrahidrocannabinol (THC) superior al 1% y variedades de *Cannabis* con actividad no psicoactiva, con concentraciones de THC inferior al 1%. Por lo cual, en el presente estudio se determinó la composición química, especialmente de cannabinoides y terpenos presentes en la flor de cuatro variedades de *C. sativa* no psicoactivo cultivadas por productores del Cauca. El estudio se inició con la caracterización morfológica de las variedades de *Cannabis*, los extractos se obtuvieron a partir de tres procesos diferentes; extracción rápida (adaptación Live Resin), un proceso de extracción cercano al realizado por las industrias, extracción por RSO (Rick Simpson Oil), proceso utilizado por los productores y extracción soxhlet de uso común en los laboratorio de productos naturales. Se cuantificaron los cannabinoides principales en el material vegetal y en los extractos por cromatografía de líquida de alta resolución (HPLC), encontrándose el cannabinoide CBDA como mayoritario en todas las variedades. Por cromatografía de gases (GC-MS) se identificaron y cuantificaron ocho terpenos presentes en la mayoría de los extractos, siendo el β -cariofileno y α -bisabolol los mayoritarios en tres de las cuatro variedades de *Cannabis*. El análisis reveló que el método de extracción más eficiente de fitocannabinoides fue soxhlet y que la extracción rápida concentró mayor cantidad de

terpenos. También se cuantificaron fenoles, flavonoides y antraquinonas totales por espectrofotometría. Los fenoles basándose en la reacción colorimétrica de oxidoreducción, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante. El contenido de flavonoides y antraquinonas totales se realizó mediante el método colorimétrico con tricloruro de aluminio. Posteriormente; se evaluó el potencial antioxidante mediante tres métodos: Ensayo de atrapamiento del radical DPPH, ensayo de la captación de radicales ABTS y el método basado en la capacidad de la muestra para reducir metales (FRAP). Finalmente; se evaluó la actividad anticancerígena de cuatro variedades de *Cannabis* mediante viabilidad celular por el ensayo de sulforrodamina B, en líneas células tumorales MCF-7 (Adenocarcinoma humano de glándula mamaria), HT-29 (Adenocarcinoma humano colorrectal) y PC-3 (Adenocarcinoma humano de próstata). Algunos extractos de las variedades A y D con mayor contenido del cannabinoide CBDA, mostraron ser citotóxicos para la línea celular MCF-7 (cáncer de mama), la extracción rápida de la variedad B, registró la presencia del cannabinoide cannabigerol (CBG), el cual presentó citotoxicidad sobre las líneas celulares de mama y colon, y la extracción rápida de la variedad C, con un contenido importante de terpenos, fue citotóxico sobre la línea celular HT-29 (cáncer de colon).

Palabras claves: *Cannabis*, cannabinoides, líneas celulares, efecto séquito.

ABSTRACT

Cannabis; is a group of plants with a large number of both industrial and medicinal applications: within the therapeutic effects are antiemetic, analgesic, muscle relaxant, the treatment of multiple sclerosis and some types of cancer, effects that are attributed to its wide spectrum of secondary metabolites, among which cannabinoids, terpenes and flavonoids stand out. The scientific community has developed numerous studies evaluating the therapeutic potential of cannabinoids and recently, studies have been carried out on the synergistic effect or entourage effect of *Cannabis* plants. Preclinical and clinical studies are currently being conducted to assess the efficacy and safety of cannabinoid use, especially cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC), but there is little research on acidic cannabinoids such as cannabidiolic acid (CBDA). The Department of Cauca has varieties of *Cannabis* with psychoactive activity, which contain concentrations of Tetrahydrocannabinol (THC) greater than 1%, and varieties of *Cannabis* with non-psychoactive activity, with THC concentrations of less than 1%. Therefore, in the present study, the chemical composition was determined, especially of cannabinoids and terpenes present in the flower of four varieties of non-psychoactive *C. sativa* cultivated by producers in Cauca. The study began with the morphological characterization of the *Cannabis* variety, the extracts were obtained from three different processes; rapid extraction, an extraction process close to that carried out by industries, extraction by percolation, a process similar to that carried out by producers, and soxhlet extraction commonly used in natural product laboratories. The main cannabinoids in the plant material and in the extracts were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC), finding the cannabinoid CBDA as the majority in all the varieties. Gas chromatography (GC-MS) identified and quantified eight terpenes present in most of the extracts, being β -caryophyllene and α -bisabolol the main ones in three of the four *Cannabis* varieties. The analysis revealed that the most efficient extraction method of phytocannabinoids was soxhlet and that the rapid extraction concentrated a greater amount of terpenes. Total phenols, flavonoids and anthraquinones were also quantified by spectrophotometry. Phenols based on the colorimetric oxidation-reduction reaction, using the Folin-Ciocalteu reagent as an oxidizing agent. The content of total

flavonoids and anthraquinones was determined by the colorimetric method with aluminum trichloride. Subsequently; Antioxidant potential was evaluated by three methods: DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay, and metal-reducing capacity-based method (FRAP). Finally; The anticancer activity of four varieties of Cannabis was evaluated by means of cell viability by the sulforhodamine B assay, in tumor cell lines MCF-7 (human adenocarcinoma of the mammary gland), HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) and PC-3 (human adenocarcinoma of the prostate). Some extracts of varieties A and D with higher content of the cannabinoid CBDA, were shown to be cytotoxic for the MCF-7 cell line (breast cancer), the rapid extraction of variety B, recorded the presence of the cannabinoid cannabigerol (CBG), the which presented cytotoxicity on breast and colon cell lines, and the rapid extraction of variety C, with an important content of terpenes, was cytotoxic on the HT-29 cell line (colon cancer).

Keywords: *Cannabis*, cannabinoids, cell lines, entourage effect.

CONTENIDO

RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	5
OBJETIVOS	7
Objetivo general:	7
Objetivos específicos:	7
CAPÍTULO 1. Revisión de Literatura	8
1.1 Taxonomía de <i>Cannabis</i>.	8
1.2 Morfología de <i>Cannabis sativa L.</i>	11
1.3 Composición química de <i>Cannabis sativa L.</i>	13
1.3.1 Terpenos	16
1.3.2 Cannabinoides	18
1.3.3 Identificación y cuantificación de cannabinoides y terpenoides de <i>Cannabis</i> .	22
1.3.4 Sistema Endocannabinoide	23
1.4. Uso tradicional y farmacológico de <i>Cannabis sativa L.</i>	25
1.4.1 Efectos adversos de <i>Cannabis</i> y los cannabinoides	26
1.5. Bibliografía	27
CAPÍTULO 2. Evaluación morfológica de <i>Cannabis sativa L.</i> que se cultiva en el departamento del Cauca	40
2.1 Resumen	40
2.2 Summary	40
2.3 Introducción	41
2.4 Resultados	43
2.4.1 Diseño experimental	45
2.4.2 Desarrollo Fenológico	47
2.4.3 Variables de Crecimiento	49
2.4.4 Variables de Rendimiento	50
2.4.5 Contenido de cannabinoides: CBD, THC, CBG	51
2.5 Discusión	53
2.6 Conclusiones	56
2.7 Bibliografía	58

<i>CAPÍTULO 3. Caracterización fitoquímica de Cannabis sativa L. que se cultiva en el departamento del Cauca.</i>	61
3.1 Resumen	61
3.2 Summary	61
3.3 Introducción	62
3.4 Resultados	64
3.4.1 Identificación y cuantificación de cannabinoides por UHPLC/DAD	64
3.4.2 Identificación y cuantificación de terpenos por CG-EM	69
3.4.3 Cuantificación de fenoles, flavonoides y antraquinonas	71
3.5 Discusión	72
3.6 Conclusiones	76
3.7 Bibliografía	78
<i>CAPÍTULO 4. Evaluación de la actividad biológica de Cannabis sativa L. que se cultiva en el departamento del Cauca</i>	87
4.1 Resumen	87
4.2 Summary	87
4.3 Introducción	88
4.4 Resultados	90
4.4.1 Capacidad antioxidante	90
4.4.2 Actividad Citotóxica	92
4.4.3 Índice selectivo (SI)	95
4.4.4 Correlación entre la citotoxicidad, la capacidad antioxidante y el contenido de los fitoconstituyentes	96
4.4.5 Comportamiento de extractos de <i>Cannabis</i> cultivado en Chile	98
4.5 Discusión	101
4.6 Conclusiones	109
4.7 Bibliografía	111
<i>5. Recomendaciones</i>	122
<i>6. Divulgación</i>	122
<i>7. Anexos</i>	123

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación genética de Cannabis</i>	8
Tabla 2. Principales clases biogénicas de compuestos en <i>Cannabis sativa</i> L.....	15
Tabla 3. Compuestos de <i>Cannabis sativa</i> L. <i>por clase química</i>	19
Tabla 4. <i>Procedencia de las variedades analizada</i>	43
Tabla 5. <i>Datos de la ubicación de la Prueba de Evaluación Agronómica (PEA)</i>	44
Tabla 6. <i>Variabes de la Prueba de Evaluación Agronómica</i>	45
Tabla 7. <i>Datos desarrollo fenológico de las variedades de Cannabis</i>	47
Tabla 8. <i>Datos de las variables fenotípicas de las variedades A, B, C y D</i>	47
Tabla 9. <i>Comparación de medias de las variables fenotípicas de las variedades de Cannabis</i>	48
Tabla 10. <i>Comparación de medias de las variables de crecimiento de las variedades A, B, C y D</i>	50
Tabla 11. <i>Comparación de medias de las variables de rendimiento de las variedades de Cannabis</i>	51
Tabla 12. <i>Distribución del porcentaje de biomasa de las variedades A, B, C y D</i>	51
Tabla 13. <i>Comparación de medias de % de cannabinoides de las variedades de Cannabis</i>	52
Tabla 14. <i>Relación de extractos obtenidos según la variedad y el método de extracción</i>	64
Tabla 15. <i>Comparación de medias de cannabinoides principales en los extractos de Cannabis</i>	66
Tabla 16. <i>Comparación de medias del porcentaje de extracción del CBD total en las variedades</i>	68
Tabla 17. <i>Comparación de medias de la concentración de terpenos en los extractos</i> . ..	69
Tabla 18. <i>Análisis de fitoconstituyentes</i>	71
Tabla 19. <i>Evaluación de la capacidad antioxidante</i>	92
Tabla 20. <i>IC₅₀ (µg/mL) de los extractos de Cannabis contra diferentes líneas celulares de cáncer</i>	95
Tabla 21. <i>Índice de selectividad</i>	96
Tabla 22. <i>Correlación de parámetros</i>	98
Tabla 23. <i>Contenido de cannabinoides principales en extractos LABSUN</i>	100
Tabla 24. <i>Índice de selectividad – Variedades LABSUN – Chile</i>	100
Tabla 25. <i>Analitos analizados en el material vegetal de Cannabis</i>	123
Tabla 26. <i>Registro de las condiciones climáticas durante el ciclo de evaluación de la prueba agronómica</i>	125
Tabla 27. <i>Condiciones experimentales HPLC UV/Vis</i>	126
Tabla 28. <i>Determinación de LOD y LOQ para cannabinoides</i>	126
Tabla 29. <i>Analitos analizados en el material vegetal de Cannabis</i>	131
Tabla 30. <i>Condiciones experimentales UHPLC-DAD</i>	134
Tabla 31. <i>Curva de calibración e intervalo lineal</i>	135
Tabla 32. <i>Límite de detección y cuantificación</i>	135
Tabla 33. <i>Condiciones experimentales Cromatografía de gases acoplado a masas</i>	142
Tabla 34. <i>Curva de calibración e intervalo lineal</i>	142
Tabla 35. <i>Límite de detección y cuantificación</i>	142

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. <i>Distribución geográfica de plantas asilvestradas o países de origen de razas locales y cultivares.</i>	10
Ilustración 2. <i>Taxonomía vernácula de Cannabis, imagen adaptada de Anderson.</i>	11
Ilustración 3. <i>Fenotipo de Cannabis</i>	12
Ilustración 4. <i>Posibles aplicaciones industriales de Cannabis.</i>	13
Ilustración 5. <i>Principales flavonoides de Cannabis.</i> a. Canflavina A, b. Canflavina B. 16	
Ilustración 6. <i>Principales terpenos derivados de Cannabis.</i>	18
Ilustración 7. <i>Estructura del Tetrahidrocannabinol (THC).</i>	20
Ilustración 8. <i>Estructura del Cannabidiol (CBD).</i>	20
Ilustración 9. <i>Estructura del Cannabinol (CBN).</i>	21
Ilustración 10. <i>Biosíntesis de los principales cannabinoides presentes en las plantas de Cannabis.</i>	22
Ilustración 11. <i>Sistema endocannabinoide.</i>	24
Ilustración 12.a. <i>Anandamida</i> y b. <i>2-araquidonilglicerol</i>	24
Ilustración 13. <i>Invernadero Natura Pharma S.A.S</i>	43
Ilustración 14. <i>Imágenes de las variedades A, B, C y D.</i>	44
Ilustración 15. <i>Distribución de la prueba de evaluación agronómica (PEA) para las cuatro variedades de Cannabis sativa L.</i>	46
Ilustración 16. <i>Registro de las variables climáticas en la PEA para las variedades de Cannabis sativa L. en el valle geográfico del río Cauca.</i>	46
Ilustración 17. a. <i>Medición variables longitud del peciolo</i> , b. <i>medición de la longitud del foliolo</i> y c. <i>medición de la anchura del foliolo.</i>	48
Ilustración 18. a. <i>Medición variables grosor del tallo</i> , b. <i>Número de tallos/planta</i> y c. <i>longitud entrenudos.</i>	49
Ilustración 19. <i>Material vegetal de Cannabis no psicoactivo.</i>	132
Ilustración 20. <i>Reacción de generación del radical ABTS^{•+} catión radical 2,2 – azinobis – (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato); AAPH= Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano).</i>	154
Ilustración 21. <i>Reacción del radical DPPH con un agente reductor (R).</i>	155
Ilustración 22. <i>Reacción de reducción del hierro detectada por el método FRAP. Reducción de ion férrico a ion ferroso, generada por la reacción con un agente reductor.</i>	156

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. <i>Media de las variables a. longitud del peciolo, b. longitud del foliolo y c. anchura del foliolo</i>	49
Gráfico 2. <i>Media de las variables a. altura de la planta, b. altura del tallo cosechado c. grosor del tallo d. número de tallos por plantas. e. longitud de entrenudos.</i>	50
Gráfico 3. <i>a. Media del contenido de THC total b. Media del contenido de CBD total c. Media del contenido de CBG d. Media de la relación CBD/THC</i>	52
Gráfico 4. <i>Contenido de cannabinoides en extractos de las variedades A, B, C y D obtenidos por: extracción rápida, extracción RSO y extracción soxhlet</i>	65
Gráfico 5. <i>Contenido de CBD y CBDA presentes en cada uno de los genotipos A, B, C y D</i>	67
Gráfico 6. <i>Comparación de porcentajes de extracción en cada variedad.</i>	67
Gráfico 7. <i>Contenido de terpenos en las variedades A, B, C y D por método de extracción.</i>	70
Gráfico 8. <i>Porcentaje de viabilidad de la variedad A en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.</i>	93
Gráfico 9. <i>Porcentaje de viabilidad de la variedad B en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.</i>	94
Gráfico 10. <i>Porcentaje de viabilidad de la variedad C en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.</i>	94
Gráfico 11. <i>Porcentaje de viabilidad de la variedad D en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.</i>	94
Gráfico 12. <i>Cromatograma con los estándares conteniendo los cannabinoides analizados y sus respectivos tiempos de retención.</i>	126
Gráfico 13. <i>Cromatograma Variedad A.</i>	127
Gráfico 14. <i>Cromatograma Variedad B.</i>	128
Gráfico 15. <i>Cromatograma Variedad C.</i>	128
Gráfico 16. <i>Cromatograma Variedad D.</i>	129
Gráfico 17. <i>Cromatograma extracción rápida variedad A.</i>	138
Gráfico 18. <i>Cromatograma extracción por RSO variedad A.</i>	138
Gráfico 19. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad A.</i>	138
Gráfico 20. <i>Cromatograma extracción rápida variedad B.</i>	139
Gráfico 21. <i>Cromatograma extracción por RSO variedad B.</i>	139
Gráfico 22. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad B.</i>	139
Gráfico 23. <i>Cromatograma extracción rápida variedad C.</i>	140
Gráfico 24. <i>Cromatograma extracción por RSO variedad C.</i>	140
Gráfico 25. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad C.</i>	140
Gráfico 26. <i>Cromatograma extracción por RSO variedad D.</i>	141
Gráfico 27. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad D.</i>	141
Gráfico 28. <i>Cromatograma extracción rápida variedad A.</i>	147
Gráfico 29. <i>Cromatograma extracción RSO variedad A.</i>	148
Gráfico 30. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad A.</i>	148
Gráfico 31. <i>Cromatograma extracción rápida variedad B.</i>	148
Gráfico 32. <i>Cromatograma extracción RSO variedad B.</i>	149
Gráfico 33. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad B.</i>	149
Gráfico 34. <i>Cromatograma extracción rápida variedad C.</i>	149
Gráfico 35. <i>Cromatograma extracción RSO variedad C.</i>	150
Gráfico 36. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad C.</i>	150
Gráfico 37. <i>Cromatograma extracción RSO variedad D.</i>	150
Gráfico 38. <i>Cromatograma extracción soxhlet variedad D.</i>	151

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- 7. 1. Capítulo 2 - Materiales y métodos	123
Anexo 2- 7. 2. Capítulo 3 - Materiales y métodos	130
Anexo 3- 7. 3. Capítulo 4 - Materiales y métodos	153
Anexo 4- 7.4. Estancia en Laboratorios de Investigaciones de Instituciones Nacionales e Internacionales	158
Anexo 5 - 7.5. Divulgaciones.....	159

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

2-AG	2- araquidonil glicerol
ABTS ⁺	Catión radical 2,2 – azinobis – (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
ANOVA	Análisis de la Varianza
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DPPH	Radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo
GA	Ácido gálico
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
UHPLC-DAD	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia con detector de arreglo de diodos
HPLC-UV	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector ultravioleta
HT-29	Adenocarcinoma humano colorrectal
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
MCF-7	Adenocarcinoma humano de glándula mamaria
MCF-10A	Glándula mamaria de origen humano
LABSUN	Laboratorio Sustentable Natural
PEA	Prueba de Evaluación Agronómica
PC-3	Adenocarcinoma humano de próstata
SI	Índice de Selectividad
THC	Tetrahidrocannabinol
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes trolox
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
UNODC	Oficina de las Naciones contra la Droga y el Delito

INTRODUCCIÓN

El territorio colombiano se caracteriza por la elevada diversidad de grupos taxonómicos en fauna y flora, comúnmente asociada con su ubicación privilegiada sobre la zona del Ecuador, que lo posiciona entre los 20 más megadiversos del planeta y el segundo con mayor diversidad de plantas del mundo (Rangel, 2015). El territorio de Colombia posee 238 de las 414 familias de plantas con flores reconocidas a nivel global, lo cual significa el 57,7% de esta riqueza (Rangel, 2015). En estas familias se ubican las plantas medicinales y en este grupo se encuentra el *Cannabis*, vulgarmente denominada “marihuana”. El *Cannabis*, un género representativo de la familia *Cannabaceae* (Kinghorn, Falk, Gibbons y Kobayashi, 2017), reconocida desde la prehistoria como fuente de fibra, alimento, aceite y medicina; sin embargo, fue convertida en planta ilegal durante aproximadamente 80 años, debido a su alto poder psicoactivo (UNODC, 2017). Los estudios realizados sobre las propiedades medicinales de *Cannabis*, motivaron en Austria, Bélgica, Canadá, República Checa, Finlandia, Israel, Países Bajos, España, Reino Unido y 23 estados de Estados Unidos la legalización del cultivo y la producción de derivados con propósitos médicos (Brenneisen, 2007, Fishedick, et al., 2010, Leung, 2011, Russo, 2011, Tiscione, et al., 2016, Andre, et al., 2016, Citti, et al., 2017, Russo, et al., 2017, Gustavo, et al., 2019, Kornpointner, et al., 2021, Lowe, et al., 2021). Colombia después de Chile, Puerto Rico y Uruguay, se convirtió en 2015 en el cuarto país latino en legislar sobre el uso del *Cannabis* con fines terapéuticos y paliativos. No obstante, se debe registrar que ya existía la comercialización informal de derivados del extracto para uso tópico con propiedades fitoterapéuticas no demostradas, sin estudios de caracterización morfológica, fitoquímica y mucho menos con los controles de calidad requeridos (UNODC, 2017).

Mediante el decreto 2467 del 22 de diciembre del 2015, se reglamentó el cultivo, uso y producción de *Cannabis* y la Ley 1781 de 2016 reguló el acceso seguro e informado del uso médico y científico de *Cannabis* y sus derivados en el territorio colombiano. El Decreto 613 de 2017 estableció las autoridades de control, atribuciones y responsabilidades, tipos y modalidad de licencia, requisitos y vigencias. La modificación

más reciente se realizó el 23 de julio del 2021 a través del Decreto 811, contemplando la producción y transformación de *Cannabis* con fines medicinales. El proceso legislativo mencionado contribuyó al desarrollo socioeconómico de las regiones y abrió el camino para el estudio de la química de *Cannabis* y la comercialización de los productos derivados con propósitos medicinales, bajo el control detallado de la Dirección de Medicamentos y productos Biológicos. La proyección de la investigación de *Cannabis* ha llevado a realizar estudios en diferentes campos, pero aún falta información referente a la composición química y propiedades medicinales de *Cannabis* que se cultiva y comercializa en Colombia (Ramírez, 2019, Rivera, 2019, Mora, 2020, Pastrana, 2020, Rendón, 2021, León, et al., 2021).

Cannabis sativa L. es una especie herbácea anual de hasta 4 metros de alto, dioica, de tallo recto y hojas palmadas estipuladas opuestas en su parte inferior y alternas en el otro extremo y se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja se compone de 3 a 9 folíolos angostos, de ápice agudo, con márgenes cerrados y tricomas glandulares recostados sobre el haz y el envés (Taura et al., 2007, Flores, et al., 2008, Yoshimatsu, et al., 2010, McPartland, 2018). Los productores locales han reportado en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) una vasta variedad de genotipos de esta planta, registrados con prueba de evaluación agronómica (PEA) con el fin de certificarse como productores, importadores, comercializadores o exportadores de semillas para siembra y/o el registro de las Unidades de Investigación en Fitomejoramiento, de conformidad con lo dispuesto el Decreto 613 del 2017 y la Resolución 3168 del 2015 del ICA.

A nivel fitoquímico, los estudios de *Cannabis* se han enfatizado en identificar y cuantificar metabolitos secundarios presentes en la planta. En la actualidad se han identificado más de 500 metabolitos de diferentes clases biogénicas, utilizando especialmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (CG) (Peschel, et al., 2015; Tiscione, et. al., 2016; Citti, et al., 2016; Mwanza, et. al., 2016). El interés en estos compuestos obedece a la actividad medicinal y fisiológica de muchos de estos fitoquímicos, especialmente los cannabinoides Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y cannabidiol (CBD), los más estudiados en estas últimas décadas (Carbone,

et al., 2010, Ruso, et al., 2011, Elsohly et al., 2017). Además de los cannabinoides están los terpenos, en conjunto presentes en mayor proporción en la flor de la planta, específicamente en los tricomas glandulares que abundan en la superficie de la inflorescencia femenina de gran interés en numerosas investigaciones (Andre, et al., 2016, Booth, et al., 2017, Sommano, et al., 2020). Recientemente, un número abundante de estudios se han enfocado en determina, cuantificar o evaluar la presencia de compuestos en otras partes de la planta y en metabolitos no cannabinoides con potencial terapéutico (Kornpointner, et al., 2021, Lowe, et al., 2021). El interés por estudiar y comprobar los beneficios médicos de las plantas de *Cannabis*, aumenta de manera exponencial, en la medida que se reconoce el potencial bioactivo que tienen sus metabolitos aislados y extractos. La confirmación de la actividad biológica aumenta por el efecto séquito en muestras con diferentes cannabinoides, terpenos, flavonoides u otros metabolitos de la planta, con resultados que respaldan la hipótesis medicinal de *Cannabis* para el tratamiento de diversas enfermedades; en especial, las que generan dolor crónico y neuropático, (Leung, 2011, Russo, et al., 2017, Turner, et al., 2017, Gustavo, et al., 2019).

Aunque existen diversos estudios alrededor del *Cannabis* y su actividad biológica, son escasos los estudios realizados a variedades de *Cannabis* cultivadas en Colombia. Por ello la importancia del presente estudio, en el cual se correlaciona el contenido de los principales metabolitos; cannabinoides, terpenos, fenoles totales, flavonoides totales, antraquinonas totales con la actividad antioxidante y anticancerígena en cuatro variedades de *C. sativa* que se cultivan en el departamento del Cauca. El estudio inicio con la caracterización morfológica de cada variedad incluido el proceso de cultivo, por la influencia que pudiese tener en el contenido de cannabinoides. Los extractos se obtuvieron por tres métodos de extracción sencillas habituales en la industria y laboratorios de análisis de productos naturales. Se pretendió identificar el mejor protocolo con base en el rendimiento de la extracción del cannabinoide CBD Total (CBD y CBDA). Las técnicas de HPLC y CG se utilizaron para identificar y cuantificar la presencia de los cannabinoides y terpenos, se cuantificaron fenoles totales, flavonoides y antraquinonas totales en los extractos obtenidos por métodos colorimétricos. Se realizaron estudios de la actividad antioxidante mediante tres métodos: ensayo de la capacidad antioxidante total

(TRAP), de la actividad atrapadora del radical (DPPH) y del potencial antioxidante reductor del hierro (FRAP). También se han incluido pruebas biológicas de viabilidad celular en una línea de cáncer de mama MCF-7 (Adenocarcinoma humano de glándula mamaria), una línea de cáncer de colon HT-29 (Adenocarcinoma humano colorrectal) y una línea de cáncer de próstata PC-3 (Adenocarcinoma humano de próstata). Los tipos de cancer estudiados son de interés nacional e internacional por su elevada incidencia. En el estudio se utilizó como control la línea celular no tumoral de epitelio de mama MCF-10A.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Cada día es más frecuente a nivel mundial el uso de la medicina tradicional y complementaria, es por ello que la organización mundial de la salud (OMS), ha promovido el lema: “Salvar plantas para salvar vidas” (OMS, 2013). Según la OMS, las plantas medicinales atienden las necesidades de salud de un alto porcentaje de la población mundial ubicada en países en desarrollo. En el 2013, la OMS presentó la estrategia sobre medicina tradicional 2014-2023, con el fin de desarrollar políticas dinámicas y aplicar planes de acción que refuercen el papel de la medicina tradicional en el mantenimiento de la salud de las personas. En Colombia según el documento: “Bases del plan de desarrollo 2014-2018, todos por un nuevo país, paz equidad y educación”, del departamento nacional de planeación (DNP), sólo el 84% de la población nacional se encuentra cubierta por los sistemas de salud y para las comunidades indígenas el 46% y sorprende saber, que para el 2018 la cobertura será apenas del 50% (DNP, 2014).

Teniendo en cuenta este panorama, y reconociendo a Colombia como uno de los países con mayor diversidad de plantas del mundo, y que en el 2015 reglamentó el cultivo y transformación de *Cannabis*, resulta muy importante abordar el estudio y aprovechamiento de las plantas medicinales, en busca de promover el bienestar de las comunidades y el desarrollo científico y económico del país. En este sentido, al ser *Cannabis* considerada una de las plantas más polémicas de nuestra sociedad por sus propiedades psicoactivas y medicinales (Backer, et. al., 2009), está en la mira de muchos investigadores que le atribuyen importantes aplicaciones en el mundo clínico, como lo registran (Backer et. al, 2009, Fishedick, et. al., 2010, Hazekamp, 2010, Russo, 2012, Kinghorn, 2017, Russo, et al., 2017). El panorama de Colombia relacionado con *Cannabis* medicinal es tan ambicioso que, a principios del 2018 el periódico el tiempo presentó una nota en la cual informan que el país adquirió un 44 % de la producción autorizada por la Junta Internacional para la fiscalización de estupefacientes (Jife), lo que convertiría a Colombia en el país con mayor producción de *Cannabis* medicinal (El Tiempo, 2018).

Aunque en Colombia ya existía un incipiente mercado de productos derivados de *Cannabis* con fines medicinales, dichos productos no eran regulados y por lo tanto se desconoce si cumplían con los requerimientos y controles de calidad. Específicamente en el departamento del Cauca se cuenta con diversas empresas en modalidad de cooperativas, legalmente constituidas y registradas que cultivan, procesan y comercializan productos derivados de *Cannabis*, sin los correspondientes estudios de caracterización morfológica, molecular o fitoquímica, o relacionar su composición química con las propiedades medicinales que se le atribuyen, ni protocolos para evaluar la calidad de los productos fitoterapéuticos comercializados por ellas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar los cannabinoides y terpenoides en cuatro variedades de *Cannabis sativa* cultivadas en el departamento del Cauca, y su potencial en la elaboración de productos fitoterapéuticos.

Objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar morfológicamente las cuatro variedades de *Cannabis sativa* cultivadas en el departamento del Cauca.
- ✓ Evaluar la influencia de las condiciones de extracción en la composición de cannabinoides y terpenoides de *Cannabis* del departamento del Cauca.
- ✓ Evaluar la actividad biológica a los extractos y al aceite esencial de las variedades de *Cannabis sativa* seleccionadas.
- ✓ Correlacionar el contenido de cannabinoides y terpenoides presentes en los extractos con las actividades biológicas estudiadas.

CAPÍTULO 1. Revisión de Literatura

Las plantas del género *Cannabis* se creen nativas de Asia Central, aparecieron de forma silvestre y posteriormente fueron cultivadas por humanos para diferentes fines; recreativos, medicinales y terapéuticos. La farmacopea de Shen Nung Ben Ts'ao, una farmacopea clásica de la medicina China, habla del uso de *Cannabis* como medicamento ya en el 2730 a. C. aunque su cultivo se plantea en el año 8000 a. C. (Crocq, 2020; Schilling, et al., 2020). En China el cultivo de *Cannabis* se extendió a Oriente Medio y Rusia hacia el año 2000 a. C. y posteriormente en África civilizada en el año 700 d.C. En América Central y América del Sur, se tiene evidencia a mediados del siglo XVI y en América del norte a lo largo del siglo XVII. (Ferrer, 2005; Lynch, 2020). De manera reciente, en la primera mitad del siglo XX, *Cannabis* se convierte en una planta “ilegal” por su propiedad como sustancia psicoactiva, lo que limitó por más de 50 años el estudio y comercialización de los cultivos de *Cannabis* (Gazmuri, 2014). En la década de los 60, a partir de los estudios realizados por el científico el Dr. Raphael Mechoulam se posiciona Israel por la investigación y uso terapéutico de *Cannabis*.

1.1 Taxonomía de *Cannabis*.

Cannabis es una planta anual que pertenece a la familia Cannabaceae, del género *Cannabis*, donde se distinguen tres especies: *C. sativa* L., *C. indica* Lam. y *C. ruderalis* Janisch. Fue clasificada por primera vez por el botánico Carl Linnaeus “padre de la taxonomía moderna” en 1753. En 1785, Jean Baptiste Lamarck descubre otra especie a la que denominó *Cannabis indica*. (Schultes, et al., 2011; Ángeles, et al., 2014; Clarke, et al., 2016; McPartland, 2018). El nombre latino *Cannabis*, proviene del latín tardío *cannābum*, que es una deformación del latín *cannābis*, que proviene del griego (*Kannabis*), el término *sativa* significa “cultivada” (Clarke, et al., 2016).

Tabla 1. Clasificación genética de *Cannabis*

REINO	PLANTAS
División	Magnoliophyta (plantas con flores)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Orden	Rosales (antes Urticales)
Familia	Cannabaceae
Género	<i>Cannabis</i>
Especie	<i>C. sativa</i> L.

Fuente. Adaptado de Ren (2021).

1.1.1 Historia Genómica

Se considera que *Cannabis* se originó en algún lugar de Asia Central. La hipótesis evolutiva propone que se extendió a nuevas regiones geográficas y contextos culturales, evolucionando en cuatro grupos genéticos y grupos taxonómicos principales; *C. sativa*, cáñamo de folíolos estrechos, *C. indica* subsp chinensis cáñamo de folíolos anchos, *C. indica* fármaco de folios estrechos y *C. indica* subsp. Afganica (McPartland, 2018). Actualmente se reconocen tres especies *C. indica*, *C. sativa* y *C. ruderalis*, y el número de variedades de *C. indica* y *C. sativa* no está confirmado, pero se reportan miles de variedades (Beutler, et al., 1978; Aliferis, et al., 2020).

A pesar que *Cannabis* se ha usado desde hace miles de años, la historia genómica de domesticación de esta planta ha sido poco estudiada en comparación con otras especies de cultivos, en gran parte, debido a restricciones legales (Ren, et al., 2021). Se han estudiado diferentes variedades de *Cannabis*, domesticado o silvestre (Schultes, 2011; Mudge, et al., 2018). *Cannabis* como producto agrícola, está por debajo de otras plantas domesticadas en el conocimiento de los genes y la variación genética que influyen en los rasgos de interés de la planta, aunque hoy en día existen recursos disponibles que documentan los rasgos fenotípicos asociados con determinadas variedades de *Cannabis* (Aardema, et al., 2021). Se han realizado estudios utilizando marcadores moleculares para diferenciar variedades y determinar el sexo en plantas de *Cannabis* (Navas, 2019). También se utiliza el polimorfismo como una herramienta confiable para discriminar las plantas con potencial en THC (Staginnus, et al., 2014), al igual que utilizar un enfoque metabolómico para el mapeo quimiotaxonómico de variedades de *Cannabis* para uso médico (Haekamp, et al., 2016; Aliferis, et al., 2020). Concluir con precisión cuándo evolucionó el *Cannabis* no resulta fácil, ya que se carece de un registro fósil de impresión sólido (impresiones de hojas y frutos en las rocas), por lo que los paleobotánicos recurrieron a los microfósiles, en forma de polen fósil o polen subfósil

(McPartland, 2018). Pero un reciente estudio realizado por Ren y colaboradores en el 2021, registra la historia de domesticación de *Cannabis sativa* por primera vez a principios del Neolítico en el este de Asia. En el estudio; se muestra el compilado de 110 genomas completos que cubren el espectro de plantas silvestres, variedades locales, cultivares históricos e híbridos modernos de cáñamo y otros tipos. Existen varios sistemas de clasificación que permiten discriminar entre las diferentes variedades de *Cannabis*, como “tipo fibra” o “tipo droga” (Fetterman, et al., 1971; Small, et al., 1973; Fournier, et al., 1979), la caracterización cualitativa indica la determinación de la relación THC/CBD en las plantas y se asigna un fenotipo químico o quimiotipo, como también se conoce.

En la ilustración 1, los códigos de color corresponden a los cuatro grupos obtenidos en el análisis filogenético; amarillo indica *Cannabis* basal, el verde *Cannabis* tipo cáñamo, el azul *Cannabis* silvestre tipo droga y el rojo *Cannabis* tipo droga. Las formas indican tipos de domesticación; los cuadrados rojos vacíos simbolizan cultivares de tipo fármaco obtenidos de tiendas comerciales ubicadas en Europa y E.E.U.U, cuadrado completo simboliza cultivar, triangulo silvestre y circulo raza autóctona. Los resultados que ellos presentan apoyan un escenario evolutivo que explica la variabilidad en la composición de cannabinoides entre plantas como resultado de la selección artificial de los primeros agricultores por mutaciones de pérdida de funciones (Ren, et al., 2021), específicamente en Latinoamérica se reporta en Perú un cultivar tipo droga. En Colombia, la legislación diferencia *Cannabis* como psicoactivo, cuando tiene más del 1% de THC y no psicoactivo, menos 1% de THC.

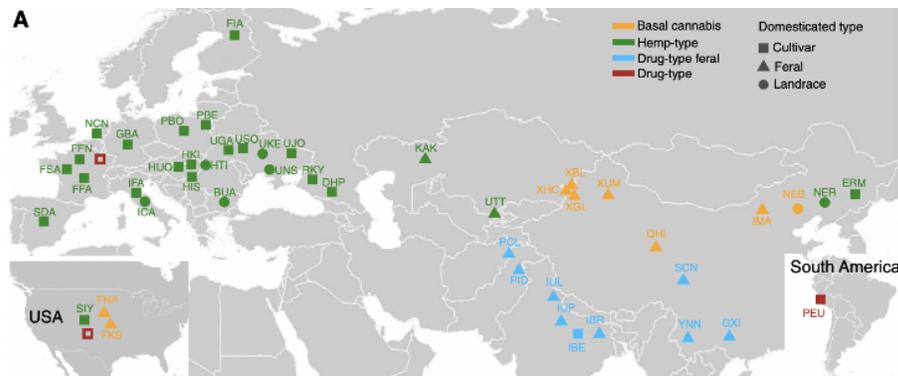


Ilustración 1. Distribución geográfica de plantas asilvestradas o países de origen de razas locales y cultivares.

Fuente. Adaptado de Ren (2021).

En la taxonomía vernácula en la literatura refiere que “Indica” es una planta con folíolos anchos, maduración temprana, tipificada por plantas de Afganistán. “Ruderalis” se aplica a plantas con morfología tipo salvaje o floración temprana. “*sativa*” se refiere a plantas con folios estrechos, hábito delgado y alto, maduración tardía, tipificado por plantas de India y sus descendientes en Tailandia, Sur y Este de África, Colombia y México, para los científicos se resumen tras las nomenclaturas vernáculas y formales que “*sativa*” es en realidad Índica, “*indica*” es en realidad afgánica y “*ruderalis*” suele ser *sativa*. Las tres son variedades de una especie, *C. sativa* L. (McPartland, 2018) ver ilustración 2.

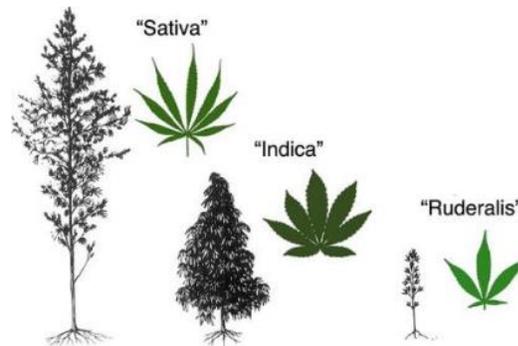


Ilustración 2. Taxonomía vernácula de *Cannabis*, imagen adaptada de Anderson.

Fuente. McPartland (2018).

1.2 Morfología de *Cannabis sativa* L.

Cannabis es una planta herbácea anual de hasta 4 metros de alto, dioica, de tallo recto y hojas palmadas estipuladas, las inferiores opuestas y las superiores alternas. Las hojas se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja se compone de 3 a 9 folíolos angostos, de ápice agudo, con márgenes cerrados y tricomas glandulares recostados sobre el haz y el envés de color más claro (Yoshimatsu, et al., 2010). Los tricomas glandulares producen una resina como una forma de proteger a la planta contra las agresiones externas. *C. sativa* y *C. indica* se pueden separar por morfología, *C. sativa* es más alta con un tallo fibroso y *C. indica* es más corta con un tallo leñoso.

En las plantas de *Cannabis sativa* L. se distinguen los géneros femenino y masculino. Las flores femeninas comprenden los cogollos que todo el mundo conoce como marihuana, con altas cantidades de cannabinoides y terpenos y a la cual se le

atribuyen efectos médicos y recreativos. Una planta de *Cannabis* macho no tiene flores, pero produce pequeños sacos de polen. Las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores; mientras que, las femeninas son densas, pero con pocas flores (de 5 a 8) (Ángeles, 2014). El cáñamo es una planta de días cortos, por lo cual requiere un largo período de oscuridad para formar las flores, su floración se retrasa en días largos y se acelera en días cortos.

Existen diferentes cepas o fenotipos de *Cannabis* que pertenecen a una sola especie (*C. sativa L*), con diferencias significativas en términos de apariencia y efectos fisiológicos simplemente debido a la expresión de genes individuales. Dependiendo del potencial uso pueden clasificarse como: cepas para la producción de fibra, denominada como cáñamo y las cepas cultivadas para uso medicinal o recreativo. El fenotipo habla de la apariencia, el rendimiento y la adaptación del cultivar en el entorno determinado. Por lo que diversos factores y condiciones ambientales pueden inducir la expresión de un fenotipo específico al afectar el papel que desempeñan los genes (ilustración 3). Los rasgos de cada planta de *Cannabis* dependen de genes específicos que se expresan en pequeñas estructuras microscópicas llamadas cromosomas (Lynch, 2020). El fenómeno mediante el cual un organismo vivo o genotipo cambia su comportamiento con variaciones del ambiente se conoce como interacción genotipo por ambiente (G x A). La interacción G x A reduce la correlación entre los valores fenotípicos y genotípicos, disminuye el progreso por selección y dificulta las recomendaciones de nuevos cultivares con amplia adaptabilidad.



Fenotipo = genotipo + ambiente

Ilustración 3. *Fenotipo de Cannabis*

Fuente. Lynch (2020).

En la ilustración 4, se puede observar algunas de las posibles aplicaciones que se le atribuye a la planta de *Cannabis* y cada una de sus partes (tallo, hojas, flor, semillas) (Linger, et al., 2002; McLaren, et al., 2008; Ogata, et al., 2013; Ahmad, et al., 2016; Kumar, et al., 2017; Brzyski, et al., 2017; Mirski, et al., 2017; Rijavec, et al., 2017; Lara, 2018; Charai, et al., 2021; Gomez, et al., 2021; Kornpointner, et al., 2021; Parvez, et al., 2021).



Ilustración 4. Posibles aplicaciones industriales de *Cannabis*.

Fuente. Government of Alberta (2020).

1.3 Composición química de *Cannabis sativa* L.

El cáñamo cultivado para obtener fibra generalmente produce cantidades más altas de CBDA, que de THCA, y lo que se conoce como marihuana contiene concentraciones más altas THCA y niveles más altos de cannabinoides. El cáñamo y la marihuana han recibido definiciones legales separadas, generalmente en función del umbral de concentración de THC; en la Unión Europea y los Estados Unidos por el 0,3% de peso seco de THC, también en función del fenotipo químico o quimiotipo (alta, baja o mediana proporción de THCA a CBDA) (De Meijer, et al., 2003). Se puede distinguir el *C. sativa* del *C. indica* por fitoquímica, *sativa* tiene una proporción del cannabinoide Δ -9 tetrahidrocannabinol (THC) mayor al cannabidiol (CBD). Mientras que *Cannabis indica*

tiene proporción de THC menor que CBD, *Cannabis ruderalis* CBD \cong THC (Staginnus, et al., 2014; McPartland, 2018). En Colombia a partir del Decreto 613 del 2017, se establece *Cannabis* psicoactivo a la flor que presenta THC superior al 1% y *Cannabis* no psicoactivo THC inferior al 1%. Cuando se habla de las aplicaciones de *Cannabis*, los cannabinoides THC, CBD y CBN registran prioridad por orientar la aplicación de la planta, y en el campo terapéutico, la presencia y concentración de ellos, permite el cumplimiento de la normativa legal.

La planta de *Cannabis sativa* L. es reconocida por ser una especie química compleja, basada en un rico espectro de fitoquímicos. En las últimas décadas la planta ha tenido un resurgimiento del interés debido a sus aplicaciones multipropósito, además de su composición fitoquímica, es una rica fuente de fibras celulósas y leñosas, lo que motiva no sólo al sector farmacéutico y de la construcción (Andre, et al., 2016). En el año 1980 Turner et al. informó 423 compuestos de esta planta (Turner, et al., 2017), en 1995 se reportaron 483 compuestos y a finales de 2005 se registraban 491 compuestos naturales identificados y aislados de *Cannabis* (Kinghorn, 2017), hasta la fecha se han aislado alrededor de 565 compuestos naturales provenientes del metabolismo de *Cannabis* (Kinghorn, 2017, Jin, et al., 2020), donde se destacan los cannabinoides y sus rutas biosintéticas (Angeles, et al., 2014, Andre, et al., 2016).

Los cannabinoides representan el grupo de compuestos más estudiados, por su amplia gama de efectos farmacéuticos y actividades psicotrópicas, a la fecha se reportan alrededor de 120 (Pertwee, R. G., 2006). (Broséus, et al., 2010, Hao, et al., 2015, Brand et al., 2017, Christelle et al., 2016, Kinghorn, 2017, Russo, et al., 2017, Bernstein, et al., 2019, Aliferis, et al., 2020, Jin, et al., 2020, Kornpointner, et al., 2021). Además de los cannabinoides, en *Cannabis* se encuentra una serie de fitocompuestos tales como terpenos, flavonoides, hidrocarburos, compuestos nitrogenados, entre otros que se registran en la tabla 2 (Jin, et al., 2020), algunos de estos compuestos con mucho interés por las propiedades medicinales ampliamente conocidas, dichos compuestos se distribuidos en diferentes partes de la planta. Los cannabinoides, terpenos y flavonoides se encuentran de forma mayoritaria en las flores de *Cannabis*. Recientemente; se destaca

el efecto sinérgico o efecto séquito que sugieren que otros compuestos presentes en la hierba de *Cannabis* podrían influir en la actividad de los cannabinoides, especialmente en la actividad del CBD y THC, por lo cual algunos estudios buscan analizar otras partes de la planta y enfocarse en metabolitos no cannabinoides que también tienen potencial terapéutico (Kornpointner, et al., 2021, Lowe, et al., 2021). Junto con los cannabinoides, los terpenos tienen efectos sinérgicos, o también llamado efecto séquito (Russo, 2011; Sommano, et al., 2020; Micalizzi, et al., 2021). El término sinergia proviene de la palabra griega ática συνεργία (synergía, “colaboración”), que se basa en la palabra συνεργός (synergos, “trabajar juntos”) (Hanuš, et al., 2020), refiriéndose al aumento de la potencia de los compuestos activos cuando están juntos, en comparación cuando están cada uno por separado. El efecto séquito se viene estudiando desde hace muchos años, en 1972, Mechoulam et al. sugirieron que otros compuestos presentes en el *Cannabis* podrían influir en la actividad del THC, en 1974 Carlini et al., determinaron que los extractos de *Cannabis* producían efectos “dos o cuatro veces mayores que los esperados por su contenido de THC”, en 1981, Fairbairn y Pickens, detectaron la presencia de “poderosos sinergistas”, compuestos presentes en los extractos que provocaban una actividad un 330% mayor en ratones que el THC solo (McPartland, et al., 2001).

Tabla 2. Principales clases biogénicas de compuestos en *Cannabis sativa* L.

PRINCIPALES COMPUESTOS	NÚMERO DE COMPUESTOS
Terpenos	120
Cannabinoides	66
Hidrocarburos	50
Azúcares y compuestos relacionados	34
Compuestos nitrogenados	27
Fenoles no cannabinoides	25
Ácidos grasos	22
Ácidos simples	21
Flavonoides	21

Fuente. Jin, et al., (2020).

En el *Cannabis* se han aislado y detectado alrededor de 21 flavonoides, que se encuentran principalmente en las flores, hojas, ramas y polen (Ross, et al., 2005, Vanhoenacker, et al., 2010), la canflavina A y la canflavina B (ver ilustración 5), son flavonas isoprenoides metiladas (Barron et al., 1996, Angeles, et al., 2014), que han

mostrado actividad farmacológica como; inhibición de la producción de prostaglandina E₂ (Barrett et al., 1986) y se sugiere modulación con los cannabinoides (McPartland, et al., 2002), otros flavonoides presentes; apigenina, kamferol y quercetina (Flores-Sanchez, et al., 2008).

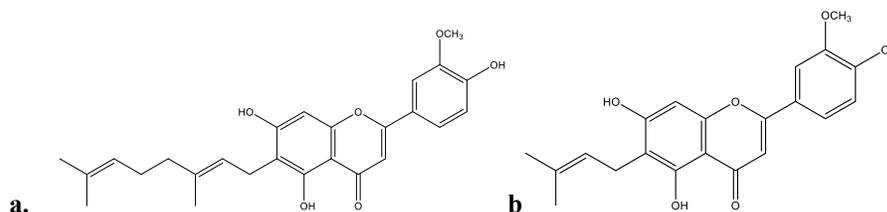


Ilustración 5. Principales flavonoides de *Cannabis*. a. Canflavina A, b. Canflavina B.

Fuente. McPartland (2001).

Los estilbenoides son compuestos fenólicos distribuidos en todo el reino vegetal, Se han identificado 19 estilbenoides en el *Cannabis* (Turner et al., 1980, Ross, et al., 1995), en el tallo, hojas y resina (Crombie, et al., 1982, El-Feraly et al., 1986) sus funciones en las plantas incluyen mecanismos de defensa constitutivos e inducibles, inhibidores del crecimiento de las plantas y factores de latencia (Flores-Sanchez, et al., 2008). Los estilbenoides tienen actividades antifúngicas y antibacterianas (Molnar et al., 1986, KostECKI et al., 2004), antiinflamatoria (Djoko et al., 2007), antineoplásica (Yamada et al., 2006), entre otros (Stivala et al., 2001, Lee et al. 2005, Valenzano et al., 2006, Angeles et al., 2014).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados básicos, son cíclicos de 13 miembros en los que la poliamina espermidina está unida a través de sus átomos de N terminales a la posición beta y al carbono carboxilo de un ácido graso C14. En el *Cannabis* se han aislado e identificado 10 alcaloides en las raíces, hojas, tallos, polen y semillas (Paris et al., 1975. Los alcaloides tienen actividad biológica en dosis bajas y pueden derivarse de los aminoácidos (Ross et al., 1995, Flores-Sanchez, et al., 2008).

1.3.1 Terpenos

Dentro del amplio espectro de compuestos químicos de *Cannabis*, además de los cannabinoides se destacan los terpenos, se han encontrado más de 120 terpenos en

Cannabis (Booth et al., 2019, Jin, et al., 2020), siendo estos los componentes responsables del olor característico de esta planta. Los terpenos son moléculas producidas en la resina de la planta, se encargan de varias funciones como; alejar a los depredadores, retardar la maduración, entre otras (Ángeles, et al., 2014). Los terpenos son el componente principal de los llamados aceites esenciales de plantas. *Cannabis* recién recolectado contiene 1% de aceite esencial, compuesto en mayor parte de monoterpenos (89-90%) muy volátil, que se evapora rápidamente. Una vez la hierba está seca, la tasa de aceite esencial solo es de 0,1%, y más o menos 50% de esta se compone de sesquiterpenos, mucho menos volátiles.

1.3.1.1 Monoterpenos de Cannabis: el mirceno es el terpeno más expandido dentro de las distintas variedades de *Cannabis*, en ciertas variedades se encuentra hasta un 60%, se sabe que este terpeno tiene el potente analgésico del THC y el CBD al estimular la liberación de opioides endógenos a través del mecanismo dependiente del receptor adrenérgico α_2 (Sommano, et al., 2020), antiinflamatorio y antibiótico (Casano, et al., 2010). El α -pineno y el β -pineno inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa en el cerebro, por lo cual se afirma que ayuda a la memoria y minimiza la disfunción cognitiva inducida por la intoxicación por THC (Miyazawa, et al., 2005). El limoneno se puede considerar el segundo terpeno encontrado en mayor proporción en la resina de *Cannabis*, este posee propiedades antifúngicas, antibacterianas y anticancerígenas (Tejada, 2021), este monoterpeno eleva el nivel de serotonina y dopamina, induciendo los efectos ansiolíticos, antiestrés y sedantes del CBD (Maayah, et al., 2020). Al linalool y su fragancia floral se sugiere que podrían ayudar con la ansiedad a través de la aromaterapia (Gaggiotti, et al., 2020).

1.3.1.2 Sesquiterpenos del Cannabis: El β -cariofileno es el sesquiterpeno más disponible en las plantas y extractos de *Cannabis*, este terpeno es un agonista del receptor CB2 sin psicoactividad (Sommano, et al., 2020), se le atribuye efectos antiinflamatorios (Gaggiotti, et al., 2020), efecto gastroprotectores, analgésicos, anticancerígenos, antifúngicos, antibacterianos, antidepresivos, antiinflamatorios, antiproliferativos, antioxidantes, ansiolíticos, analgésicos y neuroprotectores (Hanuš, et al., 2020)

Otros terpenos que se pueden encontrar son: terpinol, α -bisabolol, linalool, guaiol y fitol, entre otros. En la ilustración 6, se pueden observar algunos de los principales terpenos. (Hillig, 2004; Casano, et al., 2010; medical plants, 2015; Sommano, et al., 2020, Hanuš, et al., 2020).

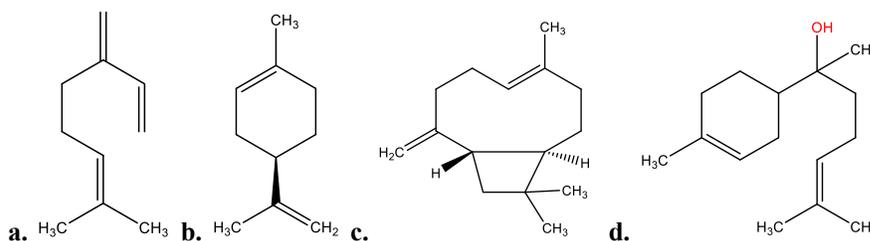


Ilustración 6. Principales terpenos derivados de *Cannabis*.

a. Mirceno, b. Limoneno, c. β -cariofileno y d. α -bisabolol

Fuente. Russo (2017).

1.3.2 Cannabinoides

Los cannabinoides son compuestos terpenofenólicos exclusivos de *Cannabis*, son los fitocompuestos de mayor interés en *Cannabis* por sus propiedades medicinales, estos compuestos se encuentran en los tricomas de las plantas de *Cannabis* y actúan como glándulas de resina que abundan en la superficie de la inflorescencia femenina, por ello el interés se enfoca en esta parte de la planta (Hillig, 2004; Booth, et al., 2017). Los cannabinoides se caracterizan por tener una estructura carbocíclica con 21 carbonos, formados generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno (Flores, et al., 2008, Hao, et al., 2015, Russo, et al., 2017), son compuestos con una alta lipofilidad, por ello para su extracción se utilizan disolventes como etanol o hexano, el hexano ha sido utilizado por Mariotti et al., para clasificar el material de la planta sobre la base de su contenido de THC, que puede considerarse un marcador de la edad de la planta (Mariotti, et al., 2016, Elsohly et al., 2017).

Los cannabinoides se han clasificado químicamente en 10 grupos principales (ver tabla 3), de los cuales la principal sustancia psicoactiva es el Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC), además del THC, *Cannabis* contiene; el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN), en cantidades que pueden modificar los efectos del THC o causar efectos por si mismos (McPartland, et al., 2001, Kinghorn, 2017, Gülck, et al., 2020). Actualmente se

encuentran estudios que resaltan los efectos de otros cannabinoides, como el Δ -8-tetrahidrocannabinol (Δ -8-THC), cannabósidos; cannabinoides glicosilados (Janeé'M, et al., 2017), cannabidibutol (CBDB) (Citti, et al., 2019), cannabinoides hidrosolubles (Capellán, 2012).

Tabla 3. Compuestos de *Cannabis sativa* L. por clase química

CLASE QUÍMICA	2005	2015
Tipo Δ^9 -THC	9	23
Tipo Δ^8 -THC	2	5
Tipo CBG	8	16
Tipo CBC	6	9
Tipo CBD	7	7
Tipo CBND	2	2
Tipo CBE	5	5
Tipo CBL	3	3
Tipo CBN	7	11
Tipo CBT	9	9
Varios tipos	24	30
Total Cannabinoides	72	120
Total No – Cannabinoides	419	445
Total	491	565

Fuente Kinghorn, (2017).

Los cannabinoides más estudiados y con mayor interés por que se encuentran en mayor cantidad en las diferentes variedades de *Cannabis* comercializadas, y por los efectos terapéuticos que se les atribuye son; THC, CBD, CBN y CBG.

1.3.2.1 *Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)*: El Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (ver ilustración 7), es el cannabinoide con mayor actividad psicoactiva, fue aislado y caracterizado por primera vez en 1964 por Raphael Mechoulam (Fischedick, et. al., 2010; Russo, 2011). La farmacología del tetrahidrocannabinol (THC) es la más estudiada (Hazekamp, 2010; Russo, 2012), al ser el cannabinoide más común en los quimiotipos de *Cannabis*. El THC interactúa con los receptores CB1 y CB2, los cuales se expresan principalmente en el sistema nervioso central, los pulmones, el hígado y riñones (Russo, 2011). Se conocen estudios de cannabinoides derivados del Δ^9 -THC hidroxilados; transcannabitriol, monoetil éter, trans-propanodiol éter, cis-cannabitriol monoetil éter, derivados oxigenados, entre otros (Carbone, et al., 2010; Elsohly et al., 2017, Kinghorn, 2017).

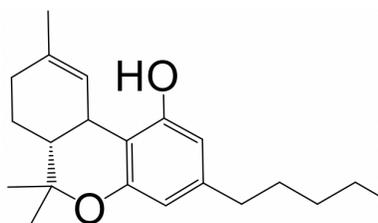


Ilustración 7. Estructura del Tetrahidrocannabinol (THC).

Fuente. Kinghorn, (2017).

1.3.2.2 Cannabidiol (CBD): El cannabidiol (ver ilustración 8) se aisló en 1940, pero su estructura correcta fue aclarada por primera vez en 1963 por Mechoulam y Shvo (Fischedick, et. al., 2010). El CBD, no es psicoactivo, pero juega un papel modulador de los efectos psicoactivos de Cannabis (Casajuana, et al., 2019). El cannabidiol y el ácido cannabidiólico son los principales metabolitos de las variedades no psicotrópicas (tipo fibra) (Kinghorn, 2017). El cannabinoide CBD tiene una muy baja afinidad por los receptores cannabinoides (CB), pero puede tener mecanismos de acción significativos con CB1 y CB2, además posee la capacidad única de antagonizar CB1 a concentraciones muy bajas cuando se encuentra en presencia de THC (Russo, et al., 2017, Elsohly et al., 2017, Kinghorn, 2017, Citti, et al., 2019).

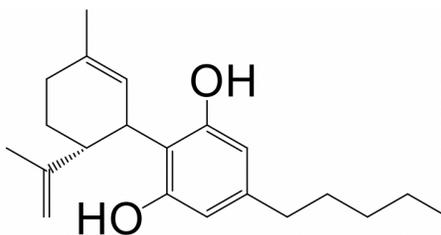


Ilustración 8. Estructura del Cannabidiol (CBD).

Fuente. Kinghorn, (2017).

1.3.2.3 Cannabinol (CBN): El cannabinol (ver ilustración 9), es el subproducto de la oxidación no enzimática del THC, que parece lograrse principalmente por el calor y la luz (Carbone, et. al., 2010). Comparativamente el CBN presenta aproximadamente 0.25 veces la actividad psicoactiva del THC (Russo, et al., 2017; Elsohly et al., 2017). El CBN es un agonista del receptor CB1, se le atribuye efecto sedante, (Russo, et al., 2017).

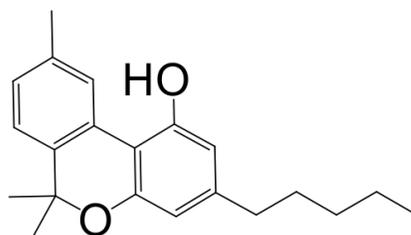


Ilustración 9. Estructura del Cannabinol (CBN).

Fuente. Kinghorn, (2017).

1.3.2.4 Cannabigerol (CBG): El cannabigerol, es el primer cannabinoide identificado, se demostró que su precursor el ácido cannabigerólico (CBGA), fue el primer cannabinoide biogénico formado en la planta. (Brenneisen, 2007). El CBG es el precursor de CBC, CBD y THC, y está presente solo en cantidades menores (ver ilustración 10). Este cannabinoide tiene una ligera afinidad por los receptores CB1, casi igual que el CBD (McPartland, et al. 2001). El CBG actúa como analgésico, antibacteriano e inhibe el crecimiento de células de carcinoma epiteloidal humano (Baek et al. 1998).

1.3.2.5 Biosíntesis de los cannabinoides: El proceso de biosíntesis de cannabinoides en la planta se logró establecer en 1997, por el profesor de farmacobotánica, Yukihiro Shoyama de la Universidad Kyushu de Japón. El profesor Yukihiro Shoyama logró aislar las enzimas sintetasas del THCA, CBDA y CBCA y con ello demostrar la ruta biosintética de los cannabinoides. La ruta se da a partir de 2 vías, la vía de los policétidos (Shoyama et al., 1975) y la vía de la desoxixilulosa fosfato/metileritritol fosfato (DOXP/MEP) (Fellermeier et al., 2001). De la vía de los policétidos se deriva el ácido olivetólico y de la vía DOXP/MEP se obtiene el geranil difosfato (GPP). Ambos son condensados por la prenilasa geranil difosfato: olivetolato geraniltransferasa (GOT) para formar ácido cannabigerólico (CBGA).

El CBGA es un sustrato común para tres oxidociclasas: ácido cannabidiólico sintasa, ácido cannabícroménico sintasa y el ácido tetrahidrocannabinólico sintasa (Ángeles, et al., 2008). Por estas vías se obtienen los cannabinoides ácidos; ácido

cannabidiolico (CBDA), ácido cannabícroménico (CBCA) y el ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) (Degenhardt, et al., 2017), procesos que se llevan a cabo en la planta. Posteriormente, por descarboxilación de los cannabinoides ácidos y se obtienen los cannabinoides neutros, como se puede observar en la ilustración 10, (Elsohly et al., 2017, Kinghorn 2017, Pellati, et al., 2018).

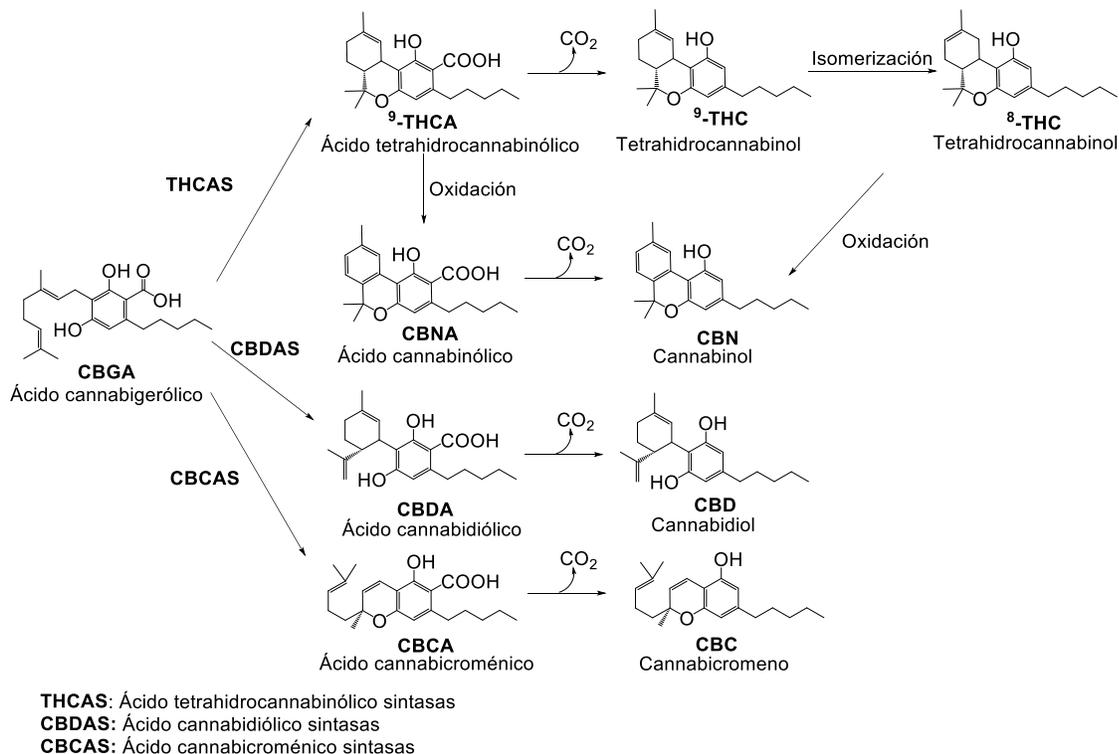


Ilustración 10. Biosíntesis de los principales cannabinoides presentes en las plantas de *Cannabis*.

Fuente. Pellati, et al., (2018).

1.3.3 Identificación y cuantificación de cannabinoides y terpenoides de *Cannabis*.

El análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos activos presentes en el *Cannabis*, especialmente de cannabinoides y terpenoides, se realiza por diferentes técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, autores como Jamwal, et al., analizaron por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC), el contenido de cannabinoides, esta técnica es muy utilizada, pero la alta temperatura requerida en este método tiende a conducir a una sobreestimación del contenido debido al proceso de descarboxilación (Jamwal, et. al., 2017). Por ello, en los últimos años la técnica de HPLC para el análisis de cannabinoides se ha convertido en una buena alternativa (Tiscione, et. al., 2016) está

técnica, acoplada a la espectrometría de masa (HPLC-MS) es el método de elección tanto en material vegetal como en fluidos biológicos. Estudios realizados por (Stolker, et al., 2004, Framil et al., 2014; Peschel, et al., 2015; Tiscione, et al., 2016; Citti, et al., 2016; Mwanza, et al., 2016, Berman, et al., 2018, Nemeškalová, et al., 2020, Corni, et al., 2020, Pichini, et al., 2021) soportan esta afirmación.

El primer estudio de la composición química de muestras de *Cannabis* en cultivos Colombianos fue realizado por Florian y colaboradores en el 2009, el estudio tenía como objetivo optimizar las condiciones de extracción y cuantificación de CBD, THC y CBN en muestras de cultivos ilegales por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). En los últimos años se han utilizado diferentes métodos analíticos de identificación y cuantificación de fitocompuestos de *Cannabis* (Fischedick, et al., 2010, Micalizzi, et al., 2021).

1.3.4 Sistema Endocannabinoide

El cuerpo humano funciona como una entidad independiente, capaz de recibir información del mundo exterior a través de los sentidos, la cual posteriormente procesa y envía al cerebro, es así como se cumple con todas las funciones que el organismo realiza; alimentación, reproducción, etc.

El sistema endocannabinoide es un sistema de comunicación intercelular, un sistema de neurotransmisión, que se encuentra en diferentes órganos y tejidos del cuerpo (ilustración 11), el cual se encuentra constituido por tres componentes: receptores de membrana específicos para estos sistemas o receptores cannabinoides (CB1 y CB2), ligandos endógenos o cannabinoides endógenos (anandamida y 2-araquidonoilglicerol) y sistema enzimático de activación y finalización de la respuesta biológica. Los receptores y los endocannabinoides interactúan como lo hace una cerradura y la respectiva llave (Grotenhermen, 2006, Turner, et al., 2017; Baker, 2020, Stasiulewicz, et al., 2020, Tomko, et al., 2020, Fundación Canna, 2021).

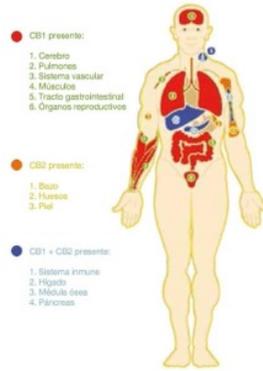


Ilustración 11. Sistema endocannabinoide.

Fuente. Zuñiga (2014).

Los CB1 son receptores metabotrópicos con mayor presencia en el cerebro, en varios órganos periféricos; adipocitos, hígado, pulmones, tracto gastrointestinal, células pancreáticas, los órganos reproductivos, el sistema inmunológico, entre otros. Los receptores CB2 se encuentran en las células del sistema inmunitario; macrófagos, neutrofilos, monocitos, linfocitos B, linfocitos T, células microgliales, fibras nerviosas de la piel, sistema nervioso central, entre otros (Mechoulam et al., 2013, Pacher et al., 2016, Soria, et al., 2019).

Los endocannabinoides son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga derivados de los fosfolípidos de membrana, específicamente del ácido araquidónico, estos actúan como llaves de los receptores cannabinoides. Los principales endocannabinoides son: anandamida y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 2013, Pacher et al., 2016) (ilustración 12).

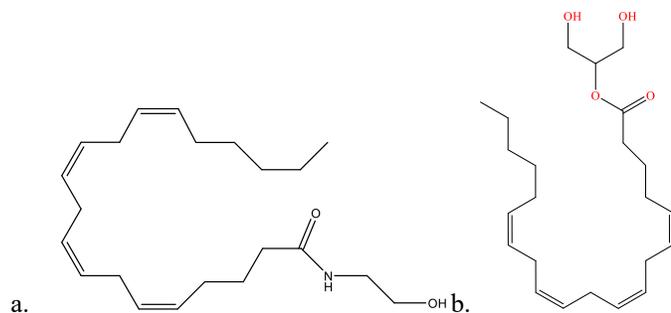


Ilustración 12.a. Anandamida y **b.** 2-araquidonilglicerol

Fuente. Niño (2014).

1.4. Uso tradicional y farmacológico de *Cannabis sativa* L.

La edad de oro de la farmacología de *Cannabis* comenzó en la década de 1960 cuando Raphael Mechoulam y sus colegas en Israel aislaron y sintetizaron cannabidiol, tetrahidrocannabinol y otros fitocannabinoides (Russo, et al., 2017; Fishedick, et al., 2010). En China la historia de utilización de *Cannabis* como cultivo de fibras y semillas es larga (Brand, et al., 2017). Inicialmente, THC obtuvo la mayor parte del interés de la investigación con atención esporádica al cannabidiol (CBD), que solo se ha reavivado en los últimos 15 años a través de una demostración de su notable versatilidad farmacológica y sinergia con el THC (Russo, et al., 2017). Debido a los diversos efectos observados en consumidores de *Cannabis*, surgió la idea que en el organismo deberían existir estructuras específicas a las cuales se unan los metabolitos del *Cannabis sativa* L. y producir sus efectos característicos. Así comenzó la exhaustiva investigación de un nuevo sistema, el sistema endocannabinoide (Grotenhermen, 2006, Turner, et al., 2017, Kinghorn, 2017).

Cannabis plantea un desafío para la medicina, de acuerdo con el paradigma de la farmacología de “compuesto único-objetivo único”. (Hazekamp, 2016, Gustavo, et al., 2019). El descubrimiento del sistema endocannabinoide reabrió el debate de la utilización terapéutica de la planta de *Cannabis*, así mismo proporcionó la oportunidad de estudiar con mayor exactitud los efectos adversos de los fitocannabinoides. El interés de los investigadores está en comprender y modular la actividad del sistema endocannabinoide con el fin de explotar su gran potencial terapéutico en una amplia gama de enfermedades que van desde trastornos del estado de ánimo y ansiedad, trastornos del movimiento como Parkinson y la enfermedad de Huntington, entre otros (Leung, 2011, Kuzdzal, 2016, Casajuana et al., 2017). Ya existen muchos estudios que detallan los beneficios de los compuestos más comunes de *Cannabis* enfocándose en su farmacología y los posibles efectos sinérgicos (Russo, 2019). Cuando se consume *Cannabis*, el cuerpo absorbe muchos fitocompuestos, cada uno con un efecto y beneficio específico, algunas fitomoléculas interactúan provocando una mayor actividad biológica, eso es lo que se conoce como el efecto séquito o sinérgico (Baron, 2018, Turner, et al., 2017, Gustavo, et al., 2019, Koltai, et al., 2020). Actualmente *Cannabis* y su amplia gama de componentes

activos son los responsables del potencial medicinal, existe evidencia que respalda la eficacia de *Cannabis* para el tratamiento de dolor crónico, epilepsia, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, cáncer, entre otras (Bernstein, et al., 2019, Byars, et al., 2019).

1.4.1 Efectos adversos de *Cannabis* y los cannabinoides

Se han realizado diferentes estudios en busca de conocer los efectos adversos de los cannabinoides, un documento importante que resume algunos de estos estudios es el presentado por Hall, 2018 (Hall, 2018), en el se realiza una revisión de la evidencia sobre la eficacia y seguridad del uso médico del *Cannabis* y los Cannabinoides, documento vinculado con el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA). Koppel, et al., 2014 (Koppel, et al., 2014), concluyeron que los extractos de *Cannabis* oral, de THC y savitex (nabiximols), son efectivos para reducir la espasticidad y el dolor central en pacientes con esclerosis múltiple a corto plazo, pero resultan ineficaces para reducir en el tiempo estos síntomas, atribuyendo posiblemente el resultado al mejoramiento del estado de ánimo o alivio del dolor que causan los cannabinoides en los pacientes, pero pueden ser los causantes de provocar temblor como síntoma secundario. Los autores también revisaron datos de los efectos adversos en pacientes con epilepsia, y encontraron que el 6,9% de los pacientes abandonan el tratamiento con cannabinoides debido a eventos adversos como: náuseas, debilidad, cambios de comportamiento o humor, ideación suicida, alucinaciones y mareos. En otro estudio, Whiting et al. 2015 (Whiting et al. 2015), realizaron una revisión de ensayos clínicos controlados de cannabinoides para usos médicos en bases de datos electrónicas de estudios científicos, en gran parte de estos estudios se consideró que los resultados tenían un alto riesgo de sesgo al comparar el efecto de cannabinoides como dronabinol con un placebo para estimular el apetito. La academia Nacional de Ciencias, Ingeniería y Medicina en el 2017, realizó un documento sobre los efectos del *Cannabis* y los cannabinoides en la salud. Otros autores que han abordado el tema a través del tiempo; Ashton, (1999) en el escrito “Adverse effects of *Cannabis* and cannabinoids”, Beaulieu, (2005) “Toxic effects of *Cannabis* and cannabinoids: animal data”, Cohen, et al., (2019) “Positive and negative effects of *Cannabis* and cannabinoids on health”.

1.5. Bibliografía

Aardema, M. L., & DeSalle, R. (2021). ¿Can public online databases serve as a source of phenotypic information for *Cannabis* genetic association studies?. *Plos one*, *16*(2), e0247607.

Ahmad, R., Tehsin, Z., Malik, S. T., Asad, S. A., Shahzad, M., Bilal, M., & Khan, S. A. (2016). Phytoremediation potential of hemp (*Cannabis sativa* L.): identification and characterization of heavy metals responsive genes. *CLEAN–Soil, Air, Water*, *44*(2), 195-201.

Aliferis, K. A., & Bernard-Perron, D. (2020). Cannabinomics: application of metabolomics in *Cannabis* (*Cannabis sativa* L.) research and development. *Frontiers in plant science*, *11*, 554

Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*, *7*, 19.

Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., & Ventura Martínez, R. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *45*(4), 1-6.

Ashton, C. H. (1999). Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *British Journal of anaesthesia*, *83*(4), 637-649.

Baek, S., Kim, Y. O., Kwag, J. S., Choi, K. E., Jung, W. Y., & Han, D. S. (1998). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Archives of Pharmacal*.

Baker, S. (2020). Carl Germano, CNS, CDN: Simple Guide to the Endocannabinoid System, Hemp Phytocannabinoids/CBD and Your Health. *Alternative therapies in health and medicine*, *26*, 32-34.

Baron, E. P. (2018). Medicinal properties of cannabinoids, terpenes, and flavonoids in *Cannabis*, and benefits in migraine, headache, and pain: an update on current evidence and *Cannabis* science. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, *58*(7), 1139-1186.

Barrett, M. L., Scutt, A. M., & Evans, F. J. (1986). Cannflavin A and B, prenylated flavones from *Cannabis sativa* L. *Experientia*, *42*(4), 452-453.

Barron, D., & Ibrahim, R. K. (1996). Isoprenylated flavonoids a survey. *Phytochemistry*, *43*(5), 921-982.

Beaulieu, P. (2005). Toxic effects of cannabis and cannabinoids: animal data. *Pain Research and Management*, *10*(Suppl A), 23A-26A.

Berman, P., Futoran, K., Lewitus, G. M., Mukha, D., Benami, M., Shlomi, T., & Meiri, D. (2018). A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis. *Scientific reports*, *8*(1), 1-15.

Bernstein, N., Gorelick, J., & Koch, S. (2019). Interplay between chemistry and morphology in medical Cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, *129*, 185-194.

Beutler, J. A., & Marderosian, A. H. (1978). Chemotaxonomy of Cannabis I. Crossbreeding between Cannabis sativa and C. ruderalis, with analysis of cannabinoid content. *Economic botany*, *32*(4), 387-394.

Bow, E. W., & Rimoldi, J. M. (2016). The structure–function relationships of classical cannabinoids: CB1/CB2 modulation. *Perspectives in medicinal chemistry*, *8*, PMC-S32171.

Booth, J. K., & Bohlmann, J. (2019). Terpenes in Cannabis sativa—From plant genome to humans. *Plant Science*, *284*, 67-72.

Brand, E. J., & Zhao, Z. (2017). Cannabis in Chinese medicine: ¿are some traditional indications referenced in ancient literature related to cannabinoids?. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 108.

Brenneisen, R. (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In *Marijuana and the Cannabinoids* (pp. 17-49). Humana Press.

Byars, T., Theisen, E., & Bolton, D. L. (2019, June). Using Cannabis to treat cancer-related pain. In *Seminars in oncology nursing* (Vol. 35, No. 3, pp. 300-309). WB Saunders.

Broseus, J., Anglada, F., & Esseiva, P. (2010). The differentiation of fibre-and drug type Cannabis seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools. *Forensic Science International*, *200*(1-3), 87-92.

Brzyski, P., & Fic, S. (2017). The application of raw materials obtained from the cultivation of industrial hemp in various industries. *Economic and Regional Studies (Studia Ekonomiczne i Regionalne)*, 10(673-2017-242), 100-113.

Carbone, M., Castelluccio, F., Daniele, A., Sutton, A., Ligresti, A., Di Marzo, V., & Gavagnin, M. (2010). Chemical characterization of oxidative degradation products of Δ^9 -THC. *Tetrahedron*, 66(49), 9497-9501.

Clarke, R. C., & Merlin, M. D. (2016). *Cannabis* Taxonomy: The ‘sativa’ vs ‘indica’ Debate. *HerbalGram*, 110, 44-49.

Capellán, L. M. (2012). *Síntesis y estudio de nuevos compuestos de acción dual y cannabinoides hidrosoluble* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).

Casajuana Kögel, C., López-Pelayo, H., Balcells-Olivero, M. M., Colom, J., & Gual, A. (2018). Psychoactive constituents of *Cannabis* and their clinical implications: a systematic review. *Adicciones*, 30(2).

Casano, S., Grassi, G., Martini, V., & Michelozzi, M. (2010, August). Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and 925* (pp. 115-121).

Charai, M., Sghiouri, H., Mezrhab, A., & Karkri, M. (2021). Thermal insulation potential of non-industrial hemp (Moroccan *Cannabis sativa* L.) fibers for green plaster-based building materials. *Journal of Cleaner Production*, 292, 126064.

Citti, C., Linciano, P., Forni, F., Vandelli, M. A., Gigli, G., Laganà, A., & Cannazza, G. (2019). Analysis of impurities of cannabidiol from hemp. Isolation, characterization and synthesis of cannabidibutol, the novel cannabidiol butyl analog. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 175, 112752.

Cohen, K., Weizman, A., & Weinstein, A. (2019). Positive and negative effects of cannabis and cannabinoids on health. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 105(5), 1139-1147.

Corni, G., Brighenti, V., Pellati, F., & Morlock, G. E. (2020). Effect-directed analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1629, 461511.

Crocq, M. A. (2020). History of *Cannabis* and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223.

Crombie, L., Tuchinda, P., & Powell, M. J. (1982). Total synthesis of the spirans of *Cannabis*: cannabispiradienone, cannabispirenone-A and-B, cannabispirone, α - and β -cannabispiranol and the dihydrophenanthrene cannithrene-1. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1477-1484.

Degenhardt, F., Stehle, F., & Kayser, O. (2017). The biosynthesis of cannabinoids. In *Handbook of Cannabis and related pathologies* (pp. 13-23). Academic Press.

De Meijer, E. P., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V. C., Ranalli, P., & Mandolino, G. (2003). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163(1), 335-346.

Djoko, B., Chiou, R. Y. Y., Shee, J. J., & Liu, Y. W. (2007). Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2376-2383.

El-Ferly FS, El-Sherei MM, Al-Muhtadi FJ (1986) Spiro-in- dans from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry* 25: 1992–1994

ElSohly, M. A. (Ed.). (2007). *Marijuana and the Cannabinoids*. Springer Science & Business Media.

ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Phytocannabinoids*, 1-36.

Framil, M. M. (2014). *Desarrollo de nuevos métodos de tratamiento de muestras de cabello para el control de drogas de abuso* (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).

Ferrer, C. (2005). *La Biblia del Cannabis*. CARENA EDITORS, SL.

Fischedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2058-2073.

Fetterman, P. S., Keith, E. S., Waller, C. W., Guerrero, O., Doorenbos, N. J., & Quimby, M. W. (1971). Mississippi-grown *Cannabis sativa* L.: Preliminary observation

on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(8), 1246-1249.

Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry reviews*, 7(3), 615-639

Florian, N. M., Parada, F., & Garzón, W. F. (2009). Estudio del contenido de cannabinoides en muestras de marihuana (*Cannabis sativa* L.) cultivadas en varias regiones de Colombia. *Vitae*, 16(2), 237-244.

Fournier, G. (1979). Le chanvre papetier (*Cannabis sativa* L.) cultivé en France: le point sur ses constituants.

Gaggiotti, S., Palmieri, S., Della Pelle, F., Sergi, M., Cichelli, A., Mascini, M., & Compagnone, D. (2020). Piezoelectric peptide-hpDNA based electronic nose for the detection of terpenes; Evaluation of the aroma profile in different *Cannabis sativa* L.(hemp) samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 308, 127697.

García, A. Á., & Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).

Gazmuri, A. M. (2014). Plantas maestras y *Cannabis*. Historia y mitos. *Psiquiatría y salud mental*, 31(2), 57-64.

Gomez, F. P., Hu, J., & Clarke, M. A. (2021). *Cannabis* as a Feedstock for the Production of Chemicals, Fuels, and Materials: A Review of Relevant Studies To Date. *Energy & Fuels*, 35(7), 5538-5557.

Government of Alberta. (2020) Growing Hemp in Alberta, Government of Alberta- Agriculture and Forestry With contributions by innotech Alberta. ISBN 978-1-4601-4778-8

<https://open.alberta.ca/publications/growing-hemp-in-Alberta>

Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*, 1(1), 10-14.

Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: origins and biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(10), 985-1004.

Gustavo, I. C., & Alibe, P. V. (2019). Del *Cannabis* a los cannabinoides una perspectiva médico-científica From *Cannabis* to cannabinoids a medical-scientific perspective. *Rev Med UAS; Vol*, 9(2).

Hall, W. (2018). A summary of reviews of evidence on the efficacy and safety of medical use of cannabis and cannabinoids. *Background paper commissioned by the EMCDDA for the report Medical Use of Cannabis and Cannabinoids: Questions and Answers for Policymaking*.

Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/terpenoids in *Cannabis*: are they important?. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 25-60.

Hao, D. C., Gu, X. J., & Xiao, P. G. (2015). 11-Phytochemical and biological research of *Cannabis* pharmaceutical resources. *Medicinal Plants*, 431-464.

Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. (2016). *Cannabis*: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to *Cannabis* classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 202-215.

Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American journal of botany*, 91(6), 966-975.

Hillig, K. W. (2004). A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochemical systematics and ecology*, 32(10), 875-891.

Janež, M., H., Brooke, R. T., & Zipp, B. J. (2017). Cannabinoid glycosides: In vitro production of a new class of cannabinoids with improved physicochemical properties. *BioRxiv*, 104349.

Jin, D., Dai, K., Xie, Z., & Chen, J. (2020). Secondary metabolites profiled in *Cannabis* inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.

Kinghorn, H. Falk, Gibbons S. (2017). *Progress in the chemistry of organic natural products*. Phytocannabinoids unraveling the complex chemistry and pharmacology of *Cannabis sativa*. Editorial Board. Springer. Volume 103 ISSN (electronic) 2192-4309-2017.

Koltai, H., & Namdar, D. (2020). *Cannabis* phytomolecule 'Entourage': from domestication to medical use. *Trends in plant science*, 25(10), 976-984.

Koppel, B. S., Brust, J. C., Fife, T., Bronstein, J., Youssof, S., Gronseth, G. and Gloss, D. (2014), 'Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected

neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology', *Neurology* 82, pp. 1556-1563.

Kornpointner, C., Martinez, A. S., Marinovic, S., Haselmair-Gosch, C., Jamnik, P., Schröder, K., & Halbwirth, H. (2021). Chemical composition and antioxidant potential of *Cannabis sativa* L. roots. *Industrial Crops and Products*, 165, 113422.

Kostecki, K., Engelmeier, D., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S., & Greger, H. (2004). Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona cf. pierrei*. *Phytochemistry*, 65(1), 99-106.

Kumar, T. A., Kumar, J. S., & Kumar, J. V. (2017). Fabrication and Investigation of Mechanical Properties Hemp Fiber Reinforced Polyester Composites.

Kuzdzal, S. A. (2016). Medicinal Cannabinomics & Mass Spectrometry Applications to *Cannabis* Testing Laboratories. *The State-of-the-Art Technologies from Japan: Analytical Instruments with/for Nano-Chemistry Technology and Advanced Diagnostics*, 33.

Lara Ochoa, B. O. (2018). Evaluación de la *Cannabis sativa* industrializada (cáñamo industrial), en la restauración de suelos contaminados con metales pesados.

Lee, S. K., Lee, H. J., Min, H. Y., Park, E. J., Lee, K. M., Ahn, Y. H., & Pyee, J. H. (2005). Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia*, 76(2), 258-260.

León-Ahumada, P. Y., & Márquez-Montero, D. V. (2021). Canadá en la industria y el comercio del *Cannabis* colombiano.

Leung, L. (2011). *Cannabis* and its derivatives: review of medical use. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 24(4), 452-462.

Lynch, M. (2020). *Cannabis* Genetics Guide: Phenotypes, Lineage, and more. Way of Leaf. <https://wayofleaf.com/education/cannabis-genetics-guide>

Lowe, H., Steele, B., Bryant, J., Toyang, N., & Ngwa, W. (2021). Non-cannabinoid metabolites of *Cannabis sativa* L. With therapeutic potential. *Plants*, 10(2), 400.

Maayah, Z. H., Takahara, S., Ferdaoussi, M., & Dyck, J. R. (2020). The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum *Cannabis* extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(7), 165771.

Magagnini, G., Grassi, G., & Kotiranta, S. (2018). The effect of light spectrum on the morphology and cannabinoid content of *Cannabis sativa* L. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 1(1), 19-27.

McPartland, J. M., & Russo, E. B. (2001). *Cannabis* and *Cannabis* extracts: ¿greater than the sum of their parts?. *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1(3-4), 103-132.

McPartland, J., & Mediavilla, V. (2002). *Noncannabinoid components* (pp. 401-409). Haworth Press, New York.

McPartland, J. M., & Russo, E. B. (2014). *Cannabis* and *Cannabis* Extracts: Greater Than the Sum of Their Parts?. *The Handbook of Cannabis Therapeutics: From Bench to Bedside*, 171.

McPartland, J. M. (2018). *Cannabis* systematics at the levels of family, genus, and species. *Cannabis and cannabinoid research*, 3(1), 203-212.

McPartland, J. M., & Small, E. (2020). A classification of endangered high-THC *Cannabis* (*Cannabis sativa* subsp. *Indica*) domesticates and their wild relatives. *PhytoKeys*, 144, 81.

McLaren, J., Swift, W., Dillon, P., & Allsop, S. (2008). *Cannabis* potency and contamination: a review of the literature. *Addiction*, 103(7), 1100-1109.

Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). *Cannabis sativa* L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864.

Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual review of psychology*, 64, 21-47.

Ministerio de Salud – Colombia. (2017). Decreto 613 del 2017. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/decreto-613-de-2017.pdf>

Mirski, R., Boruszewski, P., Trociński, A., & Dziurka, D. (2017). The possibility to use long fibres from fast growing hemp (*Cannabis sativa* L.) for the production of boards for the building and furniture industry. *BioResources*, 12(2), 3521-3529.

- Miyazawa, M., & Yamafuji, C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1765-1768.
- Mora Aguilar, J. S. (2020). Análisis de ciclo de vida en cultivo de *Cannabis sp.* Medicinal Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/1882
- Molnar, J., Csiszar, K., Nishioka, I., & Shoyama, Y. (1986). The effects of cannabispino compounds and tetrahydrocannabidiolic acid on the plasmid transfer and maintenance in *Escherichia coli*. *Acta microbiologica Hungarica*, 33(3), 221-231.
- Mudge, E. M., Murch, S. J., & Brown, P. N. (2018). Chemometric analysis of cannabinoids: chemotaxonomy and domestication syndrome. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2017). The health effects of cannabis and cannabinoids: the current state of evidence and recommendations for research.
- Nemeškalová, A., Hájková, K., Mikulů, L., Sýkora, D., & Kuchař, M. (2020). Combination of UV and MS/MS detection for the LC analysis of cannabidiol-rich products. *Talanta*, 219, 121250.
- Niño, F. M., & Vidales, G. T. (2014). Los endocannabinoides como una futura herramienta para el tratamiento de cáncer. *Revista Venezolana de Oncología*, 26(3), 158-174.
- Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., & Goda, Y. (2013). DNA sequence analyses of blended herbal products including synthetic cannabinoids as designer drugs. *Forensic science international*, 227(1-3), 33-41.
- Navas González, S. V. (2019). Puesta a punto de un panel de marcadores moleculares que permitan diferenciar variedades y determinar el sexo en plantas de *Cannabis*.
- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), 389-462.
- Pastrana Isaza, J. A. (2020). *Cannabis medicinal oportunidad de negocio en Colombia o solo un espejismo* (Doctoral dissertation, Universidad del Rosario).

Parvez, A. M., Lewis, J. D., & Afzal, M. T. (2021). Potential of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) for bioenergy production in Canada: Status, challenges and outlook. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *141*, 110784.

Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *BioMed research international*, *2018*.

Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, *2*(3), 119-145.

Pertwee, R. G. (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British journal of pharmacology*, *147*(S1), S163-S171

Pichini, S., Malaca, S., Gottardi, M., Pérez-Acevedo, A. P., Papaseit, E., Perez-Maña, C., & Busardò, F. P. (2021). UHPLC-MS/MS analysis of cannabidiol metabolites in serum and urine samples. Application to an individual treated with medical *Cannabis*. *Talanta*, *223*, 121772.

Ramírez, J. M. (2019). La industria del *Cannabis* medicinal en Colombia.

Rangel-Ch, J. O. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *39*(151), 176-200.

Ren, G., Zhang, X., Li, Y., Ridout, K., Serrano-Serrano, M. L., Yang, Y., & Fumagalli, L. (2021). Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science advances*, *7*(29), eabg2286.

Rendón Acosta, J. A. (2021). Los límites jurídicos de la comercialización del *Cannabis* en Colombia.

Rijavec, T., Janjić, S., & Ačko, D. K. (2017). Revitalization of Industrial Hemp *Cannabis sativa* L. var. *sativa* in Slovenia: a Study of Green Hemp Fibres. *Tekstilec*, *60*(1).

Rivera, N. M. (2019). The Challenges of Medicinal *Cannabis* in Colombia-A Look at Small-and Medium-Scale Growers. *Policy Briefing*, *52*.

Ross, S., & EISohly, M. (1995). Constituents of *Cannabis Sativa* L. XXVIII A review of the natural constituents: 1980-1994. *Zagazig journal of pharmaceutical sciences*, *4*(1), 1-10.

Ross, S. A., ElSohly, M. A., Sultana, G. N., Mehmedic, Z., Hossain, C. F., & Chandra, S. (2005). Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16(1), 45-48.

Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential *Cannabis* synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344-1364

Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). *Cannabis* pharmacology: the usual suspects and a few promising leads. *Advances in pharmacology*, 80, 67-134

Russo, E. B. (2019). The case for the entourage effect and conventional breeding of clinical *Cannabis*: no “strain,” no gain. *Frontiers in plant science*, 9, 1969.

Schilling, S., Melzer, R., & McCabe, P. F. (2020). *Cannabis sativa*. *Current Biology*, 30(1), R8-R9.

Small, E., & Beckstead, H. D. (1973). Cannabinoid phenotypes in *Cannabis sativa*. *Nature*, 245(5421), 147-148.

Small, E., & Cronquist, A. (1976). A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, 405-435.

Schultes, R. E., Klein, W. M., Plowman, T., & Lockwood, T. E. (2011). *Cannabis*: an example of taxonomic neglect. In *Cannabis and culture* (pp. 21-38). De Gruyter Mouton.

Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The *Cannabis* Terpenes. *Molecules*, 25(24), 5792.

Soria-Lara, D. M., Gaitán-Vélez, B. V., Jiménez-Islas, H., & Miranda-López, R. (2019). El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la mangiferina. *Revista biomédica*, 30(2), 83-102.

Stasiulewicz, A., Znajdek, K., Grudzień, M., Pawiński, T., & Sulkowska, J. I. (2020). A guide to targeting the endocannabinoid system in drug design. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2778.

Staginnus, C., Zörntlein, S., & de Meijer, E. (2014). A PCR marker Linked to a THCA synthase Polymorphism is a Reliable Tool to Discriminate Potentially THC-Rich Plants of *Cannabis sativa* L. *Journal of forensic sciences*, 59(4), 919-926.

Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., & Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22586-22594.

Stolker, A. A. M., Van Schoonhoven, J., De Vries, A. J., Bobeldijk-Pastorova, I., Vaes, W. H. J., & Van Den Berg, R. (2004). Determination of cannabinoids in *Cannabis* products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1058(1-2), 143-151.

Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007). Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS letters*, 581(16), 2929-2934.

Tejedor Tejada, E. (2021). Determinación de los cannabinoides y terpenos en muestras de *Cannabis* y resina de *Cannabis* en Castilla y León.

Tomko, A. M., Whynot, E. G., Ellis, L. D., & Dupré, D. J. (2020). Anti-cancer potential of cannabinoids, terpenes, and flavonoids present in *Cannabis*. *Cancers*, 12(7), 1985.

Turner, C. E., Elsohly, M. A., & Boeren, E. G. (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of natural products*, 43(2), 169-234.

Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). Molecular pharmacology of phytocannabinoids. *Phytocannabinoids*, 61-101.

Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current biology*, 16(3), 296-300.

Vanhoenacker, G., Van Rompaey, P., De Keukeleire, D., & Sandra, P. (2010). Chemotaxonomic features associated with flavonoids of cannabinoid-free *Cannabis* (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) in relation to hops (*Humulus lupulus* L.). *Natural product letters*.

Yamada, M., Hayashi, K. I., Hayashi, H., Ikeda, S., Hoshino, T., Tsutsui, K., & Nozaki, H. (2006). Stilbenoids of *Kobresia nepalensis* (Cyperaceae) exhibiting DNA topoisomerase II inhibition. *Phytochemistry*, 67(3), 307-313.

Yoshimatsu, K., Kitazawa, T., Kawano, N., Iida, O., & Kawahara, N. (2010). Characteristics of *Cannabis sativa* L.: seed morphology, germination and growth characteristics, and distinction from *Hibiscus cannabinus* L. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 130(2), 237-246.

Zúñiga-Ayalaa, M., & López-Ávilab, A. (2014). Terapia antitumoral con el uso de cannabinoides, un descubrimiento que podría cambiar la evolución del cáncer. *www.smeo.org.mx*, 13(4), 244-251.

CAPÍTULO 2. Evaluación morfológica de *Cannabis sativa* L. que se cultiva en el departamento del Cauca

2.1 Resumen

Cannabis es una planta con mucho interés en diferentes campos, no sólo por sus propiedades terapéuticas, sino por su aplicación en campos como la construcción, los cosméticos, los alimentos, entre otros. En Colombia, a partir de la legalización del *Cannabis*, las leyes y trámites estipulados para reglamentar el cultivo y uso del *Cannabis*, lo realizan entidades como el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), quien ha diseñado estrategias que permiten a los productores certificar las variedades que cultivan, a través del análisis de los diferentes caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos. En el presente estudio, se realizó la evaluación morfológica de cuatro variedades de *Cannabis* cultivadas en el departamento del Cauca-Colombia, apoyados de la prueba de evaluación agronómica, la cual permitió identificar que los caracteres de crecimiento y contenido de cannabinoides son decisivos en la diferenciación de las variedades. Con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza ANOVA a través del programa XLSTAT.

Palabras claves: Morfología de *Cannabis sativa* L., Prueba de Evaluación Agronómica (PEA), Genotipos.

2.2 Summary

Cannabis is a plant with great interest in different fields not only for its therapeutic properties, but also for its application in fields such as construction, cosmetics, food, among others. In Colombia, from the legalization of *Cannabis*, the laws and procedures stipulated to regulate the cultivation and use of *Cannabis*, entities such as the Colombian Agricultural Institute (ICA), have designed strategies that allow producers to certify the varieties they grow, at through the analysis of the different qualitative and quantitative morphological characters. In the present study, the morphological evaluation of four varieties of *Cannabis* cultivated in the department of Cauca-Colombia was carried out,

supported by the agronomic evaluation test, which allowed to identify that the growth characteristics and content of cannabinoids are decisive in the differentiation of the varieties. With the data obtained, ANOVA analysis of variance was performed through the XLSTAT program.

Keywords: Morphology of *Cannabis sativa* L., Agronomic Evaluation Test (PEA), Genotypes.

2.3 Introducción

Cannabis es una planta con muchos efectos farmacológicos que están siendo estudiados y documentados, dichos efectos depende de la composición química, especialmente del perfil de cannabinoides. Por ello, resulta muy importante identificar los factores genéticos, ambientales y de crecimiento que afectan la morfología y el perfil de cannabinoides. Estudios como el realizado por Livingston y colaboradores en el 2020, muestra la importancia de los tricomas glandulares en la morfología y contenido de metabolitos durante la maduración de las flores de *Cannabis* (Elsohly et al., 2017). Estudios como el realizado por Adema y colaboradores en el 2021, donde se analizó una amplia gama de rasgos fenotípicos, como el contenido de THC y CBD, rasgos de crecimiento como altura, el área de crecimiento y el rendimiento floral, concluyendo que *Cannabis* requiere un fenotipado específico y controlado, dejando 201 catálogos de caracteres fenotípicos basados en la web, 46 basados en medidas cuantitativas de contenido químico y 155 de rasgos entre los que se incluían de crecimiento, afectivos fisiológicos o neurológicos, de sabor y usos medicinales. Hazekamp y colaboradores en el 2016, analizaron 460 accesiones de *Cannabis* de países bajos, donde se identificaron los componentes de *Cannabis* que pueden actuar como marcadores para distinguir entre *Sativa* e *Indica*.

Al evaluar los cultivos de *Cannabis* no solo se debe tener en cuenta el peso de las flores, sino la composición química del producto final. Por lo cual los productores buscan mejorar los rendimientos y contar con producciones continuas y uniformes de los cannabinoides de interés, lo que ha llevado a cambiar o tecnificar los invernaderos al

exterior, por invernaderos en interiores o cámaras de crecimiento controladas y cerradas. Uno de los factores de crecimiento más importante en el cultivo de *Cannabis* es la luz; la calidad de la luz y el fotoperíodo. Estudios como el de Magagnini en el 2018, se enfocaron en examinar los efectos de diferentes fuentes de luz sobre la morfología y la producción de cannabinoides. Diferentes estudios donde se examinan los caracteres morfológicos de especies de *Cannabis* se han realizado (Schultes, et al., 1974, Small, et al., 1976, Yoshimatsu, et al., 2010, Fishedick, et al., 2010, McPartland, et al., 2020). Al igual que estudios utilizando herramientas quimiométricas (Broseus, et al., 2010, Ángeles, et al., 2014, Staginnus, et al., 2014, Mudge, et al., 2018, Ren, et al., 2021).

Para los productores es muy importante el reconocimiento del material vegetal, es por ello que actualmente existen programas para resolver los problemas de propiedad intelectual como identificación genética; la empresa Israelí Tikun-Olam Cannbit ha desarrollado la tecnología *Cannabis* Genetic Fingerprinting (CGF), un sistema para identificar y rastrear las cepas de *Cannabis* a partir de sus códigos genéticos. En Colombia; el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, solicita a los cultivadores realizar Pruebas de Evaluación Agronómica (PEA) de genotipos de *Cannabis* en cumplimiento de la Resolución 067516 del 2020, los cultivadores con Registro como productor de Semilla Seleccionada y PEA, deben registrar las variedades de *Cannabis* en el Registro Nacional de Cultivares. Para el cumplimiento de los requisitos solicitados, se utilizan diferentes metodologías analíticas para identificar y cuantificar la presencia de los cannabinoides en las inflorescencias de *Cannabis*, varios estudios reportan las condiciones y protocolos (Namdar, et al., 2018, Križman, 2020).

En el presente capítulo se reporta el análisis del efecto genotípico, ambiental y la interacción genotipo-ambiente a través de la evaluación de los descriptores morfológicos, que incluyen tanto características cualitativas como cuantitativas de cada variedad. Estos descriptores incluyen todos los estados fenológicos de desarrollo de los 4 fenotipos o variedades de las plantas de *Cannabis sativa* L. desde semilla hasta cosecha, plantas cultivadas en el departamento del Cauca que serán identificadas morfológicamente a través del análisis de los descriptores cualitativos y cuantitativos evaluados en la PEA.

Los datos obtenidos fueron procesados por el método estadístico análisis de varianza ANOVA a través del programa XLSTAT, los resultados permitieron identificar las diferencias más relevantes entre las cuatro variedades.

2.4 Resultados

Los cuatro fenotipos o variedades seleccionadas corresponden a material obtenido como resultado de la diferenciación genética de la empresa Natura Pharma S.A.S en la subregión geográfica del río Cauca. Los resultados obtenidos al realizar la prueba de evaluación agronómica (PEA), llevaron al registro y aprobación de las variedades por las autoridades de Colombia con código ICA PEA N° 19-0116. En la tabla 4 se observa la procedencia y el tipo de material al que corresponden las variedades A, B, C y D. Dichas variedades fueron seleccionadas de un total de 15 variedades suministradas inicialmente por el productor, la selección se realizó teniendo en cuenta los resultados arrojados por la PEA, especialmente los resultados obtenidos mediante el análisis preliminar por Cromatografía Líquida de Alta resolución. Se buscó variedad en la concentración de CBD Total, por lo cual se seleccionaron dos variedades con alto contenido (A y D) y dos variedades con contenido medio (B y C).

Tabla 4. *Procedencia de las variedades analizada.*

VARIEDAD	LUGAR DE PROCEDENCIA	TIPO DE MATERIAL	OBTENTOR
A	Corinto	No Psicoactiva	Fuente semillera NPC
B	Miranda	No Psicoactiva	Fuente semillera NPC
C	Miranda	No Psicoactiva	Fuente semillera NPC
D	Toribio	No Psicoactiva	Fuente semillera NPC



Ilustración 13. *Invernadero Natura Pharma S.A.S*

Fuente. C. O. Fernández (2021).

En la tabla 5 se encuentran los datos de la ubicación de las variedades, el sitio donde se ubica el invernadero (ver ilustración 13), y donde se realizó la prueba de evaluación agronómica (PEA).

Tabla 5. Datos de la ubicación de la Prueba de Evaluación Agronómica (PEA).

Municipio	Santander de Quilichao
Corregimiento	Mondomo
Vereda: Las Playas	Las Playas
Finca: el Porvenir.	El porvenir
GPS	N 2° 53' 27,12" O 76° 33' 09,64"
Altura sobre el nivel del mar (msnm)	1350
Agricultor / Empresa	NATURA PHARMA CAUCA SAS ZOMAC

En la ilustración 14, se observa las imágenes correspondientes a las variedades de *Cannabis* estudiadas.

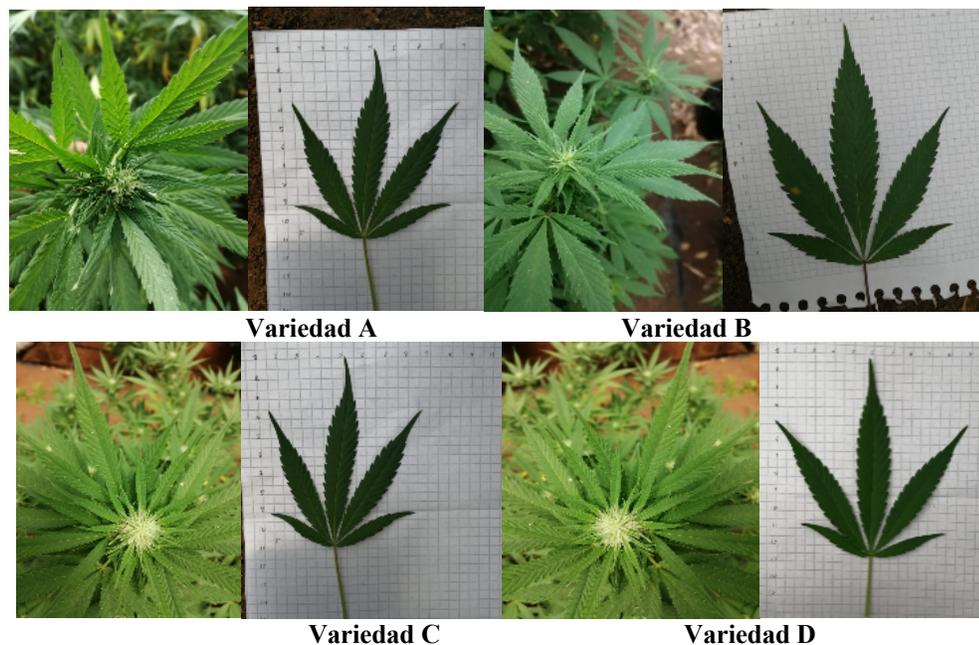


Ilustración 14. Imágenes de las variedades A, B, C y D.

Fuente. P. Arango (2021).

En la tabla 6, se registran las 23 variables (caracteres o descriptores) que se analizaron para realizar la caracterización morfológica de las variedades A, B, C y D.

Estos descriptores permitieron identificar las diferencias significativas entre las 4 variedades.

Tabla 6. *Variables de la Prueba de Evaluación Agronómica.*

ITEM	VARIABLES	EPOCA	TIPO DE VARIABLE
1	Número de foliolos	Floración - Madurez	Fenotípica
2	Pigmentación antocianica peciolo	Final de floración	Fenotípica
3	Color del tallo principal	Final de floración	Fenotípica
4	Días a floración masculina	Floración	Crecimiento
5	Días a floración femenina	Floración	Crecimiento
6	Días a cosecha	Cosecha	Crecimiento
7	Proporción de plantas hermafroditas (%)	Floración	Fenotípica
8	Proporción de plantas femeninas (%)	Floración	Fenotípica
9	Proporción de plantas masculinas (%)	Floración	Fenotípica
10	Intensidad del color verde de la hoja	Floración	Fenotípica
11	Longitud del peciolo (cm)	Floración	Fenotípica
12	Longitud del foliolo central de la hoja (cm)	Floración	Fenotípica
13	Ancho del foliolo central de la hoja (cm)	Floración	Fenotípica
14	Altura de la planta (cm)	Final de floración	Crecimiento
15	Grosor del tallo principal (cm)	Floración	Crecimiento
16	Altura de tallo por planta (cm)	Cosecha	Crecimiento
17	Número de tallos por planta	Cosecha	Crecimiento
18	Longitud del entrenudo en el tallo principal (cm)	Final de floración	Crecimiento
19	Rendimiento en flores (g/m ²)	Cosecha	Rendimiento
20	Rendimiento de biomasa (g/m ²)	Cosecha	Rendimiento
21	Contenido de THC (%)	Cosecha	Contenido de Cannabinoides
22	Contenido de CBD (%)	Cosecha	Contenido de Cannabinoides
23	Contenido de CBG (%)	Cosecha	Contenido de Cannabinoides

2.4.1 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres (3) repeticiones. Para el análisis estadístico se utilizó el programa XLSTAT, se realizó análisis de varianza ANOVA a los datos obtenidos en la PEA. Un total de 180 datos, 45 de cada una de las variedades. El intervalo de confianza del 95 %. La siembra se realizó en unidades experimentales de 12 m². Distancia entre surcos de 0,8 m, distancia entre plantas de 0,5 m, número de surcos por unidad experimental de 2, número de plantas por surco de 10,

longitud de los surcos de 6 m, distancia entre surcos de parcelas de 1,2 m entre unidades experimentales, en una localidad (ilustración 15).

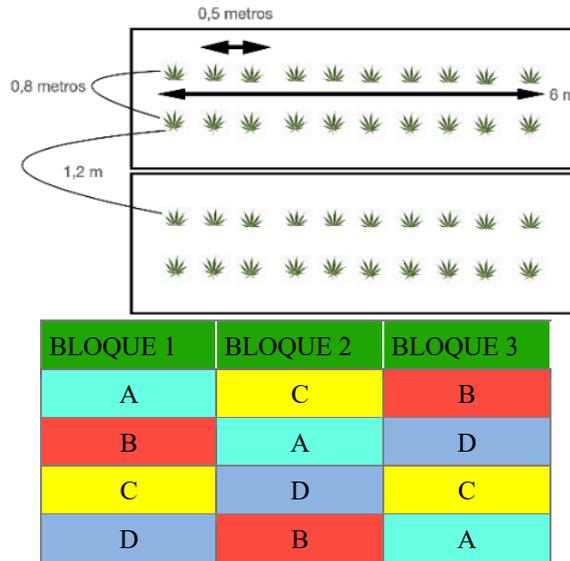


Ilustración 15. Distribución de la prueba de evaluación agronómica (PEA) para las cuatro variedades de *Cannabis sativa* L.

Fuente. Natura Pharma Cauca (2020).

Las condiciones climáticas se referencian en la ilustración 16, los registros son semanales para las variables temperatura máxima, mínima y media, con datos de 26,5, 15,5 y 20,5 °C, respectivamente. La mayor precipitación se registró entre las semanas 6 y 10 del desarrollo vegetativo, entre 30 y 40 mm /semana, y menos a 26 mm en la etapa reproductiva. Los valores de humedad relativa máxima, media y mínima fueron de 97, 88 y 77 %.

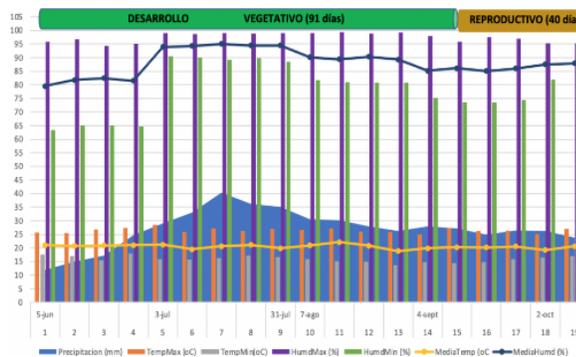


Ilustración 16. Registro de las variables climáticas en la PEA para las variedades de *Cannabis sativa* L. en el valle geográfico del río Cauca.

Fuente. Natura Pharma SAS (2020).

2.4.2 Desarrollo Fenológico

En la tabla 7 se registran los datos obtenidos de los caracteres de desarrollo fenológico evaluados los cuales permitieron definir para las cuatro variedades (A, B, C y D), 91 días (13 semanas) de estado vegetativo, se adicionó luz extra hasta lograr una longitud del tallo principal aceptable para iniciar la fase reproductiva, la cual desarrolló en 40 días (5,7 semanas) hasta la cosecha, el ciclo total de 132 días (18,8 semanas). El tipo de floración para las cuatro variedades correspondió a 100 % flores femeninas y las 4 variedades registraron 5 foliolos por hoja.

Tabla 7. Datos desarrollo fenológico de las variedades de Cannabis.

VARIEDAD	# DE FOLIOLOS	NÚMERO DE DÍAS		% FLORES		
		Floración	Cosecha	Femeninas	Masculinas	Hermafroditas
A	5	91	132	100	0	0
B	5	91	132	100	0	0
C	5	91	132	100	0	0
D	5	91	132	100	0	0

Los datos obtenidos al evaluar los tres órganos; hoja, flor y tallo se registran en la tabla 8, entre los cuatro genotipos se logró observar variación en los grados de pigmentos antociánica del pecíolo y en la intensidad del color verde de la hoja; en las variedades A y C se observó una pigmentación débil y ausente, respectivamente. La variedad D, presentó pigmentación media y la variedad B, una pigmentación muy fuerte. El color verde de la hoja de las variedades paso de ligero en la D, a medio en A y C hasta oscuro en B.

Tabla 8. Datos de las variables fenotípicas de las variedades A, B, C y D.

GENOTIPO	PIGMENTACIÓN ANTOCIÁNICA DEL PECÍOLO	COLOR DEL TALLO PRINCIPAL	INTENSIDAD COLOR VERDE DE LA HOJA
A	Débil	Verde	Medio
B	Muy fuerte	Verde	Oscuro
C	Ausente	Verde	Medio
D	Medio	Verde	Ligero

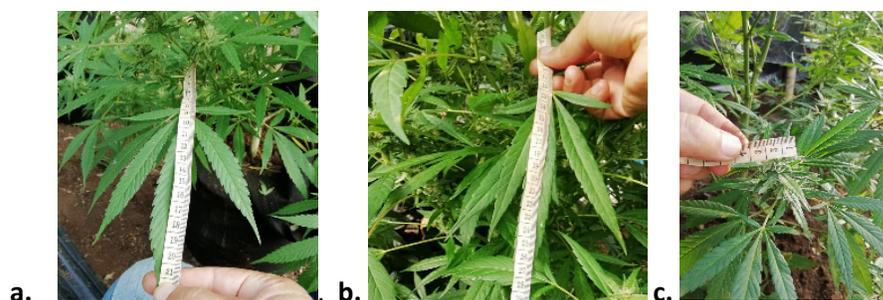


Ilustración 17. a. Medición variables longitud del pecíolo, b. medición de la longitud del foliolo y c. medición de la anchura del foliolo

Fuente. P. Arango (2021).

En la tabla 9 se muestran los resultados de la evaluación de las variables fenotípicas: longitud de pecíolo, registró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), longitud y ancho del foliolo, en general no se observó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), lo que puede ser explicado por la uniformidad de éstos componentes foliares en los cuatro genotipos evaluados; A, B, C y D (ilustración 17). En el gráfico 1, se observa las medias de los caracteres fenotípicos; la longitud de pecíolo en la variedad A presentó valores entre 5,1 - 10,0 cm, en la variedad B entre 5,9 - 9,4 cm, la variedad C entre 5,6 - 8,9 cm, con valores de media muy similares entre 7,424 - 7,638 cm, un poco diferentes a la variedad D con un valor de media de 8,120 cm, con valores entre 6,5 - 11,5 cm. En la longitud y ancho del foliolo; las variedades B, C y D son similares con valores de media entre 9,847 - 9,918 cm., la variedad B registró valores de longitud de foliolo entre 7,6 - 14,5 cm., la variedad C entre 7,8 - 13,1 cm, y la variedad D entre 4,6 - 14,1 cm., la variedad A presentó el valor de media más alto con 10,122 cm, con valores entre 6,5 - 12,9 cm. Los valores obtenidos de anchura de foliolo se comportan de la misma forma, con valores de la variedad A entre 1,2 - 3,1 cm., valores de la variedad B entre 1,2 - 2,9 cm, en la variedad C entre 1,23 - 2,34 cm., los valores de la variedad D entre 1,1 - 2,7 cm, (Ver tabla 7).

Tabla 9. Comparación de medias de las variables fenotípicas de las variedades de Cannabis.

Variedad	Longitud Pecíolo (cm) \pm DE	Longitud Foliolo (cm) \pm DE	Anchura Foliolo (cm) \pm DE
A	7.536 \pm 1.089	*10.122 \pm 1.534	*2.080 \pm 0.474
B	7.638 \pm 0.885	9.847 \pm 1.588	1.916 \pm 0.413
C	7.424 \pm 0.697	9.886 \pm 1.303	1.907 \pm 0.269
D	*8.120 \pm 1.340	9.918 \pm 2.249	1.842 \pm 0.395

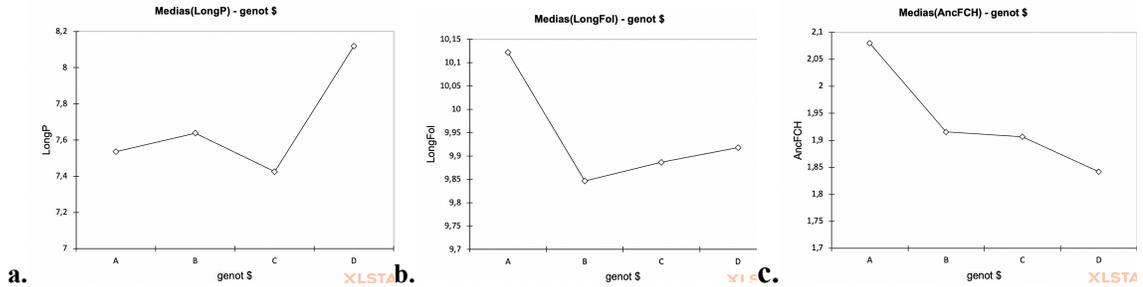


Gráfico 1. Media de las variables a. longitud del peciolo, b. longitud del foliolo y c. anchura del foliolo

2.4.3 Variables de Crecimiento

Para los cuatro genotipos analizados se encontraron diferencias estadísticas significativas para las variables de crecimiento (ilustración 18). Los valores de altura de las plantas están en el rango entre 134,9 - 220,3 cm, los valores de altura del tallo cosechado entre 47 - 123 cm, los valores de grosor del tallo entre 4,5 - 9,5 cm, el número de tallos por planta entre 2 - 5 y la longitud entrenudos entre 4,6 – 12,0 cm, los valores se registran en la tabla 10 ($p < 0,0001$). Los valores medios muestran que los tallos de cosecha con mayor altura correspondieron al genotipo A, con 89,244 cm, seguido del genotipo D con 70,289 cm y los genotipos B y C con valores de 50,244 cm y 49,511 cm, respectivamente. Los valores del grosor del tallo principal muestran el mayor diámetro en el genotipo A, con un valor de 7,804 cm y en los genotipos B y C valores muy cercanos entre ellos de 6,998 cm y 6,955 cm, el genotipo D presenta el menor diámetro con un valor de 5,904 cm (ver gráfico 2). La variedad A, presenta el valor más alto de longitud de entrenudos del tallo principal; 8,284 cm, seguido de la variedad C con un valor de 7,964 cm y los valores más cortos corresponden a las variedades B y D; 6,975 y 6,280 cm, respectivamente (ver gráfico 2).



Ilustración 18. a. Medición variables grosor del tallo, b. Número de tallos/planta y c. longitud entrenudos.

Fuente. P. Arango (2021)

Tabla 10. Comparación de medias de las variables de crecimiento de las variedades A, B, C y D.

Variedad	Altura de la planta (cm) ± DE	Altura de tallo cosechado (cm) ± DE	Grosor de tallo (cm) ± DE	Número de tallos /planta ± DE	Longitud entrenudos (cm) ± DE
A	*198.506 ± 4.785	*89.244 ± 14.117	*7.804 ± 0.966	5.000 ± 0.000	*8.284 ± 1.697
B	139.676 ± 2.277	50.244 ± 7.030	6.998 ± 0.953	3.933 ± 0.809	6.975 ± 1.180
C	161.598 ± 9.604	49.511 ± 6.710	6.955 ± 0.410	4.066 ± 0.863	7.964 ± 0.824
D	171.582 ± 5.956	70.289 ± 10.083	5.904 ± 0.971	*5.889 ± 0.775	6.280 ± 1.009

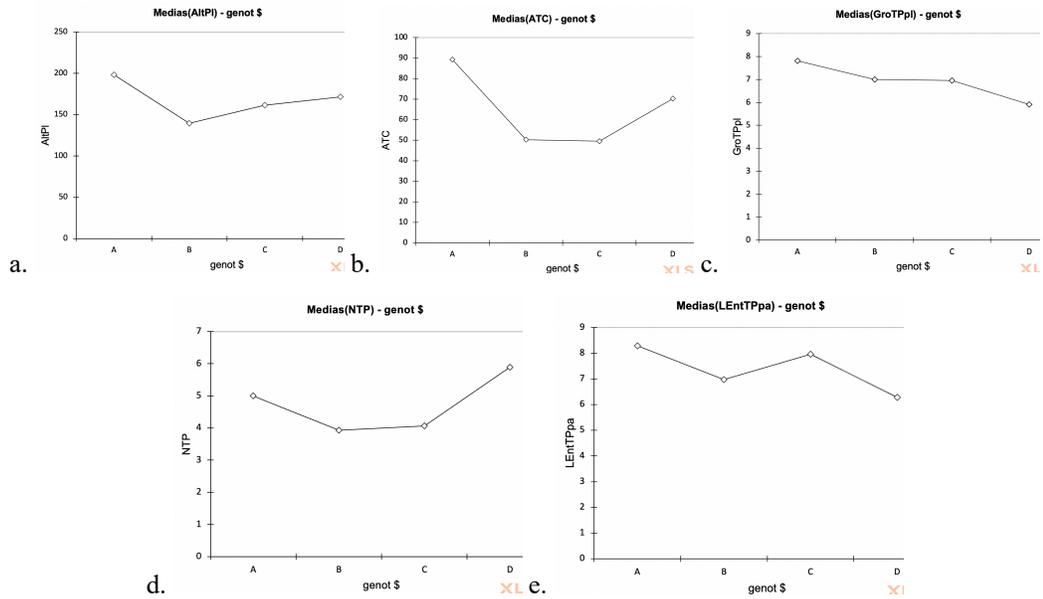


Gráfico 2. Media de las variables a. altura de la planta, b. altura del tallo cosechado c. grosor del tallo d. número de tallos por plantas. e. longitud de entrenudos.

2.4.4 Variables de Rendimiento

Las variables relacionadas con el rendimiento; biomasa fresca y biomasa de flores por planta muestran resultados de biomasa fresca entre 750 - 1930 g/m² y la biomasa de flores entre 290 - 420 g/m². Siendo el genotipo A, la variedad que acumuló la mayor cantidad de biomasa total por planta y por área (m²) al final del ciclo productivo con 1253 g, seguida del genotipo B con un valor de 1164 g y las variedades C y D con valores muy cercanos de 1119 y 1118 g respectivamente (ver tabla 11).

La variable peso fresco de flor, los genotipos A, B y D presentaron valores muy cercanos de 298,87, 302,76 y 281 g, respectivamente. El genotipo C presentó el valor más alto con 452,93 g. Los genotipos analizados presentan porcentajes de biomasa en los

órganos cosechados entre el 24 y 26 % para flores, entre 17 % para tallos y entre 58 y 59 % para hojas y tallos principales para las variedades A, B y D. La variedad C presentó los valores más altos en toda la distribución de biomasa 40% de flor y 24 % de tallos (ver tabla 12).

Tabla 11. Comparación de medias de las variables de rendimiento de las variedades de Cannabis.

Variedad	Biomasa fresca (g)	Densidad de biomasa planta (g/m ²)
A	298.867	*1253.178
B	302.756	1164.022
C	*452.935	1119.045
D	280.844	1118.244

Tabla 12. Distribución del porcentaje de biomasa de las variedades A, B, C y D.

DISTRIBUCIÓN BIOMASA (%)			
Variedad	Flor (%)	Tallos Ramas (%)	Hojas + Tallos (%)
A	24	17	59
B	26	17	58
C	*40	*24	*36
D	25	17	58

Los resultados que se presentan en las tablas corresponden al promedio de los datos registrados durante la PEA.

2.4.5 Contenido de cannabinoides: CBD, THC, CBG

Los resultados de los análisis de potencia registraron diferencias estadísticas entre las variedades para los tres cannabinoides principales evaluados. Los resultados de análisis de los porcentajes de cannabinoides permitieron identificar a las variedades A, B, C y D como Cannabis no psicoactivo, con valores de THC por debajo del 1 %, (ver tabla 13). Los valores de CBD total se encontraron entre 11,980 y 17,850 %, la variedad D presentó el mayor porcentaje con un valor de 17,550 %, seguida de la variedad A con 14,763 %. El genotipo B presentó un valor de 13,600 % y el genotipo C reportó el menor valor de CBD total con 12,360 % (ver tabla 11 y gráfico 3) ($p < 0,0001$). La variedad que mayor porcentaje de CBG presentó fue la variedad B con 0,129 %. La variedad que

presentó una relación CBD/THC mayor fue la D con un valor de 26,532 % y la variedad C presentó la menor relación con un valor de 18,184 % (ver tabla 13). Los valores de % CBD total y %T HC total se obtienen sumando los valores obtenidos del cannabinoide neutro y el cannabinoide ácido y se multiplica por 0,877.

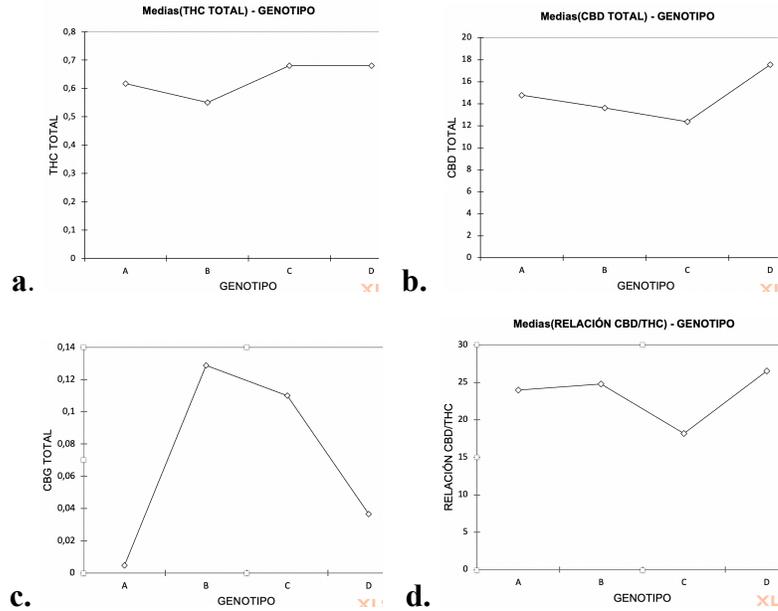


Gráfico 3. a. Media del contenido de THC total b. Media del contenido de CBD total c. Media del contenido de CBG d. Media de la relación CBD/THC

Los cromatogramas correspondientes al análisis de la flor para cada una de las variedades se encuentran en el anexo 7.1, en ellos se puede observar la presencia del cannabinoide CBDA como mayoritario.

Tabla 13. Comparación de medias de % de cannabinoides de las variedades de Cannabis.

Variedad	(%) THC total ± DE	(%) CBD total ± DE	(%) CBG ± DE	Relación CBD/THC ± DE
A	0.617 ± 0.031	14.763 ± 0.371	0.005 ± 0.004	23.960 ± 0.608
B	*0.550 ± 0.030	13.600 ± 0.000	* 0.129 ± 0.028	24.776 ± 1.353
C	0.680 ± 0.030	12.360 ± 0.380	0.110 ± 0.020	18.184 ± 0.244
D	0.680 ± 0.139	*17.550 ± 0.494	0.037 ± 0.006	26.532 ± 5.312

THC Total = % THC + % THCA x 0,877

CBD Total = % CBD + % CBDA x 0,877

Al analizar las muestras por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se debe realizar el cálculo del factor de conversión se obtiene según la reacción de descarboxilación al pasar de THCA al THC por la pérdida de una molécula de dióxido de carbono (CO₂). El THCA pesa 358 gramos por mol, el THC pesa 314 gramos por mol, si se considera la pérdida por molécula $358/314 = 0.877$ moléculas de THC, por lo cual el % de THC total en HPLC se calcula según la ecuación 1:

$$\% \text{ de THC}_{\text{total}} = \% \text{ de THC} + (\% \text{ de THCA} \times 0.877) \text{ (Ec. 1)}$$

El mismo principio se aplica para el cálculo del % de CBD total y CBG total.

2.5 Discusión

En la primera fase del estudio, se llevó a cabo la evaluación morfológica de cuatro variedades de *Cannabis* con el fin de establecer si se trata de variedades diferentes, dicho proceso se realizó teniendo en cuenta el cumplimiento con los requerimientos solicitados por el ICA a través de la Resolución 067516 del 2020, en la cual se establece como procedimiento la realización de Pruebas de Evaluación Agronómica (PEA) a los genotipos que se desea diferenciar. Estos resultados permitieron asignar nombres vernáculos a las variedades analizadas, forma común de categorizar las cepas o variedades teniendo en cuenta la morfología de la planta (fenotipo), considerando características como la forma de la hoja, la altura de la planta, el color, la velocidad de crecimiento, entre otros caracteres. Este sistema es independiente de la clasificación científica y taxonómica (Hazekamp, et al., 2016).

Los datos fueron obtenidos a partir del diseño experimental al azar con tres repeticiones, el cual permitió analizar la evaluación morfológica de 23 caracteres entre los cualitativos y cuantitativos, estos caracteres pertenecientes a 4 tipos de variables; fenotípicas, de crecimiento, rendimiento y el contenido de cannabinoides.

El desarrollo fenológico se definió a través de caracteres cualitativos y cuantitativos, los datos registrados en algunos de estos caracteres no mostraron diferencias

significativas entre las variedades. Los cuatro genotipos presentaron 5 folíolos por hoja, el número de días de floración y cosecha fue igual para A, B, C y D; 91 y 132 días, respectivamente. Las flores resultaron 100 % femenina. Se logró observar que las variables fenotípicas (tabla 8) pigmentación antocianica del pecíolo e intensidad del color verde de la hoja, presentaron leves diferencias, aunque en todas las variedades el color del tallo principal fue verde. En la variedad A, la pigmentación del pecíolo es débil y las hojas un verde medio, la variedad B, la pigmentación del pecíolo es muy fuerte y el color de la hoja oscuro, la variedad C, presentó una pigmentación ausente y un color de hoja medio, finalmente la variedad D presentó pigmentación media y un color verde de la hoja ligero. Por lo cual los descriptores morfológicos de desarrollo fenotípico no son decisivos para la diferenciación de las variedades analizadas. Al evaluar las variables fenotípicas cuantitativas; longitud de pecíolo y longitud y ancho del foliolo; se observa diferencia estadística significativa en la longitud del pecíolo ($p < 0.05$) los valores de las variedades A, B y C, están entre 7.424 y 7.638 cm. La variedad D fue la que mayor longitud de pecíolo con 8,120 cm. La longitud y anchura del foliolo no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$), la longitud del foliolo para las variedades B, C y D se encuentra entre 9.847 – 9.886 cm, y la anchura de foliolo 1.842 – 1.916 cm, mientras que la variedad A registró 10.122 cm de longitud de foliolo y 2.080 cm de anchura del foliolo, cuyo valor si presentó diferencia significativa ($p = 0.005$) (ver tabla 9).

Los datos obtenidos en los caracteres de crecimiento; altura de la planta y altura y grosor del tallo cosechado, permitieron observar diferencias estadísticas significativas entre los genotipos evaluados ($p < 0.05$), siendo la variedad A, la de mayor altura con 198.506 cm, seguida de la variedad D con 171.582 cm, la variedad C 161.598 cm y finalmente con una amplia diferencia se observa que la variedad B, es la de menor altura con 139.676 cm. El tallo, tanto por su altura, como su grosor, permitió corroborar que la variedad A es más grande que las otras variedades, con una altura de tallo de 89.244 cm y grosor de 7.804 cm, seguida de la variedad D con una altura de tallo de 70.289 cm y grosor de 5.904 cm. Las variedades B y C registran datos muy cercanos, siendo la variedad B levemente mayor que la C (ver tabla 10). El número de tallos por planta no registra relación con los otros valores obtenidos en los otros caracteres. Los caracteres de

crecimiento permiten observar diferencias significativas entre las variedades, siendo la variedad $A > D > C \geq B$.

Los resultados obtenidos en las variables de rendimiento permitieron observar que el genotipo A con 1253.178 g/m², registró la mayor biomasa de planta. Los genotipos B, C y D presentaron valores muy cercanos entre 118.244 y 1164.022 g/m². Los datos obtenidos de biomasa fresca permitieron observar que la variedad C presentó la mayor producción con 452.935 g, seguida de la variedad B con 302.756 g, la variedad D con 280.844 g registró el menor valor. Se puede observar una importante diferencia de la variedad C con respecto a las otras variedades (Tabla 11). Al examinar la distribución de la biomasa (Tabla 12), se observa que la variedad C, registra el mayor porcentaje de flor (40%), las variedades A, B y D, reportan porcentajes muy cercanos entre 24 - 26 %, dato importante al evaluar el rendimiento de la planta con respecto a la producción de cannabinoides.

Al examinar el contenido de cannabinoides principales CBD total, THC total y CBG en las flores de las variedades de *Cannabis* analizadas, los cuales se identificaron y cuantificaron por los tiempos de retención al comparar las muestras respecto a patrones certificados, el contenido de THC total fue inferior al 1% en todas variedades, con valores entre 0.550 y 0.680% (ver tabla 13), lo que confirma que las cuatro variedades de *Cannabis* analizadas es material vegetal no psicoactivo. El contenido del cannabinoide CBD total registró el valor más alto en la variedad D, 17.55 %, seguido de la variedad A con 15.76 %, las variedades B y C, presentan los valores más bajos entre el 13.6 y 12.4 %. Las variedades B y C presentaron los porcentajes de CBG más altos y cercanos entre ellos, con valores de 0.129 y 0.110 %, respectivamente. Las variedades A y B registraron porcentajes menores, 0.005% para el genotipo A y 0.037 % para D. Al calcular la relación CBD/THC para cada una de las variedades, se logró observar que D, registró el valor más alto, con 26.532, seguido de B con 24.776, la variedad A registró un valor cercano de 23.960, el valor de la relación CBD/THC para la variedad C fue el menor, 18.184. Los porcentajes de CBD total y CBG registran diferencias estadísticas significativas con un valor de $p < 0.05$, lo cual no ocurre con los datos obtenidos para THC total, donde $p > 0.05$.

Los datos obtenidos en la prueba de evaluación agronómica, permitieron observar diferencias entre las variedades, siendo los descriptores de crecimiento y el contenido de cannabinoides decisivos para ello. Al relacionar el contenido de cannabinoides con el porcentaje de flor en la distribución de biomasa, se logra determinar que la variedad C, aunque registró el menor porcentaje de CBD total, es la variedad que genera un mayor rendimiento para el productor, alrededor de 22 g de CBD total por producción de flor en la biomasa fresca, la variedad D presentó 12 g, y la variedad A y B con un valor de 10g cada una.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA a través del programa XLSTAT, intervalo de confianza 95%. Los gráficos generados permitieron observar las diferencias entre las variedades evaluadas.

2.6 Conclusiones

- Los resultados obtenidos al evaluar los cuatro genotipos mostraron uniformidad en la duración del ciclo productivo. No se observó la presencia de plantas con diversidad sexual, los 4 genotipos presentaron flores femeninas, siendo una característica de estabilidad fisiológica ideal para la propagación vegetal. Los caracteres cualitativos de desarrollo fenológico no permitieron observar diferencias significativas entre las cuatro variedades.
- Dentro de las variables fenotípicas cuantitativas; longitud de foliolo no se observaron diferencias estadísticas significativa, en la anchura del foliolo se destaca que la variedad A presentó un valor con una diferencia estadística significativa. Para los valores de longitud de pecíolo si se observó una diferencia estadística significativa en todos los casos, la variedad D presentó mayor longitud del pecíolo (8.120 cm), con diferencia de aproximadamente un 1 cm con respecto a las otras variedades. Al analizar los resultados de los caracteres fenotípicos se logró diferenciar entre las cuatro variedades.

- Los caracteres de crecimiento, altura de la planta y del tallo, al igual que el grosor del tallo, permitieron establecer diferencias estadísticas significativas entre las variedades, destacando que el genotipo A es la planta con mayor desarrollo, seguida de D. Mientras las variedades B y C son las más bajas. las características de crecimiento también permitieron diferenciar entre las variedades.
- Al analizar la composición química de las cuatro variedades se corroboró la clasificación del material vegetal como *Cannabis* no psicoactivo. El contenido de los cannabinoides CBD total y CBG, permitió observar diferencias estadísticas significativas entre las variedades, siendo D la variedad que registró el mayor contenido de CBD total con 17.55 %, seguido de la variedad A, con 15.76 %. El contenido del cannabinoide CBG en las variedades B y C con valores entre 0.110 - 0.129 %, permite observar diferencia con relación a las variedades A y D, con valores inferior a 0.037 %. En todos los casos las variedades presentaron diferente distribución en el contenido de fitocannabinoides.
- Al observar los caracteres de rendimiento (biomasa) se evidencia una importante diferencia del porcentaje de flor de la variedad C (40 %) con respecto a las otras variedades, con porcentajes entre 24 -26 %. Esta información permitió establecer que la variedad C, a pesar de tener un menor porcentaje de CBD total, generaría un rendimiento significativo al relacionar la producción de flor con el contenido de cannabinoides, CBD y CBG.
- Al analizar los resultados obtenidos durante la prueba de evaluación agronómica, se logró establecer que existen diferencias significativas entre las cuatro variedades, hecho que permitió sustentar al productor el respectivo registro de cada variedad ante el ICA.

2.7 Bibliografía

Aardema, M. L., & DeSalle, R. (2021). Can public online databases serve as a source of phenotypic information for *Cannabis* genetic association studies?. *Plos one*, *16*(2), e0247607.

Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., & Ventura Martínez, R. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *45*(4), 1-6.

Broseus, J., Anglada, F., & Esseiva, P. (2010). The differentiation of fibre-and drug type *Cannabis* seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools. *Forensic science international*, *200*(1-3), 87-92.

Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M. A., Walker, L. A., & Potter, D. (2017). *Cannabis* cultivation: methodological issues for obtaining medical-grade product. *Epilepsy & Behavior*, *70*, 302-312.

Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., & Koltai, H. (2018). Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, *113*, 376-382.

ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Phytocannabinoids*, 1-36.

Fischedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, *71*(17-18), 2058-2073

Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. (2016). *Cannabis*: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to *Cannabis* classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *1*(1), 202-215.

Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American journal of botany*, *91*(6), 966-975.

Hillig, K. W. (2004). A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochemical systematics and ecology*, 32(10), 875-891.

ICA, Instituto Colombiano Agropecuario. (2004). Guía para la presentación de informes de pruebas de evaluación agronómica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Križman, M. (2020). A simplified approach for isocratic HPLC analysis of cannabinoids by fine tuning chromatographic selectivity. *European Food Research and Technology*, 246(2), 315-322.

Livingston, S. J., Quilichini, T. D., Booth, J. K., Wong, D. C., Rensing, K. H., Laflamme-Yonkman, J., & Samuels, A. L. (2020). *Cannabis* glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *The Plant Journal*, 101(1), 37-56.

McPartland, J. M., & Small, E. (2020). A classification of endangered high-THC *Cannabis* (*Cannabis sativa* subsp. *Indica*) domesticates and their wild relatives. *PhytoKeys*, 144, 81.

Magagnini, G., Grassi, G., & Kotiranta, S. M. (2018). The effect of light spectrum on the morphology and cannabinoid content of *Cannabis sativa* L. *medical Cannabis and cannabinoids*, 1(1), 19-27.

Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). *Cannabis Sativa* L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864.

Mudge, E. M., Murch, S. J., & Brown, P. N. (2018). Chemometric analysis of cannabinoids: chemotaxonomy and domestication syndrome. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., & Koltai, H. (2018). Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 113, 376-382.

Ren, G., Zhang, X., Li, Y., Ridout, K., Serrano-Serrano, M. L., Yang, Y., & Fumagalli, L. (2021). Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science Advances*, 7(29), eabg2286.

Small, E., & Cronquist, A. (1976). A Practical and Natural Taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, 25(4), 405-435. doi:10.2307/1220524

Schultes, R., Klein, W., Plowman, T., & Lockwood, T. (1974). *Cannabis*: an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 23(9), 337-367. Retrieved May 7, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/41762285>

Staginnus, C., Zörntlein, S., & de Meijer, E. (2014). A PCR marker Linked to a THCA synthase Polymorphism is a Reliable Tool to Discriminate Potentially THC-Rich Plants of *Cannabis sativa* L. *Journal of forensic sciences*, 59(4), 919-926.

Yoshimatsu, K., Kitazawa, T., Kawano, N., Iida, O., & Kawahara, N. (2010). Characteristics of *Cannabis sativa* L.: seed morphology, germination and growth characteristics, and distinction from *Hibiscus cannabinus* L. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 130(2), 237-246.

CAPÍTULO 3. Caracterización fitoquímica de *Cannabis sativa* L. que se cultiva en el departamento del Cauca.

3.1 Resumen

Cannabis es una especie herbácea destacada en los últimos años por los diferentes tipos de metabolitos presentes en ella; especialmente cannabinoides y terpenos que promueven su elevado potencial farmacológico. En virtud de lo anterior, a partir de los resultados preliminares de caracterización morfológica de variedades del Cauca, se continuó con los estudios de caracterización fitoquímica. En esta investigación, el material vegetal de cuatro variedades de *Cannabis sativa* L. estudiadas se sometieron a procesos de extracción rápida, RSO y soxhlet. Los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de arreglo de diodos (UHPLC-DAD), para la identificación y cuantificación de cannabinoides y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la identificación y cuantificación de terpenos. Adicionalmente se cuantificaron fenoles, flavonoides y antraquinonas totales por espectrofotometría. En el análisis de resultados se contrastó la composición química de los extractos con el rendimiento de la extracción del cannabinoide mayoritario CBD total (CBD y CBDA). El tratamiento de los datos se realizó con aplicación del programa Statsoft STATISTICA.

Palabras claves: cannabinoides, terpenos, extracción etanólica, técnicas cromatográficas.

3.2 Summary

Cannabis is a herbaceous species highlighted in recent years due to the class of compounds present in it; especially cannabinoids and terpenes that promote its high pharmacological potential. By virtue of the foregoing, based on the preliminary results of the morphological characterization of varieties from Cauca, the phytochemical characterization studies continued. In this research, the plant material of four varieties of *Cannabis sativa* L. studied were subjected to rapid extraction, percolation and soxhlet

processes. The extracts obtained were analyzed by ultra-high resolution liquid chromatography with diode array detector (UHPLC-DAD) for the identification and quantification of cannabinoids and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for the identification and quantification of cannabinoids. of terpenes. Additionally, total phenols, flavonoids and anthraquinones were quantified by spectrophotometry. In the analysis of results, the chemical composition of the extracts was contrasted with the yield of the extraction of the main cannabinoid CBD| total (CBD and CBDA). The treatment of the data was carried out with the application of the Statsoft STATISTICA program.

Keywords: cannabinoids, terpenes, ethanol extraction, chromatographic techniques.

3.3 Introducción

Cannabis es una planta con enorme variedad de compuestos químicos, muchos de ellos exclusivos, conocidos como cannabinoides de estructura terpenofenólica (Meijer, et al., 2003, Flores, et al., 2008, Brenneisen, 2017, Casajuana, et al., 2018, Pellati, et al., 2018). Hasta el momento de esta búsqueda bibliográfica se han reportado 120 cannabinoides y en la mayoría de los casos estudiados se destaca la presencia del cannabidiol (CBD) y el tetrahidrocannabinol (THC). Con el paso del tiempo se ha conseguido identificar nuevos cannabinoides y recientemente, han cobrado importancia el cannabicromeno (CBC), el Cannabigerol (CBG) y el cannabinol (CBN) (McLaren et al., 2008, Hillig, 2004, Bernstein, et al., 2019). Los terpenos y flavonoides son otros metabolitos secundarios que también están presentes en *Cannabis*. (Sato, et al., 1996, Yang, et al., 2011, Jiang, et al., 2016, Perveen, 2018, Namdar, et al., 2018, Salha, et al., 2019, Lvingston, et al., 2020, Micalizzi, et al., 2021), estos compuestos poseen propiedades medicinales importantes que han sido estudiadas (Scortichini, et al., 1991, Liebgott, et al., 2000, Turner, et al., 2017, Lewis, et al., 2017, Guimarães, et al., 2019, Kim, et al., 2020, Krill, et al., 2020). En razón a las propiedades terapéuticas se ha intensificado el estudio de procesos eficientes de extracción, de bajo impacto ambiental y que sean económicamente rentables. Los parámetros de estudio más relevantes han sido la temperatura, la presión, el tiempo de extracción y la naturaleza del solvente (Méndez,

2018, Ramírez, et al., 2019, Micalizzi, et al., 2021). Los métodos investigados incluyen procesos convencionales soxhlet, maceración dinámica, percolación, ultrasonido, extracción rápida con solventes y técnicas más sofisticadas como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), pirolisis y microondas, entre otros (Cao, et al., 2016, Citti, et al., 2016, Brighenti, et al., 2017, Elsohly et al., 2017, Devi et al., 2019, De Vita, et al., 2019, Rezvankhah, et al., 2019, Fiorini et al., 2020, Tzimas, et al., 2021). Para la extracción de compuestos bioactivos generalmente se utiliza agua como solvente. También se usan con otros propósitos el etanol, alcohol isobutilico y solventes orgánicos de baja polaridad, semejantes a los cannabinoides.

La evolución de los procesos de extracción ha conllevado a utilizar nuevos métodos analíticos de identificación y cuantificación de cannabinoides y terpenos. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Broséus, et al., 2010, Citti, et al., 2016); desde el punto de caracterización espectroscópica, los métodos espectroscópicos más utilizados son: RMN, UV, IR, dicroísmo circular y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) (Musetti, 2016, Citti, et al., 2019), Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC), acoplada a Espectrometría de Masas con Detección de Ionización Química a presión atmosférica (APCI-MS) (Backstrom, et al., 1997), HPLC con detector de diodos y CG con detector de ionización de llama (Giese, et al., 2019, Kishimoto, et al., 2005, Fishedichk, et al., 2010, Harman-Ware, et al., 2016, Chandra, et al., 2017, Krill, et al., 2020, Micalizzi, et al., 2021).

La legalización en Colombia de *Cannabis* con uso medicinal amplió el estudio de la planta hacia otros campos para potencializar la composición química a partir de los genotipos cultivados. Los métodos de extracción utilizados son muy diversos y en consideración a ello, en el presente capítulo se registra los resultados obtenidos al analizar extractos de cuatro variedades de *Cannabis* utilizando métodos de extracción rápida (adaptación extracción Live Resin), RSO (extracción Rick Simpson Oil) y soxhlet, métodos económicos, rápidos y de uso común en las industrias y los productores de *Cannabis* en Colombia. Se utilizó etanol al 99.5 % con el propósito de evaluar posteriormente la actividad biológica. Los extractos se analizaron por cromatografía

líquida de alta resolución (HPLC) para identificar y cuantificar cannabinoides, y cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) para la identificación y cuantificación de terpenos. Adicionalmente, se cuantificó en los extractos obtenidos de las cuatro variedades por espectrofotometría; los fenoles a través de la reacción colorimétrica de oxido-reducción, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante. El contenido de flavonoides y antraquinonas totales se realizó mediante el método colorimétrico con tricloruro de aluminio. Los datos obtenidos fueron analizados por el programa Statsoft STATISTICA.

3.4 Resultados

Teniendo en cuenta la disponibilidad del material vegetal, finalmente se obtuvieron 11 muestras, las cuales se nombran y relacionan a continuación en la tabla 14.

Tabla 14. *Relación de extractos obtenidos según la variedad y el método de extracción.*

ITEM	VARIEDAD	TIPO DE EXTRACTO	NOMBRE
1	A	Extracción rápida	A-1
2		Extracción RSO	A-2
3		Extracción soxhlet	A-3
4	B	Extracción rápida	B-1
5		Extracción RSO	B-2
6		Extracción soxhlet	B-3
7	C	Extracción rápida	C-1
8		Extracción RSO	C-2
9		Extracción soxhlet	C-3
10	D	Extracción RSO	D-2
11		Extracción soxhlet	D-3

En la tabla 32 y 33 se registran los datos de las curvas de calibración y datos de validación del método de cuantificación de cannabinoides por UHPLC-DAD (ver anexo 2).

3.4.1 Identificación y cuantificación de cannabinoides por UHPLC/DAD

Los datos obtenidos mediante análisis por UHPLC-DAD en la identificación de los cannabinoides de los extractos de las cuatro variedades se registran en la Tabla 15, gráfico 4. En la tabla 15 se muestran los porcentajes peso/peso obtenido para cada variedad, calculados a partir de los datos cromatográficos (ver anexo 2). Los resultados muestran en cada uno de los extractos el cannabinoide ácido CBDA mayoritario con

valores entre 3,9 % hasta 12,86 % en los extractos C-2 (menor contenido) y D-3 (mayor contenido), seguido del CBD con valores entre 0,95 % en el extracto B-2 y 3,21 % en el extracto D-3. El cannabinoide THC no se detectó, probablemente porque está presente por debajo del límite de detección, pero se logró cuantificar al cannabinoide THCA, en las variedades A, B y D, esta última presentó el valor más alto con un valor promedio de 0,45 % en el extracto D-3. El cannabinoide CBG sólo mostró datos cuantificables en la extracción rápida de la variedad B. El cannabinoide CBN se logró identificar pero no cuantificar al estar por fuera del límite de cuantificación.

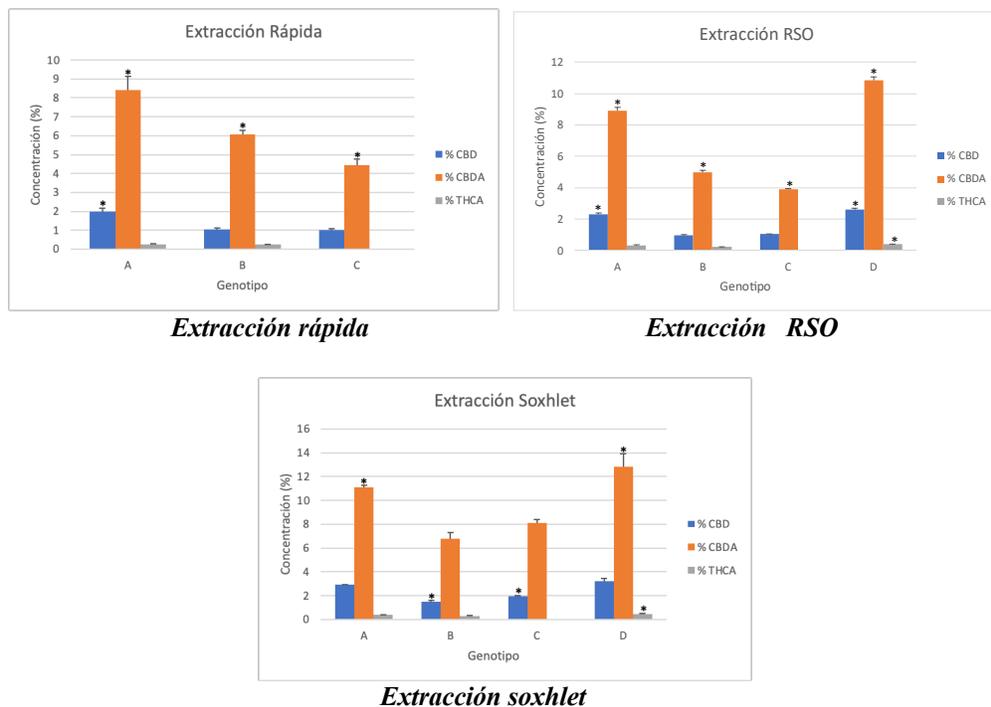


Gráfico 4. Contenido de cannabinoides en extractos de las variedades A, B, C y D obtenidos por: extracción rápida, extracción RSO y extracción soxhlet

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$

El análisis estadístico permitió identificar las diferencias significativas en el contenido de cannabinoides en cada uno de los métodos de extracción. En la extracción rápida se obtuvo un porcentaje de CBD significativamente mayor en la variedad A (1.98 %) con relación a las variedades B (1.05 %) y C (1.01 %). Para el cannabinoide CBDA se obtuvo porcentajes con amplias diferencias entre las variedades, A (8.80 %), B (6.07 %) y C (4.45 %). En la extracción por RSO, el cannabinoide CBDA presentó diferencias

significativas entre las variedades. Caso contrario del cannabinoide CBD, donde la diferencia se da entre las variedades A y D, finalmente el cannabinoide THCA sólo registró diferencia en la variedad D. En la extracción soxhlet, la concentración del cannabinoide CBDA mostró diferencias significativas en las variedades A y B, el cannabinoide CBD en las variedades B y C y el cannabinoide THCA también en la variedad D. En todos los casos ($p < 0,05$).

Tabla 15. Comparación de medias de cannabinoides principales en los extractos de Cannabis.

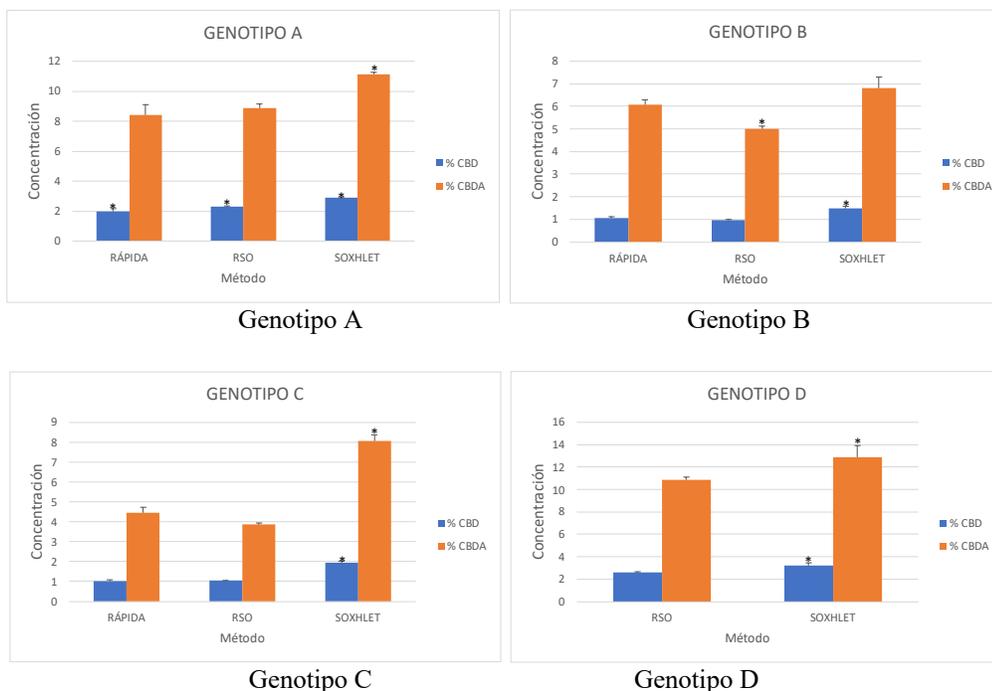
Extracto	(%) CBD \pm DE	(%) CBDA \pm DE	(%) THCA \pm DE	(%) CBG \pm DE	% Total de Cannabinoides
A-1	*1.977 \pm 0.180	*8.404 \pm 0.728	0.259 \pm 0.021	N.D.	10.640
A-2	*2.317 \pm 0.065	*8.898 \pm 0.239	0.323 \pm 0.015	N.D.	11.538
A-3	2.896 \pm 0.006	*11.114 \pm 0.162	0.384 \pm 0.007	N.D.	14.394
B-1	1.055 \pm 0.056	*6.074 \pm 0.214	0.232 \pm 0.006	1.231 \pm 0.043	8.592
B-2	0.952 \pm 0.051	*5.000 \pm 0.124	0.228 \pm 0.009	N.D.	6.180
B-3	*1.471 \pm 0.099	6.802 \pm 0.504	0.301 \pm 0.014	N.D.	8.574
C-1	1.018 \pm 0.057	*4.446 \pm 0.305	N.D.	N.D.	5.464
C-2	1.040 \pm 0.021	*3.881 \pm 0.077	N.D.	N.D.	4.921
C-3	*1.930 \pm 0.085	8.082 \pm 0.294	N.D.	N.D.	10.012
D-2	*2.624 \pm 0.052	*10.868 \pm 0.220	*0.404 \pm 0.013	N.D.	13.896
D-3	3.208 \pm 0.260	*12.855 \pm 1.063	*0.455 \pm 0.036	N.D.	16.518

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$, $n = 3$.

N.D.: No detectado.

Al graficar el valor medio obtenido de los cannabinoides CBDA y CBD según el método de extracción para cada variedad y realizar el análisis estadístico, se observa que para el Genotipo A, la extracción soxhlet muestra diferencia con respecto al cannabinoide CBDA, para el cannabinoide CBD, los tres métodos presentan diferencias significativas según la estadística realizada ($p < 0,05$).

En el Genotipo B hay diferencia de la concentración del CBDA en el extracto por RSO en comparación con los otros dos métodos de extracción, en el caso del CBD la extracción soxhlet permitió obtener una mayor concentración ($p < 0,05$). Finalmente, en los Genotipos C y D, se registraron diferencias en la extracción soxhlet para los cannabinoides CBDA y CBD ($p < 0,05$). (Ver gráfico 5).



*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$

Gráfico 5. Contenido de CBD y CBDA presentes en cada uno de los genotipos A, B, C y D

El método de extracción soxhlet fue el más eficiente en todos los casos. Para este método, la variedad D, presentó el mayor contenido de CBD total, con un porcentaje de 14,84 %, seguido de la variedad A, con 12,64 %, las variedades B y C, reportaron valores promedio de 7,43 % y 9,02 %, respectivamente. Para las variedades B y C la extracción rápida fue más eficiente al compararla con la extracción por RSO (ver tabla 16).

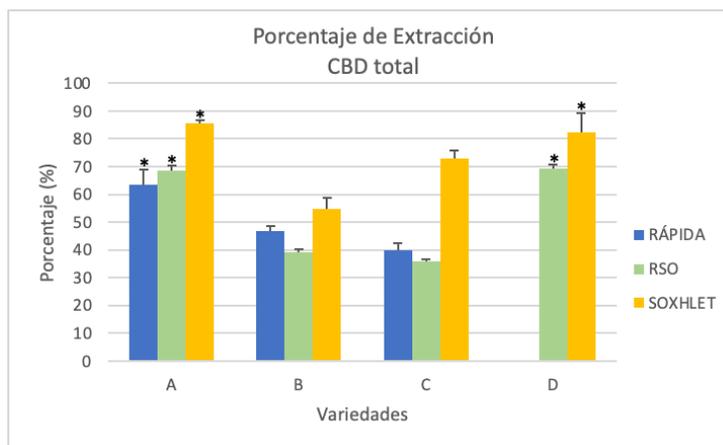


Gráfico 6. Comparación de porcentajes de extracción en cada variedad.

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$

Al relacionar el contenido de CBD total obtenido en cada extracto con el contenido de CBD total de la flor seca de cada variedad, se logró calcular el porcentaje de rendimiento para cada método de extracción, datos que fueron graficados y se pueden observar en el gráfico 6, el método soxhlet resultó más eficiente comparado con la extracción rápida y RSO. El porcentaje de rendimiento más alto fue obtenido en la extracción soxhlet de la variedad A (A-3) con 85,64 %, seguido por la D-3 con 82,52 %. El rendimiento más bajo se presentó en la extracción RSO, para la variedad C (C-2) con 35,95 %. En la tabla No. 16, se registran los datos obtenidos de porcentaje de CBD total y porcentaje de extracción para cada extracto analizado.

Tabla 16. Comparación de medias del porcentaje de extracción del CBD total en las variedades.

Extracto	(%) CBD Total ± DE	% de Extracción ± DE
A-1	*9.348 ± 0.817	*63.318 ± 5.534
A-2	*10.121 ± 0.257	*68.551 ± 1.739
A-3	*12.643 ± 0.145	85.636 ± 0.984
B-1	*6.383 ± 0.224	46.936 ± 1.645
B-2	*5.337 ± 0.140	39.240 ± 1.030
B-3	7.437 ± 0.541	*54.681 ± 3.978
C-1	*4.917 ± 0.324	39.779 ± 2.617
C-2	*4.443 ± 0.086	35.949 ± 0.698
C-3	9.017 ± 0.345	72.950 ± 2.794
D-2	*12.153 ± 0.244	69.250 ± 1.393
D-3	*14.482 ± 1.192	*82.519 ± 6.790

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$, $n = 3$.

El análisis estadístico con el programa STATISTICA, estableció correlaciones en el comportamiento de los métodos de extracción con cada una de las variedades. En la extracción rápida de la variedad A se presentaron diferencias significativas con respecto a las variedades B y C. La extracción por RSO reportó diferencias en las variedades A y D. En la extracción soxhlet, se observó diferencias en la variedad B, ($p < 0,05$). (Ver gráfico 6).

3.4.2 Identificación y cuantificación de terpenos por CG-EM

Los terpenos presentes en los extractos de las cuatro variedades se analizaron por CG-EM. La concentración ($\mu\text{g/mL}$) se muestran en la Tabla No.17, registrados para cada variedad, calculados a partir de los datos cromatográficos (ver anexo 2).

Tabla 17. Comparación de medias de la concentración de terpenos en los extractos.

Extracto	α -pineno ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	β -mirceno ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	D-limoneno ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	Linalool ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	β -Cariofileno ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	Humeleno ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	Guaiol ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	α -Bisabolol ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE
A-1	53.787 \pm 1.719	46.020 \pm 0.557	27.424 \pm 1.761	*44.551 \pm 4.193	*303.504 \pm 2.848	*87.332 \pm 1.573	181.925 \pm 6.237	*329.274 \pm 6.341
A-2	N.D.	N.D.	19.566 \pm 1.937	36.957 \pm 2.045	*218.555 \pm 0.630	61.658 \pm 0.947	112.262 \pm 1.543	*238.662 \pm 2.767
A-3	*146.444 \pm 1.001	145.945 \pm 7.684	39.279 \pm 4.470	35.136 \pm 1.000	*243.169 \pm 2.314	59.867 \pm 7.524	65.701 \pm 7.781	149.157 \pm 4.445
B-1	19.271 \pm 0.286	38.865 \pm 4.131	26.532 \pm 6.659	29.632 \pm 1.290	140.973 \pm 2.534	38.887 \pm 1.097	*149.213 \pm 3.926	*180.005 \pm 2.043
B-2	17.061 \pm 1.993	37.111 \pm 0.926	30.299 \pm 2.374	26.694 \pm 1.247	133.247 \pm 8.731	35.078 \pm 3.785	105.677 \pm 8.450	140.795 \pm 3.880
B-3	16.292 \pm 2.512	70.758 \pm 7.015	48.547 \pm 0.706	38.032 \pm 3.861	177.420 \pm 7.075	39.506 \pm 6.084	104.530 \pm 4.270	142.433 \pm 4.609
C-1	32.582 \pm 3.788	67.406 \pm 4.714	51.914 \pm 6.100	34.523 \pm 0.07	197.007 \pm 8.671	51.168 \pm 0.548	169.779 \pm 6.621	*205.370 \pm 0.239
C-2	13.547 \pm 0.503	48.986 \pm 2.222	42.382 \pm 6.826	26.957 \pm 0.398	122.465 \pm 6.044	30.084 \pm 2.485	70.924 \pm 7.064	114.313 \pm 3.260
C-3	15.691 \pm 0.179	127.811 \pm 2.386	*94.269 \pm 3.165	38.229 \pm 0.565	181.068 \pm 8.296	42.318 \pm 1.297	76.114 \pm 1.002	137.419 \pm 0.397
D-2	*122.327 \pm 8.260	133.006 \pm 6.841	57.334 \pm 3.835	34.690 \pm 0.670	188.440 \pm 7.056	43.518 \pm 3.893	77.147 \pm 7.018	143.707 \pm 2.055
D-3	*250.094 \pm 2.992	*180.362 \pm 9.382	41.294 \pm 4.886	N.D.	\pm 189.781 \pm 5.129	46.649 \pm 3.947	57.806 \pm 0.287	118.225 \pm 10.843

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$, $n = 3$.

N.D.: No detectado.

En los gráficos 7, se muestra la composición de los terpenos más representativos en los extractos de las variedades A, B y C; β -cariofileno, guaiol, α -bisabolol, el método de extracción rápida registra los valores más altos para estos terpenos. En los extractos de la variedad D, se concentra mayor contenido de los terpenos; α -pineno, β -mirceno, β -cariofileno y α -bisabolol.

Al evaluar la concentración total de terpenos obtenidos por variedad y método de extracción se nota que la extracción rápida contiene mayor cantidad de terpenos, seguida de la extracción soxhlet. La variedad A registró el mayor contenido de terpenos en el extracto A-1, con una concentración de 1073 $\mu\text{g/mL}$ que recoge la concentración de α -bisabolol fue el más alto (329 $\mu\text{g/mL}$), seguido del β -cariofileno (303 $\mu\text{g/mL}$) en todos los casos $p < 0,05$. La segunda variedad con una concentración de terpenos de 884,21 $\mu\text{g/mL}$ por extracción soxhlet, fue la variedad D. La concentración de terpenos en la

variedad B por el método soxhlet reportó una concentración de 637,52 $\mu\text{g/mL}$ y la variedad C por el método de extracción rápida una concentración de 810 $\mu\text{g/mL}$.

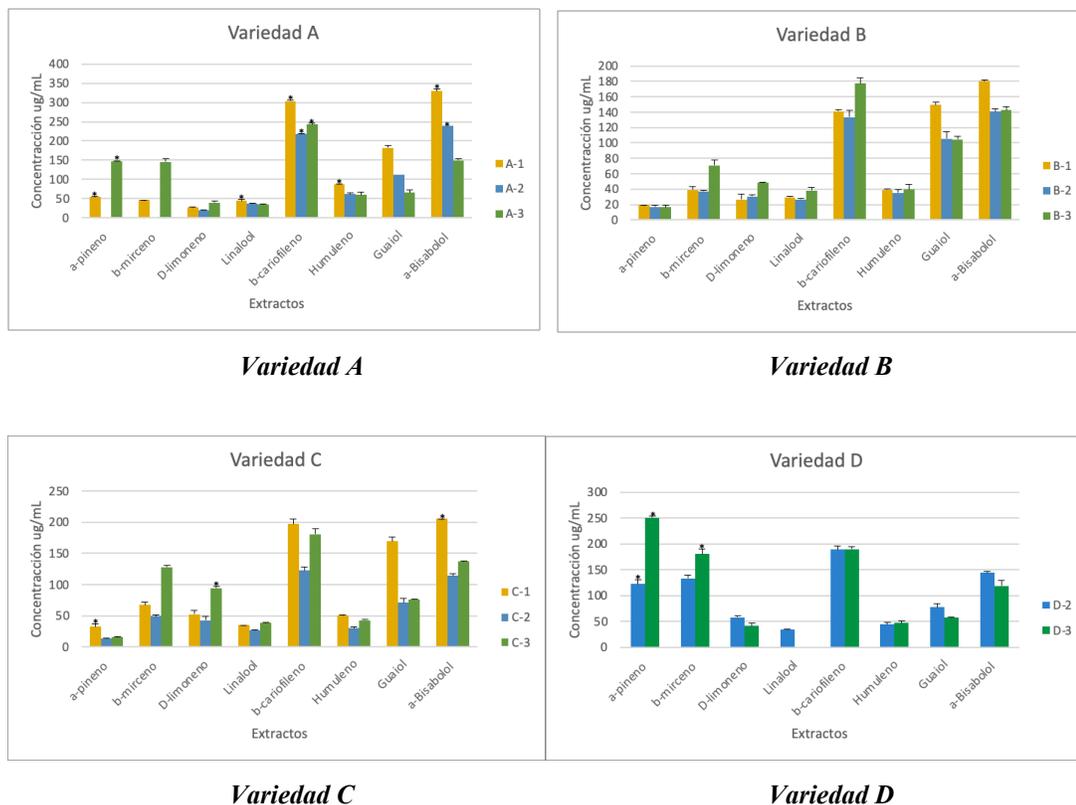


Gráfico 7. Contenido de terpenos en las variedades A, B, C y D por método de extracción.

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas $p < 0,05$

El análisis estadístico utilizando el programa STATISTICA, permitió observar el comportamiento de los terpenos en cada uno de los extractos; el α -pineno presenta diferencias significativas en los extractos A-1, A-3, C-1, D-2 y D-3; β -miriceno, en el extracto D-3; D-limoneno, en el extracto C-3; linalool, en el extracto A-1; β -cariofileno en los extractos de la variedad A; humuleno, en el extracto A-1; guaiol, en el extracto B-2 y α -bisabolol, en los extractos A-1, A-2, B-1 y C-1 ($p < 0,05$).

En el anexo 2 se encuentran las curvas de calibración y datos de validación del método de cuantificación de terpenos por cromatografía de gases.

3.4.3 Cuantificación de fenoles, flavonoides y antraquinonas

En el laboratorio de Bioensayos (Estrés oxidativo) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso en Viña del Mar – Chile, se realizaron las pruebas de cuantificación de los fitoconstituyentes; fenoles, flavonoides y antraquinonas totales, un parámetro importante para evaluar el potencial biológico de un extracto, especialmente la actividad antioxidante. Se cuantificó fenoles totales, basándose en la reacción colorimétrica de oxido-reducción utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante. El contenido de flavonoides y antraquinonas totales se realizó mediante el método colorimétrico con tricloruro de aluminio.

Tabla 18. Análisis de fitoconstituyentes.

Extracto	^a Fenoles Totales (GAE mg/L) ± DE	^b Flavonoides Totales (QE mg/L) ± DE	^c Antraquinonas Totales (EE mg/L) ± DE
A-1	*61.369 ± 3.021	*4.229 ± 0.336	*4.431 ± 0.204
A-2	*70.122 ± 3.259	*7.892 ± 0.063	*4.949 ± 0.040
A-3	*52.548 ± 6.413	*5.664 ± 0.239	*4.512 ± 0.047
B-1	31.589 ± 1.539	2.623 ± 0.225	4.110 ± 0.116
B-2	26.461 ± 2.577	3.659 ± 0.365	4.174 ± 0.039
B-3	30.521 ± 3.318	*5.608 ± 0.248	*4.547 ± 0.100
C-1	25.432 ± 1.327	2.347 ± 0.329	4.005 ± 0.142
C-2	29.375 ± 1.258	3.169 ± 0.359	4.175 ± 0.066
C-3	22.301 ± 1.667	4.133 ± 0.143	4.280 ± 0.061
D-2	33.262 ± 0.245	*4.507 ± 0.552	*4.322 ± 0.079
D-3	*50.066 ± 4.559	*6.050 ± 0.253	*4.637 ± 0.089

^aExpresado en equivalentes de ácido gálico (GAE)

^bExpresado en equivalentes de quercetina (QE)

^cExpresado en equivalentes de emodina (EE)

Los valores representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE)

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas p<0,05, n = 3.

En la tabla 18 se registra el valor promedio de fenoles totales, flavonoides totales y antraquinonas totales, obtenido para cada uno de los extractos de *Cannabis* no psicoactivo analizados. Se puede observar que los tres extractos de la variedad A y el extracto por RSO de la variedad D, concentran mayor cantidad de fenoles totales (en el orden de los 50-70 mg GAE/L) (p<0,05), en el caso de los flavonoides nuevamente los extractos de la variedad A (A-1, A-2 y A-3), el extracto soxhlet de la variedad B y los dos extractos de la variedad D presentaron mayor contenido de flavonoides (en el orden de los 4-8 mg

QE/L) ($p < 0,05$). Finalmente, en el caso de las antraquinonas no se observa gran diferencia entre los extractos, sin embargo, al igual que en flavonoides, el análisis estadístico permitieron destacar los extractos A-1, A-2, A-3, B-3, D-2 y D-3 (en el orden de los 4.5 mg EE/L) ($p < 0,05$).

3.5 Discusión

En el presente capítulo, se evaluó el contenido de fitocompuestos obtenidos a partir de tres procesos de extracción para las cuatro variedades de *Cannabis sativa* L, se utilizó como solvente etanol al 99.5 %, el cual fue escogido teniendo en cuenta estudios previos que reportaron buenos porcentajes de rendimiento de los cannabinoides principales con este disolvente (Drinic, et al., 2018; Sandiego, 2020; Bowen, et al., 2021). Los métodos de extracción utilizados, al igual que el proceso de identificación y cuantificación de los cannabinoides, buscaban preservar en los extractos el cannabinoide CBDA, lo cual se logró en los tres métodos utilizados; extracción rápida, RSO y soxhlet, y de esta forma al evaluar la actividad biológica, conocer el comportamiento de este cannabinoide, el cual ha sido poco estudiado. El análisis cromatográfico por UHPLC-DAD de los 11 extractos de *Cannabis*, permitió la cuantificación del cannabinoide CBDA como mayoritario en todas las variedades, con valores entre 3.88 % en C-2 (extracción RSO) hasta 12,86 % en D-3 (extracción Soxhlet), en todos los casos la extracción soxhlet reportó los valores más altos de CBDA en cada variedad (ver tabla 15). El fitocannabinoide CBD también se cuantificó en todas las variedades con valores entre 0.95 % en B-2 hasta 3.21 % en D-3. El cannabinoide THCA no fue posible cuantificarlo en la variedad C, en las otras variedades presentó porcentajes muy cercanos, entre 0.23 en B-2 hasta 0.46 % en D-3. Finalmente, el cannabinoide CBG únicamente se cuantificó en la extracción rápida de la variedad B con un valor de 1.23 %, el material vegetal de esta variedad fue el que mayor contenido de CBG reportó (0.129 %), este resultado se atribuiría a la influencia de la temperatura en el proceso de extracción, sin embargo no se encontraron referencias que desvirtúen o respalden esta afirmación. Como se puede observar en resultados de las extracciones soxhlet y RSO, la variedad D registró la mayor cantidad de cannabinoides CBD y CBDA (hasta casi 3 veces) en comparación a los extractos de las otras variedades.

Teniendo en cuenta el porcentaje de CBD total del material vegetal y los porcentajes de CBD total de los extractos, se calculó el porcentaje de rendimiento para cada variedad con cada uno de los métodos de extracción. Como era de esperar, el extracto de la variedad D-3 presentó el porcentaje de CBD total más alto, con un valor promedio de 14,84 % y el menor porcentaje de CBD total se obtuvo en el extracto por RSO de la variedad C de procedencia Miranda-Cauca con un valor promedio de 4,44 %. Los porcentajes de extracción para RSO se encuentran entre 35.78 % en la variedad C-2 y 69.25 % en D-2. La extracción rápida no se logró realizar a la variedad D con procedencia de Toribio-Cauca, para las otras variedades se reportó el menor porcentaje de extracción en C-1 (39.78 %) y el mayor porcentaje en A-1 (63.32%). Para todas las variedades el método de extracción soxhlet resultó ser el más eficiente, con porcentajes de extracción entre 54.68 % en B-3 y 85.64 % en A-3, los datos del porcentaje de CBD total y porcentajes de extracción se registran en la tabla 16. Rezvankhah, et al., 2019, investigaron los efectos de la extracción asistida por microondas (MAE), logrando un rendimiento de extracción de 33,91 % p/p, compararon el resultado con el método de extracción soxhlet donde se obtuvo un rendimiento mayores (37,93 % p/p) (Rezvankhah, et al., 2019). Bakker, et al., 2019, compararon cuatro métodos de extracción (soxhlet con etanol, fluido súper crítico, microondas y ultrasonido), ellos reportaron porcentajes de rendimiento inferiores al 35% (Bakker, et al., 2019). De acuerdo con estos resultados, los porcentajes de extracción obtenidos especialmente en la extracción soxhlet se pueden considerar bastante satisfactorios.

Como se puede observar, las variedades con mayor rendimiento son A y D, el método de extracción rápida con respecto a la variedad A, con procedencia Corinto-Cauca, fue el menos efectivo en cuanto a las técnicas de extracción utilizadas con esta variedad, con un valor promedio de 63,32 % y un contenido de CBD total de 9,35 %. Al igual que en la variedad B, en C se observa que la extracción por RSO, fue menos eficiente que la extracción rápida, el extracto que registró el menor rendimiento de extracción fue C-2, con un valor promedio de 35,95 % y un contenido de CBD total de 4,44 %. Otros estudios han reportado porcentajes de extracción similares o superiores con métodos más sofisticados: Rovetto, et al., 2017, obtuvieron extractos de cepas de *Cannabis* psicoactivo

con alta concentración de los cannabinoides THCA y THC mediante extracción súper crítica con dióxido de carbono logrando una eficiencia de extracción de hasta 92 % (Rovetto, et al., 2017). Moreno, et al., 2020, obtuvieron extractos con altos contenidos de CBD utilizando CO₂ supercrítico y propano, con rendimientos entre el 51 y 100% con CO₂ y el 74 al 99% en peso con propano (Moreno, et al., 2020), otros estudios (Gallo-Molina, et al., 2019; Baldino, et al., 2020; Machaca, 2021). Los porcentajes de extracción de los cannabinoides CBDA y CBD obtenidos son bastante significativos al hablar de métodos de extracción sencillos y económicos, como los utilizados, lo cual permite proyectar a futuro el uso industrial y medicinal de las variedades de *Cannabis* del Cauca.

Muchas de las propiedades medicinales de *Cannabis* se le atribuyen a la presencia de los terpenos en la planta o a la sinergia de estos con los cannabinoides, Namdar, et al., 2019, correlacionó estadísticamente grupos de terpenos con ciertas cepas de *Cannabis* ricas en THCA o CBDA y determinaron su capacidad para mejorar la actividad de los fitocannabinoides, usando un ensayo de viabilidad celular, descubriendo que los terpenos mejoran la actividad citotóxica de los fitocannabinoides en las líneas celulares MDA-MB-231 y HCT-115 (Namdar, et al., 2019). Los terpenos presentan una gran variedad entre los diferentes genotipos de *Cannabis*, como se observa con los cannabinoides, algunos estudios han demostrado que la cantidad de terpenos aumenta con la exposición a la luz y disminuye con la fertilidad del suelo (Bonini, et al., 2018). Diferentes autores han comparado protocolos de extracción y los efectos del precalentamiento en el material vegetal, lo que puede causar la pérdida por degradación o evaporación de terpenos como lo reporta Micalizzi, et al., 2021 (Micalizzi, et al., 2021). En el presente estudio, a través del análisis por cromatografía de gases se logró la cuantificación de 8 terpenos con concentraciones muy variadas. Según lo reportan Byars, et al., 2019 y Micalizzi, et al., 2021, los terpenos más comunes en las plantas de *Cannabis* son β -mirceno, limoneno, linalol, pineno y β -cariofileno, terpenos que se identificaron y cuantificaron en los extractos de las 4 variedades de *Cannabis* analizadas y se reportan en la tabla 17. Al evaluar la concentración total de terpenos obtenidos por variedad con los diferentes métodos de extracción, se observa que el método de extracción rápida resultó más eficiente con valores entre 1073.82 μ g/mL para la variedad A y 623.38 μ g/mL en la

variedad B, resultados consecuentes con las condiciones térmicas de los procesos de extracción llevados a cabo. En la extracción RSO se obtuvo la mayor concentración de terpenos en la variedad D con 800.17 $\mu\text{g/mL}$ y la menor concentración en la variedad C con 469.66 $\mu\text{g/mL}$. Para la extracción soxhlet la variedad con valor más alto de terpenos fue A (884.70 $\mu\text{g/mL}$), muy cercano a la variedad D con 884.21 $\mu\text{g/mL}$, el menor valor se registró en la variedad B con 637.52 $\mu\text{g/mL}$. Al evaluar los terpenos presentes en las variedades, se observó que las variedades A y C registran los valores más altos, especialmente de los terpenos; β -cariofileno, guaiol, α -bisabolol, este perfil de terpenos es similar al presentado por Satyal, et al., 2014, para una planta de *Cannabis* Nepali con un contenido de THC inferior al 1% y un contenido de cannabidiol de alrededor 1,6%, similar a las variedades analizadas, en el estudio se observan valores de terpenos alrededor de 1 mg/g. De forma general se observa que la variedad B registra la menor concentración de terpenos. Hanuš, et al., 2020, reportaron los resultados de 108 quimiotipos de *Cannabis*, donde los principales terpenos que se encontraban por encima del 20% del total de la muestra analizada fueron β -cariofileno (39x), β -mirceno (8x), α -pineno (8x) y limoneno (8x) (Hanus, et al., 2020).

Adicionalmente a las pruebas de identificación y cuantificación de cannabinoides y terpenos en los extractos obtenidos a partir de las cuatro variedades de *Cannabis*, se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y antraquinonas totales por espectrofotometría. Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más abundantes dentro de los metabolitos secundarios, estos se destacan por su marcada acción antioxidante, antimicrobiana, anticáncer, antiinflamatoria, entre otras (Gordo, et al., 2018, Montenegro et al., 2021). Estos compuestos a menudo se asocian con una amplia gama de productos terapéuticos, por lo cual resultó importante identificar su contenido en los extractos de *Cannabis* analizados, observando variabilidad entre los extractos de las cuatro variedades. Los extractos de la variedad A presentaron los valores más altos del contenido de fenoles totales, con valores entre 52.55 mg GAE/L en la extracción soxhlet y 70.12 mg GAE/L en la extracción RSO. En la variedad D, el extracto D-3, con un valor de 50.06 mg GAE/L también reportó valores significativos. Las variedades B y C registraron valores bajos de fenoles totales. Autores como; Ojezele, et al., 2019,

reportaron contenidos de fenoles y flavonoides en extractos metanólicos de *Cannabis*, con valores de 12.66 QE mg/g para flavonoides y 14.19 GAE mg/g para fenoles (Ojezele, et al., 2019). André, et al., 2020 reporta la presencia de fenoles en diferentes variedades analizadas, con valores entre 4.72 mg GEA/g hasta 22.05 mg GEA/g, el determinó que el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos son influenciados por el período de cosecha y la etapa fenológica de la planta, información que se debe tener en cuenta en próximos estudios, por la relación directa con los resultados de actividad antioxidante de los extractos evaluados (André, et al., 2020). Como se puede observar en la tabla 18, el contenido de flavonoides totales y antraquinonas totales de manera general en los extractos no fue significativo al compararlo con otros estudios realizados a extractos de *Cannabis*. En flavonoides el valor más alto se presentó en el extracto D-3 con 6.05 QE mg/L y el menor contenido fue 2.34 QE mg/L en C-1. Para el caso de antraquinonas totales los valores fueron muy cercanos en todos los extractos, con valores entre 4.00 EE mg/L en el extracto C-1 y 4.95 EE mg/L en A-2. Ahmed, et al., 2019, reportaron contenidos fenólicos máximos derivados del etanol de hojas de *Cannabis sativa L.* de 2.7 mg GAE/g y 56 mg QE/g para flavonoides totales (Ahmed, et al., 2019).

3.6 Conclusiones

- Al analizar las cuatro variedades de *Cannabis* que se cultivan y procesan en el Departamento del Cauca a través del método cromatográfico UHPLC-DAD, después de extracción por tres procedimientos convencionales con etanol 99.5%; extracción rápida, extracción RSO y extracción soxhlet, se logró determinar que el cannabinoide mayoritario en todos los procesos de extracción es el CBDA, en menor porcentaje CBD, el cannabinoide CBG, solo se logró cuantificar en la extracción rápida de la variedad B, con un porcentaje de 1,23%, mientras que el THCA no se logró cuantificar en la variedad C. Estos resultados sugieren la influencia del proceso de extracción en la composición final del extracto.
- De las metodologías de extracción empleadas en la investigación, el método soxhlet fue el más eficiente en la obtención de los fitocannabinoides, alcanzando

porcentajes de hasta un 50% más que los otros métodos.

- En la extracción rápida, la variedad A presentó el mayor contenido de terpenos con un valor de 1073 $\mu\text{g/mL}$, siendo β -cariofileno, guaiol y α -bisabolol los mayoritarios, al igual que en la variedad C. Se logró determinar que la extracción rápida resulta más eficiente que los otros procesos de extracción. Para la variedad D, el método de extracción soxhlet registró un mayor contenido del terpeno α -pineno, mientras que en la extracción RSO el mayor contenido fue de β -cariofileno. Se evidencia la influencia del método de extracción sobre el contenido de los terpenos.
- Los resultados de las pruebas de cuantificación de fenoles, flavonoides y antraquinonas totales, metabolitos secundarios importantes al evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *Cannabis*, muestran que las variedades A y D presentaron el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales. Siendo estas las variedades promisorias para alcanzar los mayores porcentajes de actividad antioxidante.
- Los resultados permiten brindar a los productores de *Cannabis* del Cauca y la comunidad académica, un acercamiento a la composición química que se puede encontrar en *Cannabis* de la región, al utilizar métodos de extracción simples y económicos para fitoconstituyentes que podrían extenderse a extractos medicinales, sin embargo, como ya se observó, la composición podría variar de acuerdo con el método de extracción empleado.

3.7 Bibliografia

Ahmed, M., Ji, M., Qin, P., Gu, Z., Liu, Y., Sikandar, A., & Javeed, A. (2019). Phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of *Citrullus colocynthis* L. and *Cannabis sativa* L. *Appl. Ecol. Environ. Res*, *17*, 6961-6979.

Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*, *7*, 19.

André, A., Leupin, M., Kneubühl, M., Pedan, V., & Chetschik, I. (2020). Evolution of the polyphenol and terpene content, antioxidant activity and plant morphology of eight different fiber-type cultivars of *Cannabis sativa* L. cultivated at three sowing densities. *Plants*, *9*(12), 1740.

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, *49*(6), 462-468.

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. *The Journal of Supercritical Fluids*.

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*, *31*(4), 516-521.

Bernstein, N., Gorelick, J., & Koch, S. (2019). Interplay between chemistry and morphology in medical *Cannabis* (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, *129*, 185-194.

Backstrom, B., Cole, M. D., Carrott, M. J., Jones, D. C., Davidson, G., & Coleman, K. (1997). A preliminary study on the analysis of *Cannabis* by supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectroscopic detection. *Science and Justice*, *37*(2), 91-98.

Booth, J. K., & Bohlmann, J. (2019). Terpenes in *Cannabis sativa*—from plant genome to humans. *Plant Science*, *284*, 67-72.

Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of ethnopharmacology*, *227*, 300-315.

Bowen, J. K., Chaparro, J. M., McCorkle, A. M., Palumbo, E., & Prenni, J. E. (2021). The impact of extraction protocol on the chemical profile of *Cannabis* extracts from a single cultivar. *Scientific reports*, *11*(1), 1-10.

Brenneisen, R. (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents. In *Marijuana and the Cannabinoids* (pp. 17-49). Humana Press.

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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.049>

Byars, T., Theisen, E., & Bolton, D. L. (2019, June). Using *Cannabis* to treat cancer-related pain. In *Seminars in oncology nursing* (Vol. 35, No. 3, pp. 300-309). WB Saunders.

Broseus, J., Anglada, F., & Esseiva, P. (2010). The differentiation of fibre-and drug type *Cannabis* seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools. *Forensic Science International*, *200*(1-3), 87-92.

Casajuana Kögel, C., López-Pelayo, H., Balcells-Olivero, M. M., Colom, J., & Gual, A. (2018). Psychoactive constituents of *Cannabis* and their clinical implications: a systematic review. *Adicciones*, *30*(2).

Cao, J., Hao, L., Zhang, L., Xu, M., & Ge, H. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of Total flavonoids from China-hemp leaves and evaluation of its antioxidant activities. *International Conference on Applied Biotechnology*, 555-567

Casano, S., Grassi, G., Martini, V., & Michelozzi, M. (2010, August). Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and 925* (pp. 115-121).

Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M. A., Walker, L. A., & Potter, D. (2017). *Cannabis* cultivation: methodological issues for obtaining medical-grade product. *Epilepsy & Behavior*, *70*, 302-312.

Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2016). Medicinal *Cannabis*: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *128*, 201-209.

Citti, C., Linciano, P., Forni, F., Vandelli, M. A., Gigli, G., Laganà, A., & Cannazza, G. (2019). Analysis of impurities of cannabidiol from hemp. Isolation, characterization and synthesis of cannabidibutol, the novel cannabidiol butyl analog. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.

Citti, C., Linciano, P., Russo, F., Luongo, L., Iannotta, M., Maione, S., & Cannazza, G. (2019). A novel phytocannabinoid isolated from *Cannabis sativa* L. with an in vivo cannabimimetic activity higher than Δ 9-tetrahydrocannabinol: Δ 9-Tetrahydrocannabiphorol. *Scientific reports*, *9*(1), 1-13.

De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, *1217*(16), 2383-2389.

De Meijer, E. P., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V. C., Ranalli, P., & Mandolino, G. (2003). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, *163*(1), 335-346.

Devi, V., & Khanam, S. (2019). Comparative study of different extraction processes for hemp (*Cannabis sativa*) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *Journal of Cleaner Production*, *207*, 645-657. Devi, V., & Khanam, S. (2019). Comparative study of different extraction processes for hemp (*Cannabis sativa*) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *Journal of Cleaner Production*, *207*, 645-657.

De Vita, D., Madia, V. N., Tudino, V., Saccoliti, F., De Leo, A., Messori, A., Santilli, G. (2019). Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from *Cannabis*. *Natural product research*, 1-7.

Di Marzo, V., Stella, N., & Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(1), 30-42.

Drinić, Z., Vidović, S., Vladić, J., Koren, A., Kiproviski, B., & Sikora, V. (2018). Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of *Cannabis sativa* L. *Lekovite sirovine*, (38), 17-21.

Fiorini, D., Scortichini, S., Bonacucina, G., Greco, N. G., Mazzara, E., Petrelli, R., Cespi, M. (2020). Cannabidiol-enriched hemp essential oil obtained by an optimized microwave-assisted extraction using a central composite design. *Industrial crops and products*, *154*, 112688. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112688>

Fishedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, *71*(17-18), 2058-2073.

Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry reviews*, *7*(3), 615-639.

Gallo-Molina, A. C., Castro-Vargas, H. I., Garzón-Méndez, W. F., Ramírez, J. A. M., Monroy, Z. J. R., King, J. W., & Parada-Alfonso, F. (2019). Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, *146*, 208-216.

Giese, M. W., Lewis, M. A., & Giese, L. (2019). *U.S. Patent No. 10,502,750*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Giese, M. W., Lewis, M. A., Giese, L., & Smith, K. M. (2015). Method for the analysis of cannabinoids and terpenes in *Cannabis*. *Journal of AOAC International*, *98*(6), 1503-1522.

Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, *9*(1), 81-104.

Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, *24*(13), 2471.

- Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/terpenoids in cannabis: are they important?. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 25-60.
- Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kagami, N., & Kawatsura, K. (2005). Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar– sorptive extraction method with GC-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12), 4701-4707.
- Krill, C., Rochfort, S., & Spangenberg, G. (2020). A high-throughput method for the comprehensive analysis of terpenes and terpenoids in medicinal *Cannabis* biomass. *Metabolites*, 10(7), 276.
- Kim, T., Song, B., Cho, K. S., & Lee, I. S. (2020). Therapeutic potential of volatile terpenes and terpenoids from forests for inflammatory diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2187
- Koltai, H., & Namdar, D. (2020). *Cannabis* phytomolecule 'entourage': from domestication to medical use. *Trends in plant science*, 25(10), 976-984.
- Harman-Ware, A. E., Sykes, R., Peter, G. F., & Davis, M. (2016). Determination of terpenoid content in pine by organic solvent extraction and fast-GC analysis. *Frontiers in Energy Research*, 4, 2
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American journal of botany*, 91(6), 966-975.
- Hillig, K. W. (2004). A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochemical systematics and ecology*, 32(10), 875-891.
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. *Current protocols in plant biology*, 1(2), 345-358
- Jin, D., Henry, P., Shan, J., & Chen, J. (2021). Identification of chemotypic markers in three chemotype categories of *Cannabis* using secondary metabolites profiled in inflorescences, leaves, stem bark, and roots. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Leung, L. (2011). *Cannabis* and its derivatives: review of medical use. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 24(4), 452-462.
- Lewis, M. M., Yang, Y., Wasilewski, E., Clarke, H. A., & Kotra, L. P. (2017). Chemical profiling of medical *Cannabis* extracts. *ACS omega*, 2(9), 6091-6103.

Livingston, S. J., Quilichini, T. D., Booth, J. K., Wong, D. C., Rensing, K. H., Laflamme-Yonkman, J., & Samuels, A. L. (2020). *Cannabis* glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *The Plant Journal*, *101*(1), 37-56

Lieb Gott, T., Miollan, M., Berchadsky, Y., Drieu, K., Culcasi, M., & Pietri, S. (2000). Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. *Basic research in cardiology*, *95*(5), 368-377.

Linciano, P., Russo, F., Citti, C., Tolomeo, F., Paris, R., Fulvio, F., & Cannazza, G. (2021). The novel heptyl phorolic acid cannabinoids content in different *Cannabis sativa* L. accessions. *Talanta*, *235*, 122704.

Machaca Gonzales, L. F. (2021). Proceso de extracción del aceite de *Cannabis* de la marihuana (*Cannabis sativa* L.) a nivel de laboratorio.

McLaren, J., Swift, W., Dillon, P., & Allsop, S. (2008). *Cannabis* potency and contamination: a review of the literature. *Addiction*, *103*(7), 1100-1109.

Mellado M. (2012). Phytochemical study, Antioxidant and Antifungal Activity Evaluation of Mainly Metabolites and Extracts of *Muehlenbeckia hastulata* Johnst. Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María

Méndez Pérez, F. A. (2018). Optimización de la obtención del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de *Cannabis sativa* L. "marihuana". Ayacucho 2018.

Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). *Cannabis Sativa* L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, *1637*, 461864

Montenegro, I., Moreira, J., Ramírez, I., Dorta, F., Sánchez, E., Alfaro, J. F., & Seeger, M. (2021). Chemical Composition, Antioxidant and Anticancer Activities of *Leptocarpha rivularis* DC Flower Extracts. *Molecules*, *26*(1), 67.

Moreno, T., Montanes, F., Tallon, S. J., Fenton, T., & King, J. W. (2020). Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents:

An overview of different processing options. *The Journal of Supercritical Fluids*, 161, 104850.

Mosquera, O. M., González, L. M., Cortés, Y. J., & Camargo, J. C. (2015). Caracterización fitoquímica, determinación del contenido de lignina y la actividad antioxidante de los culmos de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 11(2), 124-135.

Musetti, B. (2016). Perfil de cannabinoides y actividad antioxidante de *Cannabis sativa*.

Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., & Koltai, H. (2018). Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 113, 376-382.

Ojezele, M. O., Ewhre, L. O., Adeosun, A. M., & Ojezele, O. J. (2019). Phytochemical content of *Cannabis sativa* methanol extract and *in vitro* antioxidant activities of its solvent fractions. *Journal of Phytomedicine and Therapeutics*, 18(2), 328-337.

Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *BioMed research international*, 2018.

Pellegrini, M., Palmieri, S., Ricci, A., Serio, A., Paparella, A., & Lo Sterzo, C. (2020). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. cv 'Futura 75' essential oil. *Natural Product Research*, 1-5.

Perveen, S., & Al-Taweel, A. (Eds.). (2018). *Terpenes and terpenoids*. BoD Books on Demand.

Ramirez, C. L., Fanovich, M. A., & Churio, M. S. (2019). Cannabinoids: extraction methods, analysis, and physicochemical characterization. In *Studies in natural products chemistry* (Vol. 61, pp. 143-173). Elsevier.

Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., Safari, M., Askari, G., & Salami, M. (2019). Microwave-assisted extraction of hempseed oil: studying and comparing of fatty acid composition, antioxidant activity, physicochemical and thermal properties with Soxhlet

extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 56(9), 4198-4210. doi:10.1007/s13197-019-03890-8.

Rovetto, L. J., & Aieta, N. V. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *The Journal of Supercritical Fluids*, 129, 16-27.

Salha, G. B., Abderrabba, M., & Labidi, J. (2019). A status review of terpenes and their separation methods. *Reviews in Chemical Engineering*

Salbini, M., Quarta, A., Russo, F., Giudetti, A. M., Citti, C., Cannazza, G., & Gaballo, A. (2021). Oxidative stress and multi-organel damage induced by two novel phytocannabinoids, CBDB and CBDP, in breast cancer cells. *Molecules*, 26(18), 5576.

Sandiego Villaverde, P. Técnicas de extracción y caracterización de cannabinoides a partir de la planta de *Cannabis sativa* L.

Satyral, P., & Setzer, W. N. (2014). Chemotyping and determination of antimicrobial, insecticidal, and cytotoxic properties of wild-grown *Cannabis sativa* from Nepal. *Journal of Medicinally Active Plants*, 3(1), 9-16

Sato, M., Goto, M., & Hirose, T. (1996). Supercritical fluid extraction on semibatch mode for the removal of terpene in citrus oil. *Industrial & engineering chemistry research*, 35(6), 1906-1911

Scortichini, M., & Rossi, M. P. (1991). Preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(2), 109-112.

Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The *Cannabis* Terpenes. *Molecules*, 25(24), 5792.

Staginnus, C., Zörntlein, S., & de Meijer, E. (2014). A PCR marker Linked to a THCA synthase Polymorphism is a Reliable Tool to Discriminate Potentially THC-Rich Plants of *Cannabis sativa* L. *Journal of forensic sciences*, 59(4), 919-926.

Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). Molecular pharmacology of phytocannabinoids. *Phytocannabinoids*, 61-101.

Tzimas, P. S., Petrakis, E. A., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2021). Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type *Cannabis sativa* L. by UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization

of extraction methodology. *Analytica Chimica Acta*, 1150. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338200>.

Vaccarini, C. A. (2020). *Determinación de cannabinoides en distintas estructuras de la planta de Cannabis sativa sp. y derivados de la misma mediante HPLC/UV-DAD* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Vaclavik, L., Benes, F., Fenclova, M., Hricko, J., Krmela, A., Svobodova, V., & Mastovska, K. (2019). Quantitation of cannabinoids in *Cannabis* dried plant materials, concentrates, and oils using liquid chromatography–diode array detection technique with optional mass spectrometric detection: Single-laboratory validation study, first action 2018.11. *Journal of AOAC International*, 102(6), 1822-1833.

Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific.

Yang, L., Wang, H., Zu, Y. G., Zhao, C., Zhang, L., Chen, X., & Zhang, Z. (2011). Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 172(2-3), 705-712.

Zekič, J., & Križman, M. (2020a). Development of Gas-Chromatographic method for simultaneous determination of cannabinoids and terpenes in hemp. *Molecules*, 25(24), 5872. <https://doi.org/10.3390/molecules25245872>

Zekič, J., & Križman, M. (2020b). Development of Gas-Chromatographic method for simultaneous determination of cannabinoids and terpenes in hemp. *Molecules*, 25(24), 5872. <https://doi.org/10.3390/molecules25245872>

CAPÍTULO 4. Evaluación de la actividad biológica de *Cannabis sativa* L. que se cultiva en el departamento del Cauca

4.1 Resumen

Cannabis medicinal puede tener efectos terapéuticos sobre diversas enfermedades que van desde el dolor crónico, esclerosis múltiple hasta algunos tipos de cáncer. Actualmente se realizan estudios clínicos y preclínicos para evaluar la eficacia y seguridad del consumo de los cannabinoides, especialmente CBD y THC. A pesar que cada día se cuenta con más estudios del potencial medicinal de éstos cannabinoides, existen pocos estudios enfocados en los cannabinoides ácidos como el CBDA. En el presente trabajo de investigación se realizaron pruebas para conocer el potencial antioxidante y anticancerígeno de cuatro variedades de *Cannabis* cultivadas en el departamento del Cauca, cuyos extractos presentaban mayor contenido del cannabinoide ácido (CBDA). Se comparó el contenido de fitoconstituyentes (cannabinoides, terpenos, fenoles, flavonoides y antraquinonas totales) con la actividad antioxidante (DPPH, ABTS y TRAP) y el efecto sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer (ensayo de sulforrodamina B) en los 11 extractos. Los resultados permitieron observar la citotoxicidad de los extractos en la línea de células tumorales MFC-7 (cáncer de mama). Efectos menos significativos en las líneas celulares HT-29 (cáncer de colon) y PC-3 (cáncer de próstata), finalmente se calculó el índice de selectividad para los extractos que mejor resultados de IC₅₀ presentaron.

Palabras claves: Cáncer, citotoxicidad, actividad antioxidante, líneas celular de cáncer.

4.2 Summary

Medicinal *Cannabis* can have therapeutic effects on various diseases ranging from chronic pain, multiple sclerosis to some types of cancer. Preclinical and clinical studies are currently being carried out to evaluate the efficacy and safety of the consumption of cannabinoids, especially CBD and THC. Although every day there are more studies of

the medicinal potential of these cannabinoids, there are few studies focused on acid cannabinoids such as CBDA. In the present research work, tests were carried out to know the antioxidant and anticancer potential of four varieties of *Cannabis* grown in the department of Cauca, whose extracts had a higher content of the acid cannabinoid (CBDA). The content of phytoconstituents (cannabinoids, terpenes, phenols, flavonoids and total anthraquinones) was compared with the antioxidant activity (DPPH, ABTS and TRAP) and the effect on cell viability in cancer cell lines (sulforhodamine B test) in the 11 extracts. The results allowed to observe the cytotoxicity of the extracts in the tumor cell line MFC-7 (breast cancer). Less significant effects in the cell lines HT-29 (colon cancer) and PC-3 (prostate cancer), finally the selectivity index was calculated for the extracts that showed the best results of IC50.

Keywords: Cancer, cytotoxicity, antioxidant activity, cancer cell lines.

4.3 Introducción

Las propiedades medicinales de las plantas de *Cannabis* cada día se estudian con mayor interés por los resultados que se han obtenido, sobre todo en los últimos años. Esta especie de plantas contienen un espectro bastante interesante de compuestos químicos, los fitocannabinoides son los más estudiados, pero también se han identificado una gran variedad de metabolitos secundarios como los terpenos, fenoles y flavonoides, entre otros, metabolitos de los cuales hace mucho tiempo se ha estudiado su potencial bioactivo (Gordo, et al., 2018, Byars, et al., 2019), especialmente los efectos protectores, antioxidantes y antitumorales (Pellati, et al., 2018). Los efectos farmacológicos de los cannabinoides son mediados por una gran variedad de receptores, especialmente los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) y receptores acoplados a proteína G (Morales, et al., 2017). Para conocer el funcionamiento del sistema endocannabinoide se han utilizado cannabinoides sintéticos y semisintéticos en busca de conocer los modos de unión del receptor y las relaciones de actividad funcional estructura - CB1/CB2 (Bow, et al., 2016; Turner, et al., 2017; Morales, et al., 2017). El cannabidiol (CBD), es uno de los cannabinoides más estudiados, es un cannabinoide no psicoactivo al cual diferentes estudios le atribuyen propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antitumorales, entre otras (Takeda, et al., 2012, Sharafi, et al., 2019, Steele, et al., 2019,

Daris, et al., 2019, Tomko, et al., 2020, Meng, et al., 2020). Estudios *in vitro* revelaron que el CBD muestra efectos antagonistas débiles de CB1 y CB2. (Pertwee, et al., 2002, Thomas, et al., 2007, Mechoulam, et al., 2007). Estudios preclínicos se han centrado en el papel del CBD como molécula anticancerosa, muchos estudios evidencian su capacidad antioxidante, lo que sugiere un papel importante en la prevención de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Pelletti, et al., 2018). En el 2016, la sociedad estadounidense de Oncología clínica publicó pautas donde incluían el uso de *Cannabis* y cannabinoides, para ayudar a los sobrevivientes de cáncer a controlar el dolor crónico (Byars, et al., 2019).

Se ha determinado que el precursor ácido del CBD (ácido cannabidiólico) puede inhibir la migración de las células del cáncer de mama, lo que direcciona el interés sobre los cannabinoides ácidos. Los terpenos al igual que los cannabinoides muestran efectos terapéuticos únicos que pueden contribuir significativamente a los efectos secundarios de los extractos medicinales a base de *Cannabis* (Casano, et al 2010, Sommano, et al., 2020). Aunque son muchos los estudios de actividad biológica que se han realizado a los compuestos aislados de *Cannabis*, actualmente está ganando fuerza el conocer el efecto sinérgico de los metabolitos presentes en la planta: el efecto séquito (Baron, 2018), (Turner, et al., 2017, Gustavo, et al., 2019, Koltai, et al., 2020). Las interacciones fitocannabinoides-terpenoides podrían producir sinergia con respecto al tratamiento del dolor, la inflamación, la depresión, la ansiedad, la adicción, la epilepsia, el cáncer y las infecciones fúngicas y bacterianas (Leung, 2011, Russo, 2011, Hazekamp, et al., 2016, Brierley, et al; 2016, Chandra, et al., 2017, Blake, et al., 2017, Berman, et al., 2018, Baram, et al., 2019).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante (Kuskoski, et al., 2005, Palomino, et al., 2009, Miguel, 2010; Cobo, 2016), métodos *in vitro* e *in vivo*, uno de los métodos más utilizados al evaluar compuestos fenólicos presentes en extractos de *Cannabis*, captando los radicales libres generados y permitiendo evaluar los efectos en contra de los procesos de oxidación, que implican especies reactivas de oxígeno (capacidad antioxidante) se realiza exponiendo los extractos a sustancias cromógenas de

naturaleza radical como ABTS, DPPH y FRAP. Para conocer la actividad citotóxica de moléculas útiles en el tratamiento de cáncer, uno de los métodos más utilizados para el tamizaje *in vitro* de extractos, es el ensayo empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos (Monks, et al., 1991, Bosio, et al., 2015, Taborga, et al., 2016). Uno de los métodos de tinción celular que se utiliza para estimar de forma indirecta el número de células viables, luego del tratamiento con las concentraciones del xenobiótico es la tinción con sulforodamina B (SRB) el cual, por su afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, se fija selectivamente en éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular (Monks, et al., 1991, Escobar, et al., 2010, Montenegro, et al., 2021).

Actualmente se realizan estudios clínicos y preclínicos para evaluar la eficacia y seguridad del consumo de los cannabinoides, especialmente CBD (Larsen, et al., 2020) y THC, pero existen pocos estudios enfocados en los cannabinoides ácidos como el CBDA. Por ello, el capítulo 4 desea aportar al desarrollo de la región en el conocimiento de las propiedades terapéuticas de plantas medicinales con un soporte científico, por lo cual después de evaluar las características morfológicas y fitoquímicas de *Cannabis sativa* que se cultiva en el departamento del Cauca, realizó estudios de actividad antioxidante a través de las pruebas: capacidad antioxidante total (TRAP), ensayo de actividad secuestradora del radical DPPH y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), y pruebas biológicas de viabilidad celular en líneas celulares humanas de cáncer; una línea de cáncer de mama MCF-7 (Adenocarcinoma humano de glándula mamaria), una línea de cáncer de colon HT-29 (Adenocarcinoma humano colorrectal), y una línea de cáncer de próstata PC-3 (Adenocarcinoma humano de próstata), todos tipos de cáncer de interés nacional e internacional por su elevada incidencia. Además se utilizó una línea celular no tumoral de epitelio de mama, MCF-10A, como control.

4.4 Resultados

4.4.1 Capacidad antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de *Cannabis*, se utilizaron tres métodos que permitieron conocer mejor el mecanismo de acción de los componentes

presentes en los extractos de las variedades analizadas (A, B, C y D), para lo cual se sugiere la evaluación del extracto con al menos un ensayo basado en la transferencia de hidrógeno (HAT) como lo es el ensayo TRAP, y dos ensayos basados en la transferencia de un electrón (SET) como los ensayos FRAP y DPPH (Dai & Mumper, 2010; Moharram & Youssef, 2014; Pisoschi *et al.*, 2016).

En la tabla 19, se registraron los resultados obtenidos expresados en mM de TEAC para ABTS y FRAP, en el caso de DPPH se expresa en IC₅₀ (mg/mL). En TRAP se evalúa la capacidad antioxidante total a través del mecanismo HAT en la reducción de un radical coloreado estable denominado ABTS-radical, en FRAP el efecto reductor del ion férrico a través de mecanismos SET, y DPPH que también es un radical coloreado estable que es considerada una prueba dual, tanto HAT como SET, y a diferencia de las otras pruebas, los datos son calculados como concentración inhibitoria media (IC₅₀), por tanto mientras menor sea su IC₅₀ mejor capacidad antioxidante tendrá.

Se puede observar en los resultados, que los extractos de la variedad A registran valores promedio muy significativos en la prueba ABTS entre 0.76 mM de TEAC en la extracción soxhlet hasta 1.08 mM de TEAC en la extracción rápida, valores muy cercanos a los compuestos antioxidantes puros que se usaron de referencia; 1.13 de mM de TEAC para el ácido gálico (GA) y 1.06 mM de TEAC para butilhidroxitolueno (BHT) p<0,05). Por lo tanto, el mecanismo de acción antioxidante de los componentes de los 3 extractos de la variedad A, estarían basados en la transferencia de protones. En el ensayo DPPH se observa que los extractos A-3 con un valor de 29.49 mg/mL, B-3 con 35.96 mg/mL y D-3 con 23.06 mg/mL, extractos obtenidos por el método soxhlet, fueron más activos en comparación con los otros métodos de extracción, aunque registran poca actividad en comparación con el control positivo Trolox (T) con 0.11 mg/mL (p<0,05). En el ensayo FRAP se observa que los extractos con valores entre 0.35 TEAC μ M y 0.49 TEAC μ M de forma general tenían una muy baja actividad antioxidante que los controles positivos.

Tabla 19. Evaluación de la capacidad antioxidante

Extracto	^a TRAP (TEAC mM) ± DE	^b DPPH- TEAC (IC ₅₀ mg/mL) ± DE	^a FRAP (TEAC μM) ± DE
A-1	*1.082 ± 0.041	59.147 ± 2.721	*0.38 ± 0.03
A-2	*0.979 ± 0.075	*33.950 ± 4.296	*0.37 ± 0.02
A-3	*0.766 ± 0.031	*29.491 ± 0.560	*0.35 ± 0.01
B-1	*0.525 ± 0.069	54.162 ± 2.496	0.38 ± 0.03
B-2	0.355 ± 0.009	54.751 ± 8.538	0.39 ± 0.02
B-3	0.342 ± 0.052	*35.965 ± 0.116	0.41 ± 0.03
C-1	0.263 ± 0.034	56.556 ± 0.282	0.43 ± 0.03
C-2	0.345 ± 0.066	53.509 ± 4.294	*0.49 ± 0.02
C-3	0.220 ± 0.008	65.606 ± 2.718	*0.41 ± 0.04
D-2	*0.522 ± 0.055	*40.583 ± 1.026	*0.44 ± 0.06
D-3	*0.699 ± 0.029	*23.057 ± 0.588	*0.4.8 ± 0.04
Ácido Gálico	1.139 ± 0.014	N.A.	1729 ± 0.026
BHT	1.063 ± 0.028	0.061 ± 0.000	1525 ± 0.077
TROLOX	N.A.	0.107 ± 0.006	N.A.

^aExpresados en capacidad antioxidante de equivalentes TROLOX.

^bConcentración a la que el 50% del radical es neutralizado (IC₅₀).

Los valores representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE)

*Corresponde a los valores que mostraron diferencias significativas p<0,05, n = 3.

4.4.2 Actividad Citotóxica

La citotoxicidad de los extractos se evaluó *in vitro* frente a diferentes líneas celulares cancerosas: cáncer de colón HT-29; cáncer de próstata humano PC-3 y cáncer de mama MCF7, y teniendo en cuenta que la mayoría de fármacos presentan toxicidad frente a células normales, es importante conocer la toxicidad de los extractos analizados en una línea celular no tumoral MCF10, por ello se utilizó el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B para estimar los valores de IC₅₀; para lo cual se siguió el protocolo propuesto por Vichai y Kirtikara (Vichai, et al., 2006). Se evaluó por triplicado 4 diluciones (de 12,5 a 100 μg/mL) para cada uno de los 11 extractos obtenidos a partir de las 4 variedades de *Cannabis*. Los gráficos 8-11, muestran los resultados del porcentaje de viabilidad obtenidos para cada extracto permitiendo comparar las muestras con el control solvente y el porcentaje de viabilidad de la línea MCF-10A, estos resultados permiten observar que a algunas concentraciones no tóxicas contra células no tumorales, algunos de los extractos de *Cannabis* analizados, reducen la viabilidad celular de células cancerosas de mama, como se puede observar en los porcentajes de viabilidad a una

concentración de 50 y 100 $\mu\text{g/L}$ para los extractos A-1, 23.06%, A-2 con 34.12 % y A-3 con 33.42%. Para los extractos de la variedad B, se observa porcentajes de viabilidad muy significativos en las líneas de cáncer de mama y cáncer de colón, con valores de 19.66 % en la línea MCF7 y 53.45 % para la línea HT29 el extracto B-3. Para cáncer de mama en el extracto C-1 se observa un valor significativo con 39.40 % y de 35.73 % en el extracto D-3.

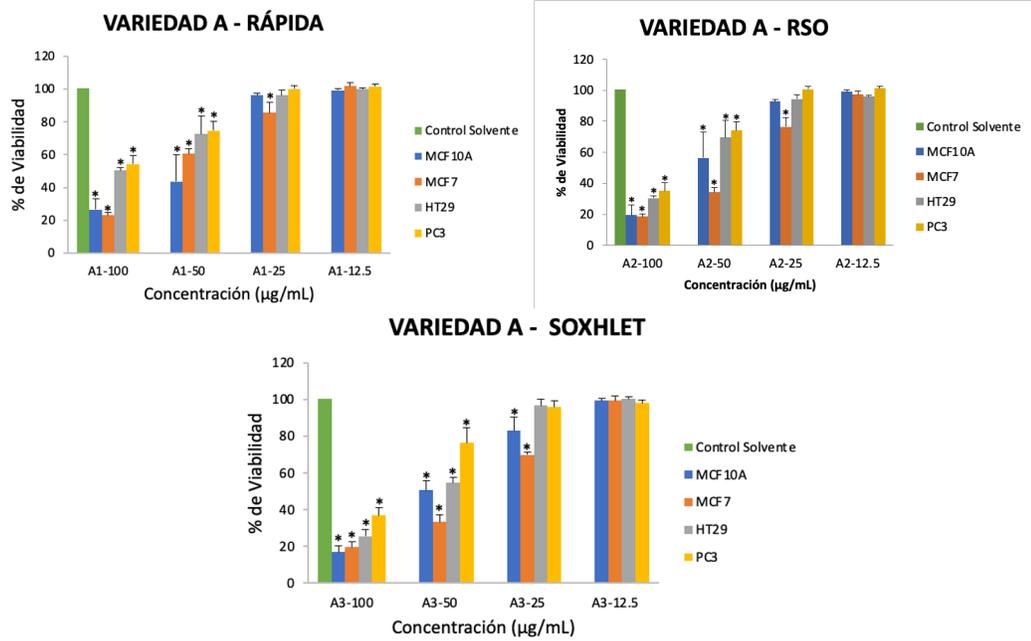
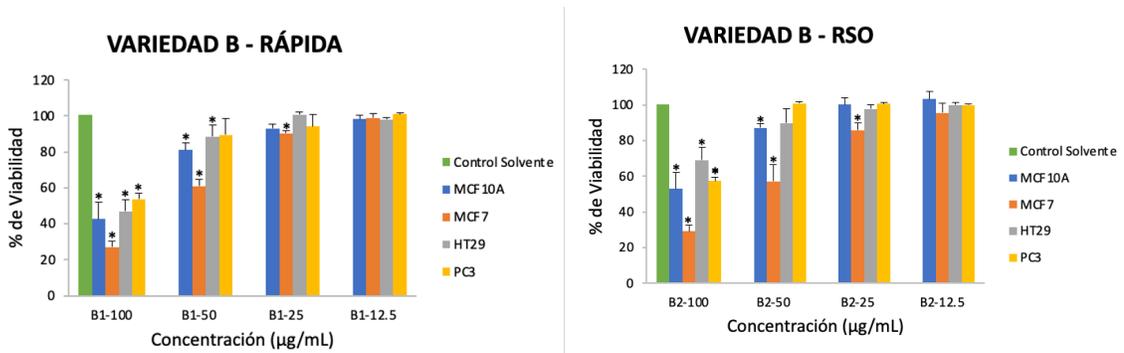


Gráfico 8. Porcentaje de viabilidad de la variedad A en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.



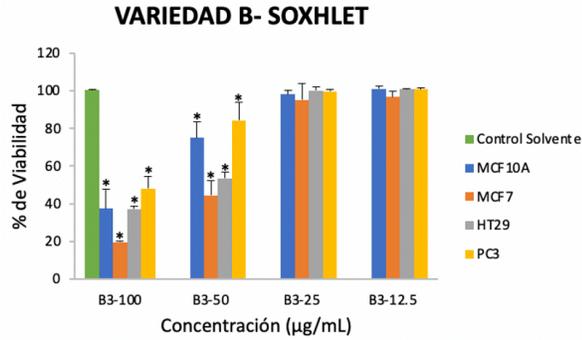
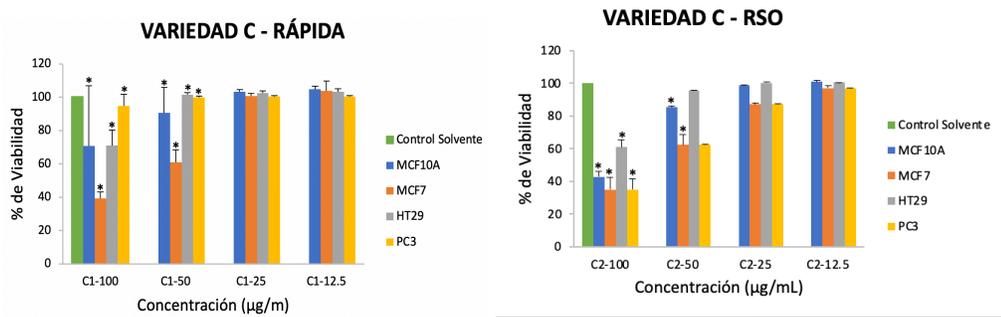


Gráfico 9. Porcentaje de viabilidad de la variedad B en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3



VARIEDAD C - SOXHLET

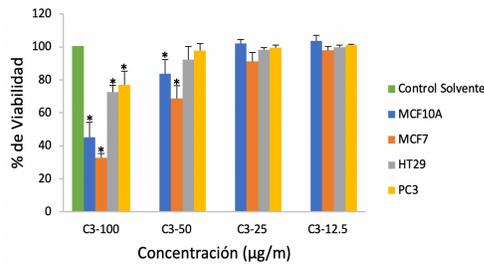


Gráfico 10. Porcentaje de viabilidad de la variedad C en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.

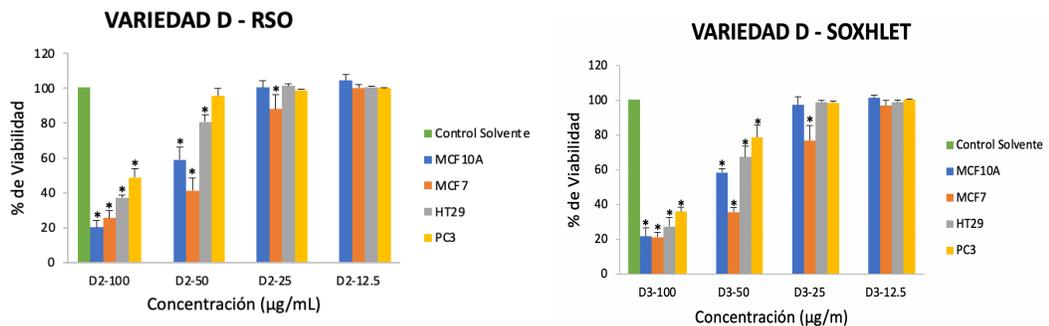


Gráfico 11. Porcentaje de viabilidad de la variedad D en líneas celulares MCF10A, MCF7, HT29 Y PC3.

Con los resultados obtenidos de viabilidad celular se calculó la IC₅₀ para los extractos (ver tabla 20). Los valores calculados están en el rango de 29.6 µg/mL en A-3

con el más bajo IC₅₀ (la más alta citotoxicidad) en la línea celular MCF-7 hasta el extracto C-2 el cual presentó valores superiores a 150 µg/mL en todas las líneas celulares. Los datos obtenidos de IC₅₀ permitieron calcular el índice de selectividad (SI).

Tabla 20. IC₅₀ (µg/mL) de los extractos de Cannabis contra diferentes líneas celulares de cáncer.

Valores IC ₅₀ (µg/mL)				
Extracto	MCF-10	MCF-7	HT-29	PC-3
A-1	41.2 ± 2.8	61.4 ± 8.3	49.0 ± 3.1	48.2 ± 1.3
A-2	50.2 ± 2.1	33.2 ± 0.8	61.1 ± 7.5	52.7 ± 3.1
A-3	49.3 ± 3.9	29.6 ± 0.9	46.1 ± 0.7	70.3 ± 17.8
B-1	>150	53.7 ± 2.7	52.7 ± 7.5	>150
B-2	66.5 ± 6.2	50.4 ± 6.1	113.2 ± 34.5	95.9 ± 0.2
B-3	57.8 ± 8.3	43.6 ± 1.6	44.3 ± 3.0	60.7 ± 16.6
C-1	>150	>150	61.3 ± 16.7	>150
C-2	>150	>150	>150	>150
C-3	51.8 ± 15.8	71.8 ± 17.7	>150	>150
D-2	49.4 ± 0.9	36.9 ± 1.6	51.4 ± 5.9	>150
D-3	49.2 ± 0.9	32.9 ± 1.3	52.0 ± 1.9	60.1 ± 8.1

Los valores representan la media de tres experimentos con tres repeticiones ± la desviación estándar (DE)

4.4.3 Índice selectivo (SI)

Los índices de selectividad se calculan con base a la relación de la concentración citotóxica al 50 % de la línea de control (MCF-10) y la concentración inhibitoria al 50 % (líneas tumorales MCF-7, HT-29 y PC-3); (IC₅₀ Control/IC₅₀ Cáncer). Si el valor del SI es > 2 (Koch *et al.*, 2005; Badisa *et al.*, 2009), indica que los extracto son más citotóxicos para las células tumorales que para las células normales.

En la tabla 21 se registran los extractos que presentaron actividad selectiva contra células cancerosas de cáncer de mama y colon. Los extractos A-2 (>1.5), A-3 (>1.7), B-1 (>2.8 en MCF7 y HT29), C-1 (>2.5 en HT29) y D-3 (>1.5) mostraron efectos inhibidores contra la viabilidad de las células cancerosas, con valores de SI superiores a 1.5, son de interés para futuros estudios.

Tabla 21. Índice de selectividad

ÍNDICE DE SELECTIVIDAD			
EXTRACTO	MCF-7	HT-29	PC-3
A-1	0.671	0.841	0.855
A-2	>1.5	0.822	0.953
A-3	>1.7	1.069	0.701
B-1	>2.8	>2.8	1.000
B-2	1.319	0.587	0.693
B-3	1.326	1.305	0.952
C-1	1.000	>2.5	1.000
C-2	1.000	1.000	1.000
C-3	0.721	0.345	0.345
D-2	1.339	0.961	0.329
D-3	>1.5	0.946	0.819

4.4.4 Correlación entre la citotoxicidad, la capacidad antioxidante y el contenido de los fitoconstituyentes

Cannabis es una planta con un amplio espectro de compuestos, entre los que se destacan los cannabinoides, terpenos, fenoles, flavonoides y antraquinonas. La variación en el contenido de estos metabolitos secundarios se atribuye principalmente a los procesos biosintéticos y las condiciones a las cuales está expuesta la planta durante el cultivo. Son muchos los estudios que reportan que el contenido de estos metabolitos que se encuentran en las plantas de *Cannabis* puede jugar un papel importante en el tratamiento de diferentes patologías, entre las que se incluye el cáncer, por ello la importancia de correlacionar los datos obtenidos en busca de encontrar los metabolitos que mayor incidencia tienen en los resultados de actividad antioxidante y citotoxicidad.

Para evaluar la relación entre las variables obtenidas, se realizó correlación de Spearman utilizando el software Statistica 7.0. En la Tabla 22, se registró los datos obtenidos con una correlación significativa ($p < 0,05$), en ella se puede observar que la concentración de cannabinoides CBD y CBDA mostraron una correlación positiva alta al relacionarlos con el cannabinoide THCA ($R=0,91$ y $R=0,95$) respectivamente, lo cual indica que el aumento de estos cannabinoides en los extractos se relaciona de manera

directamente proporcional. Al observar los datos de correlación de cannabinoides y terpenos, sólo se observó correlación positiva media entre el CBDA y el humuleno ($R=0,61$) y el THCA y el β -mirceno ($R=0,66$). La correlación de los cannabinoides CBD y CBDA con los otros fitoconstituyentes analizados presentó una correlación positiva media, con valores de $R \cong 0,70$ para fenoles totales, $R \cong 0,84$ para flavonoides totales y $R \cong 0,77$ para antraquinonas totales, lo cual indica que al aumentar el contenido de CBD total, aumenta el contenido de otros fitoconstituyentes.

Como se ha referenciado anteriormente, es posible que se presenten interacciones antagonistas o sinérgicas entre los compuestos cuantificados que pueden afectar la actividad. Al evaluar los datos obtenidos se observó que la actividad captadora de radicales, ABTS, se relaciona de forma directamente proporcional con el cannabinoide CBDA, $R=0,60$. De igual forma fenoles, flavonoides y antraquinonas, con valores de $R=0,94$, $R=0,53$ y $R=0,61$; respectivamente. La información sugiere que el 94% de la actividad del extracto resulta del contenido de fenoles. El ensayo DPPH mostró una relación inversamente proporcional con el contenido de los cannabinoides (CBD y CBDA), al aumentar la concentración de estos cannabinoides disminuye el IC_{50} de la prueba, lo que indica que aumenta la capacidad antioxidante de los extractos, los resultados sugieren que entre un 56 y 62 % de la actividad evaluada para los extractos de *Cannabis* resulta del contenido de estos cannabinoides. Lo mismo ocurre con otros fitoconstituyentes: α -bisabolol, fenoles totales, flavonoides y antraquinonas totales. Los valores se pueden observar en la tabla 22.

La concentración de CBD es inversamente proporcional al IC_{50} de la línea de cáncer de mama MCF-7 ($R = -0.75$, $p < 0.05$), por lo que un aumento en la concentración de este compuesto disminuye la concentración inhibitoria media en la línea MCF-7, aumentando la citotoxicidad, el mismo comportamiento se presenta para la concentración de CBDA ($R = -0,83$, $p < 0.05$) y THCA ($R = -0,77$, $p < 0.05$), fenoles totales ($R = -0,67$, $p < 0.05$), flavonoides totales ($R = -0,75$, $p < 0.05$) y antraquinonas totales ($R = -0,73$, $p < 0.05$). Para la línea HT-29, el aumento en la concentración de fenoles totales disminuye la concentración inhibitoria media ($R = -0,61$, $p < 0.05$). La concentración del Humuleno es

inversamente proporcional al IC₅₀ de la línea de cáncer de próstata PC-3 (R=-0,61, p<0.05), lo cual explicaría que el aumento en la concentración de este terpeno disminuye la concentración inhibitoria media en la línea de cáncer de próstata aumentando la citotoxicidad, lo mismo ocurre con la concentración de fenoles (R=-0,73, p<0.05), flavonoides (R=-0,72, p<0.05) y antraquinonas totales (R=-0,77, p<0.05).

Tabla 22. Correlación de parámetros

CORRELACIÓN	R
Contenido de CBD x Contenido de CBDA	0.96
Contenido de CBD x Contenido de THCA	0.91
Contenido de CBD x Contenido de fenoles	0.70
Contenido de CBD x Contenido de flavonoides	0.81
Contenido de CBD x Contenido de antraquinonas	0.77
Contenido de CBDA x Contenido de THCA	0.95
Contenido de CBDA x Contenido de humuleno	0.61
Contenido de CBDA x Contenido de fenoles	0.68
Contenido de CBDA x Contenido de flavonoides	0.84
Contenido de CBDA x Contenido de antraquinonas	0.75
Contenido de THCA x Contenido de β-mirceno	0.66
Contenido de THCA x Contenido de flavonoides	0.77
Contenido de THCA x Contenido de antraquinonas	-0.62
Actividad captadora radical DPPH x contenido de CBD	0.62
Actividad captadora de ABTS x contenido de CBDA	0.60
Actividad captadora radical DPPH x contenido de CBDA	-0.56
Actividad captadora de ABTS x contenido de D-limoneno	-0.77
Actividad captadora radical DPPH x contenido de D-limoneno	0.65
Actividad captadora radical DPPH x contenido de α-bisabolol	-0.67
Actividad captadora de ABTS x contenido de fenoles	0.94
Actividad captadora radical DPPH x contenido de fenoles	-0.56
Actividad captadora de ABTS x contenido de flavonoides	0.53
Actividad captadora radical DPPH x contenido de flavonoides	-0.66
Actividad captadora de ABTS x contenido de antraquinonas	0.61
Actividad captadora radical DPPH x contenido de antraquinonas	0.61
Concentración inhibitoria media MCF7 x Contenido de CBD	-0.82
Concentración inhibitoria media MCF7 x Contenido de CBDA	-0.76
Concentración inhibitoria media MCF7 x Contenido de THCA	-0.62
Concentración inhibitoria media HT29 x Contenido de CBD	-0.73
Concentración inhibitoria media HT29 x Contenido de CBDA	-0.73
Concentración inhibitoria media HT29 x Contenido de THCA	-0.64
Concentración inhibitoria media PC3 x Contenido de CBD	-0.75
Concentración inhibitoria media PC3 x Contenido de CBDA	-0.79
IC ₅₀ de la línea MCF-7 x Contenido de CBD	-0.75
IC ₅₀ de la línea MCF-7 x Contenido de CBDA	-0.83
IC ₅₀ de la línea MCF-7 x Contenido de THCA	-0.77
IC ₅₀ de la línea MCF-7 x Contenido de Fenoles	-0.67
IC ₅₀ de la línea MCF-7 x Contenido de flavonoides	-0.85
IC ₅₀ de la línea MCF-7 x Contenido de antraquinonas	-0.73
IC ₅₀ de la línea HT-29 x Contenido de Fenoles	-0.61
IC ₅₀ de la línea PC-3 x Contenido de Humuleno	-0.61
IC ₅₀ de la línea PC-3 x Contenido de Fenoles	-0.73
IC ₅₀ de la línea PC-3 x Contenido de flavonoides	-0.72
IC ₅₀ de la línea PC-3 x Contenido de antraquinonas	-0.77

4.4.5 Comportamiento de extractos de *Cannabis* cultivado en Chile

La estancia en la Universidad Técnica Federico Santa María permitió, adicional al análisis realizado a las cuatro variedades de *Cannabis* del Cauca, realizar una

comparación de extractos de *Cannabis* de Colombia y Chile, esto como parte de un trabajo colaborativo con la empresa Chilena LABSUN (laboratorio sustentable natural), una empresa dedicada a la investigación, desarrollo e innovación entorno a productos que promuevan el bienestar integral mediante procesos sustentables y de alta tecnología.

El trabajo con la empresa LABSUN permitió obtener y analizar 6 extractos de tres variedades de *Cannabis* con diferente relación THC/CBD (1:0, 1:1 y 0:1), variedades cultivadas y extraídas en la empresa por dos métodos diferentes; extracción por fluidos supercríticos y RSO (Rick Simpson Oil) (variedades diferentes a las Colombianas). Los extractos posteriormente se llevaron a los laboratorios de la Universidad Técnica Federico Santa María, donde se realizó la identificación de los cannabinoides principales THC total y CBD total. De igual forma las 6 muestras se procesaron en la Universidad de Valparaíso, donde se cuantificó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y antraquinonas totales, y pruebas de actividad antioxidante; capacidad antioxidante total (TRAP), ensayo de actividad secuestradora del radical (DPPH) y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), y pruebas biológicas de viabilidad celular en líneas celulares humanas de cáncer; una línea de cáncer de mama MCF-7 (Adenocarcinoma humano de glándula mamaria), una línea de cáncer de colon HT-29 (Adenocarcinoma humano colorrectal), y una línea de cáncer de próstata PC-3 (Adenocarcinoma humano de próstata), todos tipos de cáncer de interés nacional e internacional por su elevada incidencia. Además se utilizó una línea celular no tumoral de epitelio de mama, MCF-10A, como control. En la tabla 23 se reportan algunos de los datos obtenidos en el análisis realizado a los extractos Chilenos, no se reporta la información completa por preservar la confidencialidad de la empresa.

Los resultados obtenidos permiten mostrar las diferencias en el contenido de cannabinoides THC y CBD al extraer con dos métodos de extracción diferentes, un método sofisticado (FSC) y un método convencional (RSO), se observa una diferencia muy marcada en los resultados obtenidos con M-3, muestra de *Cannabis* no psicoactivo.

Tabla 23. Contenido de cannabinoides principales en extractos LABSUN.

% DE CANNABINOIDES PRINCIPALES				ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		VALORES IC ₅₀ (µg/mL)			
Extracto	Relación (THC/CBD)	(%) THC total	(%) CBD total	ABTS (TEAC mM)	DPPH TEAC (IC ₅₀ mg/mL)	MCF-10	MCF-7	HT-29	PC-3
M1- FSC CO ₂	(1:0)	67.7	< 0.15	0.56	12.19	61.2	60.2	62.6	64.2
M1- RSO	(1:0)	61.2	3.2	0.75	14.35	70.3	18.0	17.7	21.0
M2 - FSC CO ₂	(1:1)	25.5	35.2	0.71	14.69	30.9	26.7	37.2	43.2
M2 - RSO	(1:1)	25.4	43.9	0.81	12.80	60.4	13.0	18.4	21.9
M3 - FSC CO ₂	(0:1)	2.2	50.8	0.61	18.38	61.8	36.8	47.8	59.9
M3 - RSO	(0:1)	0.65	8.9	0.72	13.28	35.7	15.4	19.6	22.5
Ácido Gálico	N.A.	N.A.	N.A.	1.139 ± 0.014	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
BHT	N.A.	N.A.	N.A.	1.063 ± 0.028	0.061 ± 0.000	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
TROLOX	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.107 ± 0.006	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Los valores representan la media de tres experimentos con tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

Los datos reportados en la tabla 23 y 24, permiten observar que la extracción por fluidos supercríticos no registró datos significativos en la prueba de citotoxicidad, se debe realizar más estudios a partir de estos resultados, ya que actualmente esta técnica es reconocida como la técnica de extracción más completa.

Tabla 24. Índice de selectividad – Variedades LABSUN – Chile

ÍNDICE DE SELECTIVIDAD			
THC/CBD	MCF-7	HT-29	PC-3
1:0 RSO	*4	*4	*3
1:1 RSO	*5	*3	*3
0:1 RSO	*2	*2	*2

A partir de los IC₅₀, se calculó los índices de selectividad para los extractos que mostraron selectividad contra células cancerosas, los cuales se reportan en la tabla 24. Como se puede observar las muestras que fueron extraídas por el método RSO, reportaron valores mayores a 2, de forma significativa los extractos con presencia del cannabinoide THC, registran valores mayores en todas las líneas celulares, siendo el extracto con relación 1:1 el que reporta un valor de SI de 5 para la línea de cáncer de mama.

4.5 Discusión

En el presente capítulo se registran los resultados obtenidos en el análisis citotóxico realizado a los 11 extractos de *Cannabis* no psicoactivo obtenidos a partir de 4 variedades de *Cannabis* diferenciadas morfológicamente que se cultivan en el departamento del Cauca. El estudio permitió observar la influencia en la actividad biológica del cannabinoide ácido CBDA, al igual que el efecto sinérgico que se genera por la presencia de cannabinoides menores y terpenos en los extractos obtenidos, como lo manifiesta Jin, et al., 2021; cada vez hay más pruebas que muestran que el extracto de plantas tiene beneficios adicionales en comparación con los cannabinoides individuales.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, es por ello, que muchos estudios se centran en identificar posibles compuestos que contribuyan a contrarrestar los efectos que esta enfermedad causa (Leiva, et al., 2015, Bosio, et al., 2015, Taborga, et al., 2016). Desde 1975 se demostró el efecto anticancerígeno de los cannabinoides en el carcinoma de pulmón de Lewis, posteriormente se analizaron los mecanismos moleculares y se observó que los cannabinoides inhibían el crecimiento de las células tumorales e inducían la apoptosis al modular diferentes vías de señalización celular en gliomas y linfomas, células cancerosas de próstata, mama, pulmón, piel y páncreas (Carracedo, et al., 2006, Gustafsson, et al., 2006, Sarfaraz, et al., 2006, Sarfaraz, et al., 2008, Ramer, et al., 2013, Kargl, et al., 2016, Tomko, et al., 2020). Además de los cannabinoides, los terpenos y los flavonoides también presentan citotoxicidad contra algunos tipos de cáncer (Tomko, et al., 2020). Por todo esto, el efecto citotóxico de los fitoconstituyentes presentes en *Cannabis* se viene estudiando hace años, y cada día se realizan más estudios que demuestran la sinergia de los cannabinoides CBD y THC con cannabinoides menores u otros fitoconstituyentes presentes en *Cannabis*, logrando potencializar los efectos terapéuticos de los extractos de *Cannabis* en comparación con los cannabinoides puros (Berman, et al., 2018, Baram, et al., 2019, Ofir, R.2021). Por lo cual, el estudio de la actividad biológica inicia con ensayos de capacidad antioxidante de los extractos; DPPH, FRAP y TRAP, los resultados permitieron observar que la variedad A, una de las variedades con mayor contenido de fitocompuestos: CBD, CBDA y THCA,

terpenos y fenoles totales, mostró valores significativos en la prueba ABTS, 1.08 mM GAE en el extracto A-1, 0,98 mM GAE en A-2 y 0.76 mM GAE en A-3. Valores muy cercanos a los compuestos antioxidantes puros que se usaron de referencia; (1.13 mM de TEAC para el ácido gálico (GA) y 1.06 mM de TEAC para butilhidroxitolueno (BHT) $p < 0,05$), lo cual indicaría que los componentes presentes en los 3 extractos de la variedad A, actúan como buenos atrapadores de radicales. Los extractos B-1 con un valor de 0.53 mM de TEAC, D-2 con 0.52 mM de TEAC y D-3 con 0.7 mM de TEAC presentaron valores medios en la prueba ABTS como se puede observar en la tabla 19. El perfil químico de los extractos de la variedad B y D, son significativamente diferentes en el contenido de los fitoconstituyentes analizados, la variedad D registra mayor concentración de CBD total, terpenos, fenoles y flavonoides en comparación con la variedad B, en la cual se logró cuantificar el cannabinoide CBG en la extracción rápida (B-1), por ello se sugiere la influencia de este cannabinoide sobre los resultados obtenidos. Dawidowicz, et al., 2021, reportó diagramas que confirman la influencia inhibidora del fragmento no olivetólico en las moléculas de cannabinoides sobre su capacidad para transportar electrones al radical catiónico ABTS, las relaciones fueron inferiores a 1 y disminuyeron en la secuencia CBG, CBD, THC, CBN y cannabinoides ácidos (CBGA, CBDA, THCA), en el mismo estudio, se reportó la baja capacidad del cannabinoide THCA. Ojezele, et al., 2019, reportó extractos metanolicos con presencia de terpenos, flavonoides y otros metabolitos, altamente eficaces contra el radical ABTS ($EC_{50} = 94.83 \mu\text{g/mL}$) de manera comparable con el ácido ascórbico ($EC_{50} = 9.602 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$). (Ojezele, et al., 2019).

En el ensayo DPPH, se observó que los extractos obtenidos por el método soxhlet de las variedades A (29.49 mg/mL), B (35.96 mg/mL) y C (23.06 mg/mL) y los extractos por RSO de las variedades A (33.95 mg/mL) y D (23.06 mg/mL), fueron más activos al compararlos con los otros extractos. La variedad C no registró resultados significativos al evaluar la actividad antioxidante, información consecuente al registrar las menores concentraciones de los fitoconstituyentes (cannabinoides, fenoles totales, flavonoides y antraquinonas totales). Algunos de los resultados obtenidos coinciden con los reportados por otros estudios a plantas de *Cannabis*; Aazza, 2021, realizó un estudio estadístico para

determinar los efectos de diferentes solventes en el contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante de extractos de *Cannabis* con etanol como solvente, se observó un 50% de actividad DPPH (Aazza, 2021). El ensayo FRAP no registró resultados significativos para los extractos analizados (0.38 – 0.49 μ M de TEAC) al ser comparados con los antioxidantes de referencia (1.73 mM de TEAC para AG y 1.53 mM de TEAC para BHT). Otros estudios como el reportado Kubiliene, et al., 2020, quienes examinaron las propiedades antioxidantes de diferentes variedades de *Cannabis sativa* L. por los métodos espectrofotométricos FRAP y CUPRAC, mostraron mayor poder reductor en algunas variedades por el método FRAP (Kubiliene, et al., 2020). Es notorio que la estructura química de los cannabinoides cuantificados en el estudio se relaciona con las propiedades antioxidantes por la presencia de los grupos fenólicos que se oxidan fácilmente a formar quinoides (Caprioglio, et al., 2020).

El análisis estadístico respalda la relación entre la actividad captadora de radicales (ABTS y DPPH) y los fitoconstituyentes presentes en los extractos analizados, se observa de manera general una correlación positiva media, con valores entre 53 y 76 % de la actividad evaluada, con lo cual la actividad antioxidante en los extractos de *Cannabis* resulta principalmente del contenido de los cannabinoides (CBD y CBDA), fenoles y flavonoides. En el caso de los fenoles, se puede observar una relación positiva alta entre ellos y la actividad (ABTS), se sugiere que el 94% de la actividad del extracto resulta del contenido de fenoles.

Los resultados obtenidos en las pruebas de actividad antioxidante se relacionan significativamente con los datos obtenidos en las pruebas de citotoxicidad, donde se observa que ha algunas concentraciones no tóxicas contra células sanas, algunos de los extractos de *Cannabis*, reducen la viabilidad celular de las células cancerosas (ver gráficos 8-1). Los datos obtenidos de viabilidad celular en el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B, presentaron valores significativos a las diferentes concentraciones, especialmente a 50 y 100 μ g/mL, como el registrado en A-3 de 19.50 % para MCF-7. Los valores obtenidos permitieron estimar los IC₅₀ para las cuatro líneas celulares (MCF-10, MCF-7, HT-29 y PC-3) ver tabla 20. Manosroi *et al.* en el 2006, sugieren que valores de

IC₅₀ menores a 125 µg/mL podrían ser posibles candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer. Los resultados de las extracciones por RSO y soxhlet presentaron la mayor actividad citotóxica contra células vivas a la concentración (50 µg/mL), el valor más bajo de IC₅₀ se encuentra en la línea celular MCF-7 (cáncer de mama), en los extractos de la variedad A con valores de 33.2 µg/mL en A-2 y 29.6 µg/mL en A-3, para los extractos de la variedad D, 36.9 µg/mL en D-2 y 32.9 µg/mL en D-3. Con los resultados de IC₅₀ se calculó el índice de selectividad (IS), relacionando los IC₅₀ de la línea control sobre el IC₅₀ de las líneas de células tumorales. Un valor de IS menor a 2 indica que el efecto tóxico de un compuesto es general o poco selectivo, eliminando indiscriminadamente tanto células cancerígenas como normales (Koch *et al.*, 2005; Badisa *et al.*, 2009). Los valores obtenidos de índice de selectividad en células cancerosas de mama se encontraron por encima de 1.5 para los extractos A-2 (>1.5), A-3 (>1.7) y D-3 (>1.5). Estos resultados se pueden explicar ya que como se ha reportado, los extractos de estas variedades presentaron los valores más altos de concentración de los cannabinoides CBD y CBDA, terpenos y fenoles y con ellos, los mejores resultados de actividad antioxidante, lo que indica la incidencia de estos fitoconstituyentes sobre la línea celular de cáncer de mama, información que ha sido corroborada por otros autores; Shrivastava, et al., 2011, demostraron que el CBD induce la muerte celular en líneas de cáncer de mama a 2.5 µmol/L el CBD afecta un mayor porcentaje de células cancerosas que de células sanas. Berman et al., 2018, evaluaron extractos de cinco cepas con concentraciones similares de CBD que registraron diferentes propiedades anticonvulsivas en ratones. Takeda et al., 2012, revelaron que el cannabinoide CBDA inhibe la migración de las células de cáncer de mama, a través de un mecanismo que implica la inhibición de la proteína quinasa A dependiente de cAMP, junto con una activación de la GTPasa, RhoA. E. Otros estudios de *Cannabis*, como el realizado por Petroceli y colaboradores en el 2010, en el cual evaluaron las actividades de los extractos de cannabinoides y muestran el efecto anticancerígeno especialmente de los cannabinoides CBD, CBG y THCA, cannabinoides presentes en los extractos analizados. McAllister, et al., 2007, concluyeron que debido a que el CBD inhibe la expresión de Id-1 en células de cáncer de mama agresivas, podría utilizarse como una estrategia racional de diseño de fármaco para crear potencialmente análogos más potente y eficaces (McAllister, et al., 2007). Shrivastava,

et al., 2011, Elbaz, et al., 2015, Garcia-Morales, et al., 2020; han mostrado que el tratamiento con CBD logró reducir la proliferación y la invasión de células de cáncer de mama. Murase, et al., 2014, informó que el tratamiento con CBD redujo la metástasis del cáncer de mama en etapa avanzada a través de la regulación negativa del inhibidor de la proteína de unión al ADN1 (Murase, et al., 2014.). Fraguas-Sánchez, et al., 2020, descubrieron que la administración conjunta de soluciones de CBD y CBD encapsulado con agentes quimioterapéuticos como paclitaxel o doxorubicina tenía efectos sinérgicos sobre la actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama (Fraguas-Sánchez, et al., 2020).

El extracto B-1 (extracción rápida), presentó un porcentaje de viabilidad celular de 27% de células vivas en la concentración (100 µg/mL) con un IC₅₀ de 53,7 µg/mL en línea celular de mama (MCF-7) y en la línea celular HT-29 (cáncer de colon) se observó un 46% de células vivas a la misma concentración, con un IC₅₀ de 52,7 µg/mL, en las dos líneas se calculó un IS \cong 3, datos muy representativos que respaldan las teorías alrededor de la potencia de cannabinoides menores, específicamente el cannabinoide CBG, el cual solamente se cuantificó en este extracto de *Cannabis*, observándose que potencializa la actividad biológica. Borrelli, et al., 2013, concluyó en su estudio el efecto del CBG al atenuar la colitis murina, reducir la producción de óxido nítrico en los macrófagos y reducir la formación de ROS (especies reactivas orgánicas) en las células epiteliales intestinales, proponiéndose para estudios en pacientes con la enfermedad inflamatoria intestinal; en el 2014, demostró que el CBG inhibió el crecimiento de tumores de xenoinjerto y la carcinogénesis de colon inducida químicamente en un modelo murino, concluyendo que el CBG debe considerarse en la prevención y cura del cáncer colorrectal. Otros autores han reportado el potencial anticancerígeno del cannabigerol en células de melanoma de piel de ratón y células de carcinoma epitelioide oral (Baek, et al., 1996, Beak, et al., 1998) y propiedades anticancerígenas contra cáncer de mama (Zagozen, et al., 2021). Gugliandolo, et al., 2018, reportó al CBG como un potencial tratamiento para la neuroinflamación y el estrés oxidativo, observaron que el tratamiento con CBG inhibió la apoptosis, lo cual se observó con la reducción de la activación de la caspasa 3 y la expresión de Bax. La reducción de la inflamación se demostró por la reducción de los

niveles de proteína IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y PPAR γ evaluados por inmunocitoquímica (Gugliandolo, et al., 2018). Ligresti, et al., 2006, reportó el potencial de extractos de *Cannabis* ricos en cannabidiol con resultados positivos en líneas de células tumorales, en el también se destaca el potencial de los cannabinoides cannabícromeno y cannabigerol. Kovalchuk diez años después resume la actividad de los grupos de cannabinoides en diferentes tipos de cáncer. En el mismo año, Tomko y colaboradores, realiza una revisión que explora los efectos anticancerígenos de los cannabinoides, terpenos y flavonoides presentes en las plantas de *Cannabis*. Finalmente; el extracto C-1 presentó un IC₅₀ de 61,3 $\mu\text{g/mL}$ en la línea de cáncer de colon (HT-29) con un índice de selectividad superior a 2, teniendo en cuenta que la variedad C, presentó los valores más bajos de cannabinoides, fenoles y flavonoides, pero registró una importante concentración de terpenos, especialmente; el monoterpeno; D-limoneno y los sesquiterpenos; β -cariofileno, guaiol, α -humuleno y α -bisabolol, se puede asumir el efecto sinérgico que potencializa la actividad de los cannabinoides (CBD y CBDA) en el extracto, autores como Chung, et al., 2019 y Arul, et al., 2020 han reportado la actividad citotóxica del β -cariofileno, en líneas celulares de cáncer de pulmón y cáncer de ovario. En cáncer de mama, Hanušová, et al., 2017, reportó que el β -cariofileno potenció la citotoxicidad de doxorrubicina. El estudio presentado por Legault, et al., 2007, mostró que el humuleno fue sinérgico con el β -cariofileno, donde inhibieron el crecimiento celular en aproximadamente un 40% más que cuando los compuestos actuaron puros. Namdar et al. 2019, presentaron un claro ejemplo del efecto sequito en la actividad citotóxica, demostrando que terpenos presentes en cantidades relativamente pequeñas en extractos de *Cannabis* y que no poseen ningún efecto terapéutico por si mismos, en sus correlaciones se suman a la citotoxicidad del fitocannabinoide dominante (Namdar et al. 2019). Ambroz, et al., 2019, demostró que el humuleno y otros terpenos como el β -cariofileno, mejoran el efecto antiproliferativo del 5-fluorouracilo y el oxaliplatino en líneas celulares de cáncer de colon. Otros autores han reportado los efectos citotóxicos de los terpenos al actuar puros o combinados con otros terpenos (Elegbede, et al., 1986, Srivastava, et al., 2007, Wu, et al., 2018, Wang, et al., 2018).

Los resultados obtenidos en la línea celular de cáncer de colon (B-1 y C-1), refiere los efectos sinérgicos entre los cannabinoides principales, los cannabinoides menores y otros fitoconstituyentes; terpenos, fenoles, flavonoides y antraquinonas, mostrando la importancia de conocer el perfil químico de las variedades de *Cannabis* y con ello, proyectar la aplicación fitoterapéutica, lo confirman autores como Ramirez, et al., 2019 y Berman, et al., 2018, quienes demostraron que los cannabinoides menores (<1 % por peso seco) (Perez, et al., 2022) contribuyen significativamente a potencializar los efectos terapéuticos de los extractos de *Cannabis* en comparación con los cannabinoides puros. En la línea de células cancerosas de próstata PC-3, no se observó resultados significativos, la aparente falta de actividad en esta línea celular se puede deber al no detectable contenido del cannabinoide THC en los extractos, en otros estudios como el reportado por De petrocellis y colaboradores en el 2013, respaldan las pruebas clínicas del CBD y THC contra el carcinoma de próstata, determinando que el tratamiento con THC puede reducir la viabilidad celular. Ligresti, et al., 2006 concluyó que la IC₅₀ de THC en células de cáncer de próstata DU-145 fue mayor que la concentración más alta probada (25 µM). Ruiz, et al., 1999, encontró que el THC inducía la apoptosis de una manera dependiente de la dosis e independiente del receptor de cannabinoides en las células de cáncer de próstata.

Los resultados obtenidos a los extractos de *Cannabis* realizados en Chile donde se cuantificaron los cannabinoides CBD total y THC total, no permite realizar una comparación exhaustiva con los resultados de las variedades de *Cannabis* de Colombia, aunque de manera superficial se observó los resultados del extracto M3 por RSO relación 0:1 (THC/CBD), el cual presentó un IS=2 para las líneas de cáncer de mama y colon, y los resultados del IS de las variedades de *Cannabis* no psicoactivas de Colombia (tabla 20), en las cuales se reportó un IS=3 para las mismas líneas celulares, en el caso del extracto B-1. Resulta importante continuar con los estudios de estas variedades de *Cannabis* y lograr determinar la concentración de otros fitoconstituyentes en las muestras Chilenas; cannabinoides menores y terpenos, evaluando la sinergia de los fitoconstituyentes en variedades psicoactivas y no-psicoactivas de *Cannabis*, buscando una comparación más cercana entre las variedades Chile-Colombia. El extracto con

relación 1:1 THC/CBD reportó un IS=5, en él se evidencia que la presencia del cannabinoide THC, permite obtener mejores resultados de citotoxicidad en las tres líneas celulares; mama, colon y próstata, al compararse con extractos no psicoactivos. El no contar con el análisis de cannabinoides menores y terpenos que se puedan encontrar en los extractos, dificulta entender con claridad los resultados. Jin, et al., 2021, encontró que el perfil de terpenos varía según la relación THC:CBD en la planta. Estudios realizados por diferentes autores permiten referenciar los resultados positivos que se obtiene al evaluar la citotoxicidad a extractos con presencia del cannabinoide THC. Baram, et al., 2019, reportó resultados donde el extracto de *Cannabis* fue más efectivo para inducir la muerte de células cancerosas que aplicar THC puro, ellos evaluaron extractos de *Cannabis* con concentraciones de THC similares y observaron que se presentan efectos significativamente diferentes en la viabilidad de células cancerosas, concluyendo que extractos de *Cannabis* específicos afectan de manera selectiva y diferencial a diferentes líneas de cáncer (Baram, et al., 2019,). De la Osa et al., 2013; reportó que el THC logró inhibir la proliferación celular de múltiples tipos de cáncer. Ligresti, et al., 2006; reporta células de cáncer colorrectal donde el THC tenía un IC₅₀ de 17 µM y en las células de cáncer de mama IC₅₀ de 14 µM. Es importante mencionar que se deben continuar con los estudios alrededor de conocer el mecanismo de acción de los extractos de *Cannabis* analizados y que sus resultados han demostrado ser prometedores por la actividad biológica que se observó.

4.6 Conclusiones

- Los resultados obtenidos en las pruebas de actividad antioxidante (ABTS y DPPH), permitieron observar valores significativos en los extractos soxhlet y RSO de los genotipos A y D, cercanos a los compuestos antioxidantes puros que se usaron de referencia. Parece evidente la influencia que el contenido de CBD total, terpenos y fenoles totales sobre los resultados de actividad antioxidante.
- En el ensayo DPPH se observó que el extracto B-1 registró un valor significativo, aunque dicho extracto no registró alto contenido de CBD total y terpenos, este extracto reportó la presencia del cannabinoide menor CBG. Este resultado indicaría el efecto de los cannabinoides menores sobre la actividad biológica.
- Los extractos de *Cannabis* A-2, A-3 y D-3, que registraron el mayor contenido de cannabinoides, terpenos y fenoles totales, mostraron que, a concentraciones no tóxicas contra células no tumorales, reducen la viabilidad celular de las células cancerosas de mama (MCF-7), obteniendo para estos resultados índices de selectividad ≥ 2 , siendo importante realizar otros estudios adicionales para corroborar la actividad promisorio de estas tres variedades.
- Los extractos de las variedades B-1 y C-1 mostraron efecto significativo en reducir la viabilidad celular de células de cáncer de colon (HT-29), a pesar de que en ellos se reportaron concentraciones menores de cannabinoides, terpenos y fenoles en comparación con los extractos A y D. El índice de selectividad para el extracto B-1 fue aproximadamente 3 y para el extracto C-1, superior a 2. La presencia del cannabinoide CBG y la composición de terpenos parecería fundamental para dicho efecto.
- En ninguna de las variedades analizadas del Departamento del Cauca se observó resultados significativos sobre la línea de células cancerosas de próstata (PC-3), la aparente falta de actividad en esta línea celular se puede deber al bajo o no detectable

contenido del cannabinoide THC en los extractos, de acuerdo con los resultados obtenidos en los extractos de muestras de *Cannabis* chilenas, donde se evidencia que la presencia del THC influiría sobre la citotoxicidad de los extractos en las tres líneas celulares; mama, colon y próstata. Destacando que en el extracto con relación 1:1 (THC/CBD) presentó un índice de selectividad en cáncer de mama de 5.

- Aunque los resultados obtenidos respaldan las hipótesis que la sinergia de los metabolitos presentes en las variedades de *Cannabis* puede resultar un complemento eficaz para el tratamiento de cáncer de mama y colon, se requiere continuar y profundizar en los estudios realizados, proyectar estudios clínicos y preclínicos de la eficacia de las variedades promisorias contra diferentes líneas de cáncer.
- *Cannabis* es una planta a la cual se le atribuyen importantes propiedades medicinales, esto gracias al interesante espectro de fitoconstituyente que se ha encontrado en las diferentes cepas. Al analizar algunas variedades de *Cannabis* que se están cultivando en el departamento del Cauca, se ha logrado un acercamiento importante a la composición química de estas, llevando el estudio a conocer aspectos de la actividad biológica y la influencia del proceso de extracción, con ello proyectar posibles aplicaciones.

4.7 Bibliografia

Aazza, S. (2021). Application of multivariate optimization for phenolic compounds and antioxidants extraction from Moroccan *Cannabis sativa* Waste. *Journal of Chemistry*, 2021.

Ambrož, M., Šmatová, M., Šadibolová, M., Pospíšilová, E., Hadravská, P., Kašparová, M., & Skálová, L. (2019). Sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. *Acta Pharmaceutica*, 69(1), 121-128.

Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*, 7, 19.

André, A., Leupin, M., Kneubühl, M., Pedan, V., & Chetschik, I. (2020). Evolution of the polyphenol and terpene content, antioxidant activity and plant morphology of eight different fiber-type cultivars of *Cannabis sativa* L. cultivated at three sowing densities. *Plants*, 9(12), 1740.

Anwar, F., Latif, S., & Ashraf, M. (2006). Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 323-329.

Arul, S., Rajagopalan, H., Ravi, J., & Dayalan, H. (2020). Beta-caryophyllene suppresses ovarian cancer proliferation by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 20(13), 1530-1537.

Badisa R, Darling-Reed S, Joseph P, Cooperwood J, Latinwo L, Goodman C. 2009. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Res.* 29(8): 2993–2996.

Baek, S. H., Du Han, S., Yook, C. N., Kim, Y. C., & Kwak, J. S. (1996). Synthesis and antitumor activity of cannabigerol. *Archives of Pharmacal Research*, 19(3), 228-230.

Baek, S., Kim, Y. O., Kwag, J. S., Choi, K. E., Jung, W. Y., & Han, D. S. (1998). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Archives of Pharmacal.*

Baram, L., Peled, E., Berman, P., Yellin, B., Besser, E., Benami, M., & Meiri, D. (2019). The heterogeneity and complexity of *Cannabis* extracts as antitumor agents. *Oncotarget*, *10*(41), 4091.

Berman, P., Futoran, K., Lewitus, G. M., Mukha, D., Benami, M., Shlomi, T., & Meiri, D. (2018). A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis*. *Scientific reports*, *8*(1), 1-15.

Borges, R. S., Batista, J., Viana, R. B., Baetas, A. C., Orestes, E., Andrade, M. A., & Da Silva, A. B. (2013). Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. *Molecules*, *18*(10), 12663-12674.

Bow, E. W., & Rimoldi, J. M. (2016). The structure–function relationships of classical cannabinoids: CB1/CB2 modulation. *Perspectives in medicinal chemistry*, *8*, PMC-S32171.

Bosio, C., Tomasoni, G., Martínez, R., Olea, A. F., Carrasco, H., & Villena, J. (2015). Cytotoxic and apoptotic effects of leptocarpin, a plant-derived sesquiterpene lactone, on human cancer cell lines. *Chemico-biological interactions*, *242*, 415-421.

Blake, A., Wan, B. A., Malek, L., DeAngelis, C., Diaz, P., Lao, N., & O’Hearn, S. (2017). A selective review of medical *Cannabis* in cancer pain management. *Ann Palliat Med*, *6*(Suppl 2), S215-S222.

Borrelli, F., Fasolino, I., Romano, B., Capasso, R., Maiello, F., Coppola, D., & Izzo, A. A. (2013). Beneficial effect of the non-psychoactive plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochemical pharmacology*, *85*(9), 1306-1316.

Borrelli, F., Pagano, E., Romano, B., Panzera, S., Maiello, F., Coppola, D., & Izzo, A. A. (2014). Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a *Cannabis*-derived non-psychoactive cannabinoid. *Carcinogenesis*, *35*(12), 2787-2797.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Brierley, D. I., Samuels, J., Duncan, M., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2016). Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*, *233*(19), 3603-3613.

Byars, T., Theisen, E., & Bolton, D. L. (2019, June). Using *Cannabis* to treat cancer-related pain. In *Seminars in oncology nursing* (Vol. 35, No. 3, pp. 300-309). WB Saunders.

Caprioglio, D., Mattoteia, D., Pollastro, F., Negri, R., Lopatriello, A., Chianese, G., & Appendino, G. (2020). The oxidation of phytocannabinoids to cannabinoquinoids. *Journal of natural products*, 83(5), 1711-1715.

Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., Blázquez, C., García, S., Giroux, V., & Velasco, G. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer cell*, 9(4), 301-312.

Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M. A., Walker, L. A., & Potter, D. (2017). *Cannabis* cultivation: methodological issues for obtaining medical-grade product. *Epilepsy & Behavior*, 70, 302-312.

Chung, K. S., Hong, J. Y., Lee, J. H., Lee, H. J., Park, J. Y., Choi, J. H., & Lee, K. T. (2019). β -caryophyllene in the essential oil from *chrysanthemum boreale* induces G1 phase cell cycle arrest in human lung cancer cells. *Molecules*, 24(20), 3754.

Cobo Urvina, C. P. (2016). *Determinación de la actividad antioxidante en polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal in vitro en proteínas de hoja de Ilex Guayusa* (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.).

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

Dariš, B., Verboten, M. T., Knez, Ž., & Ferk, P. (2019). Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 19(1), 14.

Dawidowicz, A. L., Olszowy-Tomczyk, M., & Typek, R. (2021). CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia*, 152, 104915

de la Ossa, D. H. P., Gil-Alegre, M. E., Ligresti, A., Aberturas, M. D. R., Molpeceres, J., Torres, A. I., & Di Marzo, V. (2013). Preparation and characterization of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-loaded biodegradable polymeric microparticles and their antitumoral efficacy on cancer cell lines. *Journal of drug targeting*, 21(8), 710-718.

De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2010). Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5(1), 103-121.

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Schiano Moriello, A., Iappelli, M., Verde, R., Stott, C. G., & Di Marzo, V. (2013). Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), 79-102.

Drinić, Z., Vidović, S., Vladić, J., Koren, A., Kiproviski, B., & Sikora, V. (2018). Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of *Cannabis sativa* L. *Lekovite sirovine*, (38), 17-21.

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.

Elbaz, M., Nasser, M. W., Ravi, J., Wani, N. A., Ahirwar, D. K., Zhao, H., & Ganju, R. K. (2015). Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: Novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. *Molecular oncology*, 9(4), 906-919.

Elegbede, J. A., Elson, C. E., Tanner, M. A., Qureshi, A., & Gould, M. N. (1986). Regression of rat primary mammary tumors following dietary D-limonene. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(2), 323-325.

Escobar, L., & Aristizábal, F. A. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173-180.

Evans, S., Dizeyi, N., Abrahamsson, P. A., & Persson, J. (2009). The effect of a novel botanical agent TBS-101 on invasive prostate cancer in animal models. *Anticancer research*, 29(10), 3917-3924.

Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., & Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7), 1935.

Fraguas-Sánchez, A. I., Fernández-Carballido, A., Simancas-Herbada, R., Martín-Sabroso, C., & Torres-Suárez, A. I. (2020). CBD loaded microparticles as a potential formulation to improve paclitaxel and doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer. *International journal of pharmaceutics*, 574, 118916.

García-Morales, L., Castillo, A. M., Tapia Ramírez, J., Zamudio-Meza, H., Domínguez-Robles, M. D. C., & Meza, I. (2020). CBD reverts the mesenchymal invasive phenotype of breast cancer cells induced by the inflammatory cytokine IL-1 β . *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2429.

Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104

Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*, 1(1), 10-14.

Gugliandolo, A., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). *In vitro* model of neuroinflammation: Efficacy of cannabigerol, a non-psychoactive cannabinoid. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1992.

Gustavo, I. C., & Alibe, P. V. (2019). Del *Cannabis* a los cannabinoides una perspectiva médico-científica From *Cannabis* to cannabinoids a medical-scientific perspective. *Rev Med UAS; Vol*, 9(2).

Gustafsson, K., Christensson, B., Sander, B., & Flygare, J. (2006). Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R (+)-methanandamide and Win55, 212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Molecular pharmacology*, 70(5), 1612-1620.

Hanušová, V., Caltová, K., Svobodová, H., Ambrož, M., Skarka, A., Murínová, N., & Skálová, L. (2017). The effects of β -caryophyllene oxide and Trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 828-836.

Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. (2016). *Cannabis*: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to *Cannabis* classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 202-215.

Jeong, S., Yun, H. K., Jeong, Y. A., Jo, M. J., Kang, S. H., Kim, J. L., & Lee, D. H. (2019). Cannabidiol-induced apoptosis is mediated by activation of Noxa in human colorectal cancer cells. *Cancer letters*, *447*, 12-23.

Kargl, J., Andersen, L., Hasenöhrl, C., Feuersinger, D., Stančić, A., Fauland, A., & Schicho, R. (2016). GPR55 promotes migration and adhesion of colon cancer cells indicating a role in metastasis. *British journal of pharmacology*, *173*(1), 142-154.

Koch A, Tamez P, Pezzuto J, Soejarto D. 2005. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 95-99.

Kosgodage, U. S., Mould, R., Henley, A. B., Nunn, A. V., Guy, G. W., Thomas, E. L., & Lange, S. (2018). Cannabidiol (CBD) is a novel inhibitor for exosome and microvesicle (EMV) release in cancer. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 889.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, *25*, 726-732.

Larsen, C., & Shahinas, J. (2020). Dosage, efficacy and safety of cannabidiol administration in adults: a systematic review of human trials. *Journal of clinical medicine research*, *12*(3), 129.

Leiva, B., Carrasco, I., Montenegro, I., Gaete, L., Lemus, I., Tchernitchin, A., & Villena, J. (2015). Equol and daidzein decrease migration, invasion and matrix metalloproteinase (MMPs) gene expression in prostate cancer cell lines, DU-145 and PC-3. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *14*(3), 251-262.

Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(12), 1643-1647.

Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(3), 1375-1387.

Manosroi, J., Dhumtanom, P., & Manosroi, A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer letters*, 235(1), 114-120.

McAllister, S. D., Christian, R. T., Horowitz, M. P., Garcia, A., & Desprez, P. Y. (2007). Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 6(11), 2921-2927.

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., & Hanuš, L. O. (2007). Cannabidiol—recent advances. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1678-1692.

Melck, D., De Petrocellis, L., Orlando, P., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., & Di Marzo, V. (2000). Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology*, 141(1), 118-126.

Meng, H., Dai, T., Hanlon, J. G., Downar, J., Alibhai, S. M., & Clarke, H. (2020). *Cannabis* and cannabinoids in cancer pain management. *Current opinion in supportive and palliative care*, 14(2), 87-93.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D. & Boyd, M. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766.

Montenegro, I., Moreira, J., Ramírez, I., Dorta, F., Sánchez, E., Alfaro, J. F., & Seeger, M. (2021). Chemical Composition, Antioxidant and Anticancer Activities of *Leptocarpha rivularis* DC Flower Extracts. *Molecules*, 26(1), 67.

Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. *Phytocannabinoids*, 103-131.

Muñoz, P. B., Fonseca, L. R., Robles, J., Fiorentino, S., Hernández, J., Orduz-Díaz, L. L., & Ospina, L. M. P. (2016). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y

fracciones de las especies *Conyza trihecatactis* y *Ageratina vacciniaefolia*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 212-227.

Murase, R., Kawamura, R., Singer, E., Pakdel, A., Sarma, P., Judkins, J., & McAllister, S. D. (2014). Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. *British journal of pharmacology*, 171(19), 4464-4477.

Muscarà, C., Smeriglio, A., Trombetta, D., Mandalari, G., La Camera, E., Occhiuto, C., & Circosta, C. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity of two standardized extracts from a new Chinese accession of non-psychoactive *Cannabis sativa* L. *Phytotherapy Research*, 35(2), 1099-1112.

Namdar, D., Voet, H., Ajjampura, V., Nadarajan, S., Mayzlish-Gati, E., Mazuz, M., & Koltai, H. (2019). Terpenoids and phytocannabinoids co-produced in *Cannabis sativa* strains show specific interaction for cell cytotoxic activity. *Molecules*, 24(17), 3031.

Ofir, R. (2021). *Cannabis*-derived terpenes and flavonoids as potential pharmaceuticals. *Israel Journal of Plant Sciences*, 1(aop), 1-9.

Ojezele, M. O., Ewhre, L. O., Adeosun, A. M., & Ojezele, O. J. (2019). Phytochemical content of *Cannabis sativa* methanol extract and in vitro antioxidant activities of its solvent fractions. *Journal of Phytomedicine and Therapeutics*, 18(2), 328-337.

Palomino, L. R., García, C. M., ROJANO, B. A., & Diego, L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.

Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *BioMed research international*, 2018.

Pellegrini, M., Palmieri, S., Ricci, A., Serio, A., Paparella, A., & Lo Sterzo, C. (2020). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. cv 'Futura 75' essential oil. *Natural Product Research*, 1-5.

Perez, E., Fernandez, J. R., Fitzgerald, C., Rouzard, K., Tamura, M., & Savile, C. (2022). In Vitro and Clinical Evaluation of Cannabigerol (CBG) Produced via Yeast Biosynthesis: A Cannabinoid with a Broad Range of Anti-Inflammatory and Skin Health-Boosting Properties. *Molecules*, 27(2), 491.

Pertwee, R. G., Ross, R. A., Craib, S. J., & Thomas, A. (2002). (–)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *European journal of pharmacology*, 456(1-3), 99-106.

Pisoschi A, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. 2016. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-36.

Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., & Hinz, B. (2013). COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(1), 69-82.

Ramirez, C. L., Fanovich, M. A., & Churio, M. S. (2019). Cannabinoids: extraction methods, analysis, and physicochemical characterization. *Studies in natural products chemistry*, 61, 143-173

Romay, C., Pascual, C., & Lissi, E. A. (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 29(2), 175-183.

Ruiz, L., Miguel, A., & Díaz-Laviada, I. (1999). Δ^9 -tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS letters*, 458(3), 400-404.

Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). *Cannabis* pharmacology: the usual suspects and a few promising leads. *Advances in pharmacology*, 80, 67-134.

Russo, E. B. (2019). The case for the entourage effect and conventional breeding of clinical *Cannabis*: no “strain,” no gain. *Frontiers in plant science*, 9, 1969.

Sánchez-Suárez, J., Albarracín, D., Rojas, M., Rincón, J., Robledo, S., Muñoz, D. L., & Delgado, G. (2010). Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumense* y *Piper holtonii*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 39(1), 21-29.

Sarfaraz, S., Afaq, F., Adhami, V. M., Malik, A., & Mukhtar, H. (2006). Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(51), 39480-39491.

Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer research*, *68*(2), 339-342.

Steele, G., Arneson, T., & Zylla, D. (2019). A comprehensive review of *Cannabis* in patients with cancer: availability in the USA, general efficacy, and safety. *Current oncology reports*, *21*(1), 10.

Sharafi, G., He, H., & Nikfarjam, M. (2019). Potential use of cannabinoids for the treatment of pancreatic cancer. *Journal of pancreatic cancer*, *5*(1), 1-7.

Srivastava, J. K., & Gupta, S. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(23), 9470-9478.

Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E., & Prasad, A. (2011). Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular cancer therapeutics*, *10*(7), 1161-1172.

Taborga, L., Espinoza, L., Moller, A., Carrasco, H., Cuellar, M., & Villena, J. (2016). Antiproliferative effect and apoptotic activity of linear geranylphenol derivatives from phloroglucinol and orcinol. *Chemico-biological interactions*, *247*, 22-29.

Takeda, S., Okajima, S., Miyoshi, H., Yoshida, K., Okamoto, Y., Okada, T., & Aramaki, H. (2012). Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type *Cannabis*, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicology letters*, *214*(3), 314-319.

Télez Mosquera, J., & de Colombia, O. D. D. (2016). *Marihuana-Cannabis Aspectos Toxicológicos, Clínicos, Sociales y Potenciales Usos Terapéuticos*. Bogotá DC, Colombia.

Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists *in vitro*. *British journal of pharmacology*, *150*(5), 613-623.

Tomko, A. M., Whynot, E. G., Ellis, L. D., & Dupré, D. J. (2020). Anti-cancer potential of cannabinoids, terpenes, and flavonoids present in *Cannabis*. *Cancers*, *12*(7), 1985.

Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). Molecular pharmacology of phytocannabinoids. *Phytocannabinoids*, 61-101.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, *1*(3), 1112-1116.

Wang, H. L., Chang, J. C., Fang, L. W., Hsu, H. F., Lee, L. C., Yang, J. F., & Houg, J. Y. (2018). *Bulnesia sarmientoi* supercritical fluid extract exhibits necroptotic effects and anti-metastatic activity on lung cancer cells. *Molecules*, *23*(12), 3304.

Wu, S., Peng, L., Sang, H., Ping Li, Q., & Cheng, S. (2018). Anticancer effects of α -Bisabolol in human non-small cell lung carcinoma cells are mediated via apoptosis induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and upregulation of P13K/AKT signalling pathway. *Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, *23*(5), 1407-1412.

Zagožen, M., Čerenak, A., & Kreft, S. (2021). Cannabigerol and cannabichromene in *Cannabis sativa* L. *Acta Pharmaceutica*, *71*(3), 355-364.

5. Recomendaciones

Se requiere continuar con los estudios que permitan evaluar variedades de *Cannabis* con presencia del cannabinoide THC, con miras a evaluar los alcances medicinales de la presencia de este cannabinoide. Así como con estudios en busca de conocer las vías apoptóticas, el efecto en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y así proponer el diseño de nuevos fármacos con diferentes vías de administración.

Es importante continuar con estudios alrededor de *Cannabis* que se cultiva en Colombia, esto permite fortalecer la industria de *Cannabis*, beneficiar a los productores para reconocer sus variedades y proyectar el mercado a nivel nacional e internacional.

6. Divulgación

Los resultados de la presente investigación fueron presentados en los siguientes eventos; First Workshop on Natural Products Chemistry and its Applications en Chillan-Chile en noviembre del 2019, XVIII congreso Colombiano de Química, Popayán-Colombia en noviembre del 2019, y en el 34° congreso Latinoamerica de Química en Cartagena de Indias-Colombia CLAQ 2020 en octubre del 2021. (ver Anexo 5).

Así mismo, como parte del trabajo se logró la publicación del artículo; Determination and qualitative comparison of cannabinoids present in commercial natural products of the Cauca Department-Colombia, publicado en la revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. Se encuentra sometido el artículo Strong Medicinal Potencial of Non-Psychoactive *Cannabis* Varieties From North Cauca, Colombia, en la revista Q2 Asian Journal of Organic Chemistry, y nos encontramos por someter el artículo denominado Antioxidant and cytotoxic effect of non-psychoactive *Cannabis* extracts cultivated in the department of Cauca -Colombia, en la revista Journal Heliyon Q1 (A1).

7. Anexos

Anexo 1- 7. 1. Capítulo 2 - Materiales y métodos

7.1.1 Localización

Los cuatro fenotipos de *Cannabis sativa* L. fueron cultivadas en el departamento del Cauca, por la empresa Natura Pharma Cauca SAS Zomac, con sede en el municipio de Santander de Quilichao, en el predio el Porvenir ubicado en el sector Las Playas. Las cuatro variedades corresponden a material vegetal obtenido por diferenciación genética, Los resultados de la prueba de evaluación agronómica (PEA), permitieron el registro de las variedades ante el ICA con código ICA N° PEA 19-0116. Laboratorio grupo Química de Productos Naturales (QPN) Universidad del Cauca.

7.1.2 Materiales

Documento registro de información-pasaporte de ingreso de los caracteres cualitativos y cuantitativos de las variedades de *Cannabis sativa* L., GPS para identificar el lugar de cultivo de las plantas, metro para medición de características cualitativas, análisis estadístico ANOVA - programa XLSTAT. Para la identificación y cuantificación de los cannabinoides presentes en las flores de las variedades de *Cannabis* analizadas se utilizó cromatógrafo líquido Waters 2695, detector dual absorbancia UV/Vis 2487, Columna analítica CORTECS Shield RP18, balanza analítica, equipo de ultrasonido y el software cromatográfico Empower 3 CDS, los analitos utilizados se presentan en la tabla 25.

Tabla 25. Analitos analizados en el material vegetal de *Cannabis*.

Analito	Número CAS
Cannabidiol (CBD)	13956-29-1
Cannabidiol ácido (CBDA)	1244-58-2
Cannabinol (CBN)	521-35-7
Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC)	1972-08-3
Tetrahydrocannabinol ácido (THCA)	23978-85-0
Delta-8-Tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC)	5957-75-5
Cannabigerol (CBG)	25654-31-3

7.1.3 Métodos

La identificación de las variedades de *Cannabis sativa* L, se realizó a partir de la información recolectada durante la prueba de evaluación agronómica (PEA), posteriormente las plantas fueron colectadas, marcadas y llevadas a la Universidad del Cauca, Colombia. Cada una de las variedades contó con su respectivo pasaporte o documento de registro de información el cual incluía 23 de los caracteres morfológicos entre cualitativos y cuantitativos (ver tabla No.4). Se colectó el material vegetal del invernadero de la empresa Natura Pharma Cauca SAS Zomac la cual en adelante será denominada con las siglas NPC, ubicado en el sector Las Playas, el productor cuenta con Registro ICA como productor de semilla seleccionada. El método de mejoramiento aplicado por los nativos en el sitio de colección se asimila a selección clonal por características fenotípicas y reacción en humanos y con previas evaluaciones fenotípicas. La información de descriptores morfológicos de las plantas se recolectó con la compañía del equipo técnicos de NPC, el terreno cuenta con un área de 500 m², se acondicionaron materas en geotextil con sustrato compuesto por tierra, escoria de rocas y abono orgánico (compost), se adiciona una mezcla de agrobiológicos basados en micorrizas y hongos benéficos. Los esquejes fueron enraizados y un mes después llevado a campo para la siembra.

La siembra se realizó en unidades experimentales, estableciendo número de plantas entre unidades experimentales. Para la siembra se utilizaron plántulas, las semillas asexuales fueron tratadas con agentes biológicos que protegen la plántula y estimular el rápido enraizamiento. Se realizó fertilización al sustrato, en el momento del trasplante y a los 30 días de siembra. El riego en forma localizada, con un sistema por goteo, mediante el cual cada planta recibió aproximadamente 1 litro de agua por día, cantidad necesaria para mantener el requerimiento hídrico. La cosecha se realizó según el ciclo biológico de cada variedad en 132 días después de la siembra. Se registró las variables climáticas; los promedios de humedad relativa, precipitación y temperaturas semanales, los datos se tomaron de la estación meteorológica del IDEAM, ubicada en el municipio de Mondomo, Cauca (Ver tabla 26).

Tabla 26. Registro de las condiciones climáticas durante el ciclo de evaluación de la prueba agronómica

SEMANA	PRECIPITACIÓN (mm)	TEMP. MAX. (°C)	TEMP. MED. (°C)	TEMP. MIN. (°C)	HUMD. MAX. (%)	HUMD. MED. (%)	HUMD. MIN. (%)
1	12	25.7	21.1	17.6	96	80	63
2	15	25.5	20.8	17.0	97	82	65
3	17.2	26.8	20.8	15.5	94	82	65
4	24.7	27.3	20.9	17.9	95	82	65
5	29	28.5	21.2	15.9	99	94	91
6	33	25.8	19.5	15.7	99	94	90
7	40.3	27.3	20.7	16.3	99	95	89
8	36.2	26.3	21.2	17.1	99	95	90
9	35	26.9	19.9	16.7	99	95	89
10	30.5	26.6	20.9	15.9	99	90	82
11	30.2	27.3	22.1	15.2	99	89	81
12	28	26.1	20.8	15.0	99	90	81
13	26.3	25.8	18.9	13.6	99	89	81
14	28	24.9	19.9	14.8	98	85	75
15	27.2	27.5	20.2	14.4	96	86	74
16	25	26.2	20.2	14.8	97	85	73
17	26.4	26.4	20.5	15.9	97	86	74
18	26.2	25.2	19.3	16.4	95	88	82
19	23.8	26.9	20.6	17.0	95	88	80

La recolección de los datos se realizó a través de un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa XLSTAT.

7.1.3.1 Método de identificación y cuantificación de cannabinoides en flores de *Cannabis*.

En el laboratorio Empiria Lab. ubicado en la ciudad de RioNegro – Antioquía, se realizó el análisis de las flores de las cuatro variedades de *Cannabis* (A, B, C y D), utilizando el método Health Canadá -ACMPR (antes MMPR) s53 y ACMPR (antes MMPR) s54. En la tabla 27 se describen las condiciones del método.

Tabla 27. Condiciones experimentales HPLC UV/Vis

Equipo	HPLC - Waters 2695
Columna analítica	CORTECS Shield RP18 de 4.6mm x150mm, 2,7 µm.
Flujo analítico	2.0 mL/min
Fase móvil A	Agua con 0,1% TFA
Fase móvil B	Acetonitrilo grado HPLC
Isocratico	41:59 fase móvil A /fase móvil B
Temperatura del horno	35 C
Detector	Dual absorbancia UV/Vis 2487
Longitud de onda detección	228 nm
Volumen de inyección	5 µL
Software	Empower 3 CDS

En la tabla 28, se registran los límites de detección y cuantificación de cada uno de los cannabinoides analizados.

Tabla 28. Determinación de LOD y LOQ para cannabinoides

Analito	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
Cannabidiol (CBD)	0.158	0.527
Cannabidiol ácido (CBDA)	0.178	0.594
Cannabinol (CBN)	0.136	0.454
Delta-9-Tetrahidrocannabinol (Δ9-THC)	0.275	0.915
Tetrahidrocannabinol ácido (THCA)	1.071	3.570
Delta-8-Tetrahidrocannabinol ((Δ8-THC)	0.208	0.693
Cannabigerol (CBG)	0.716	2.386

En el gráfico 12, se puede observar el cromatograma con los estándares de los cannabinoides analizados y sus respectivos tiempos de retención.

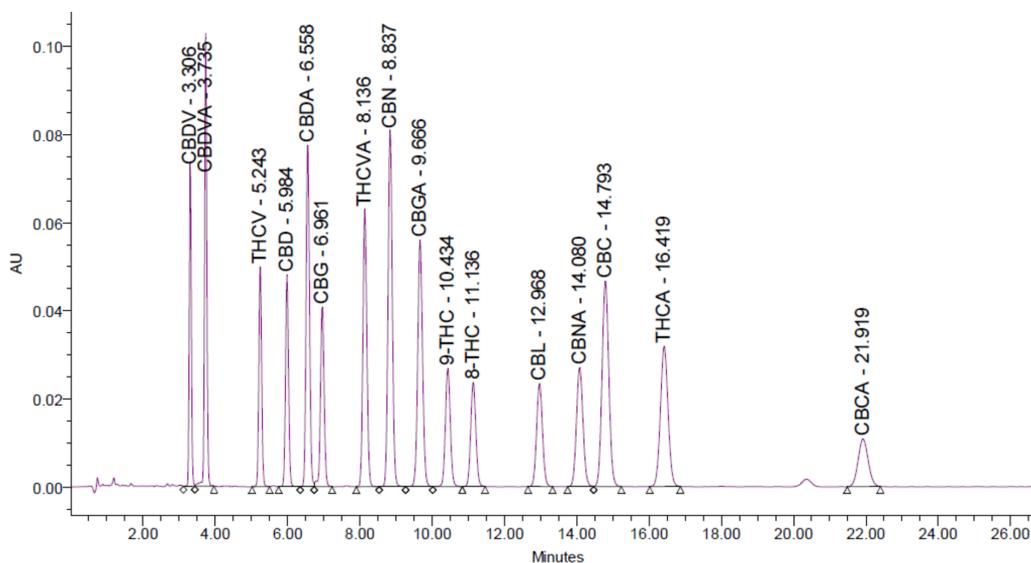


Gráfico 12. Cromatograma con los estándares conteniendo los cannabinoides analizados y sus respectivos tiempos de retención.

7.1.3.1.1 Tratamiento de la muestra

Se pulverizó cada una de las muestras hasta obtener un polvo fino. Se pesó 100 mg de muestra seca y homogénea en un vial tarado de 12 mL y registra el peso. Se añadió 4 mL de MeOH a cada vial, vortex por 1 minuto y se llevó al ultrasonido por 20 minutos. Se filtraron las muestras a través de un filtro PTFE y se guardaron en un vial de 12 mL. Antes del análisis se diluyó el extracto 10x (20 µL de extracto con 250 µL de MeOH), se guardaron en viales de 2 mL y se llevaron al equipo HPLC UV/Vis.

En los gráficos 13 al 16 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al analizar las flores de *Cannabis* (variedades A, B, C y D) por HPLC-UV.

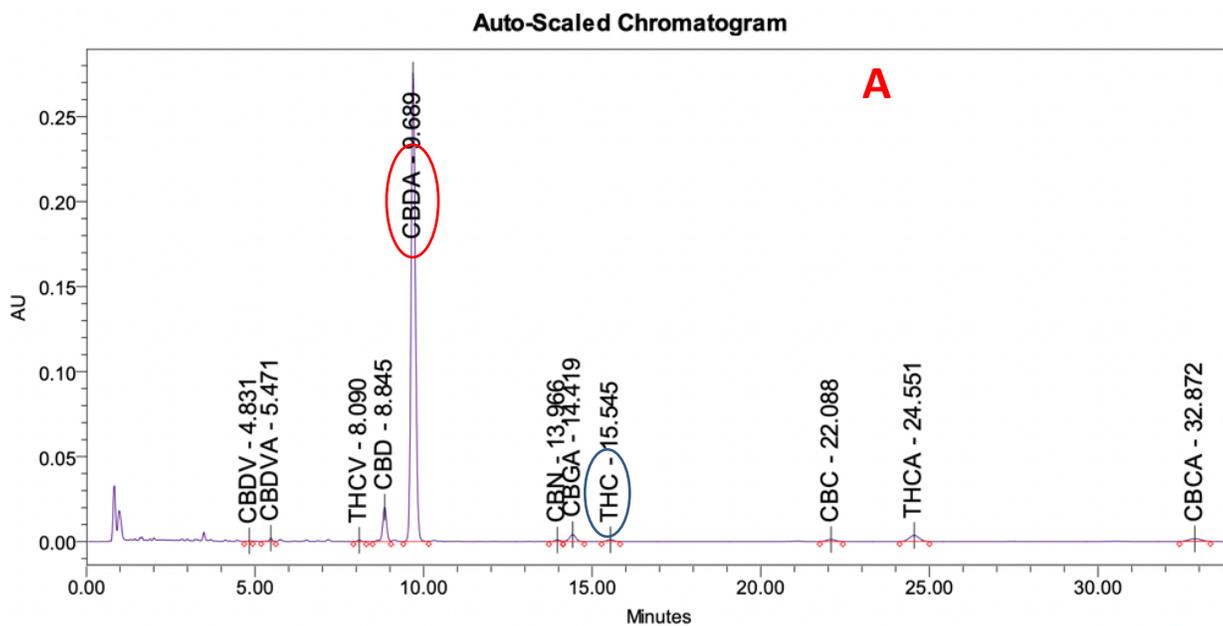


Gráfico 13. Cromatograma Variedad A.

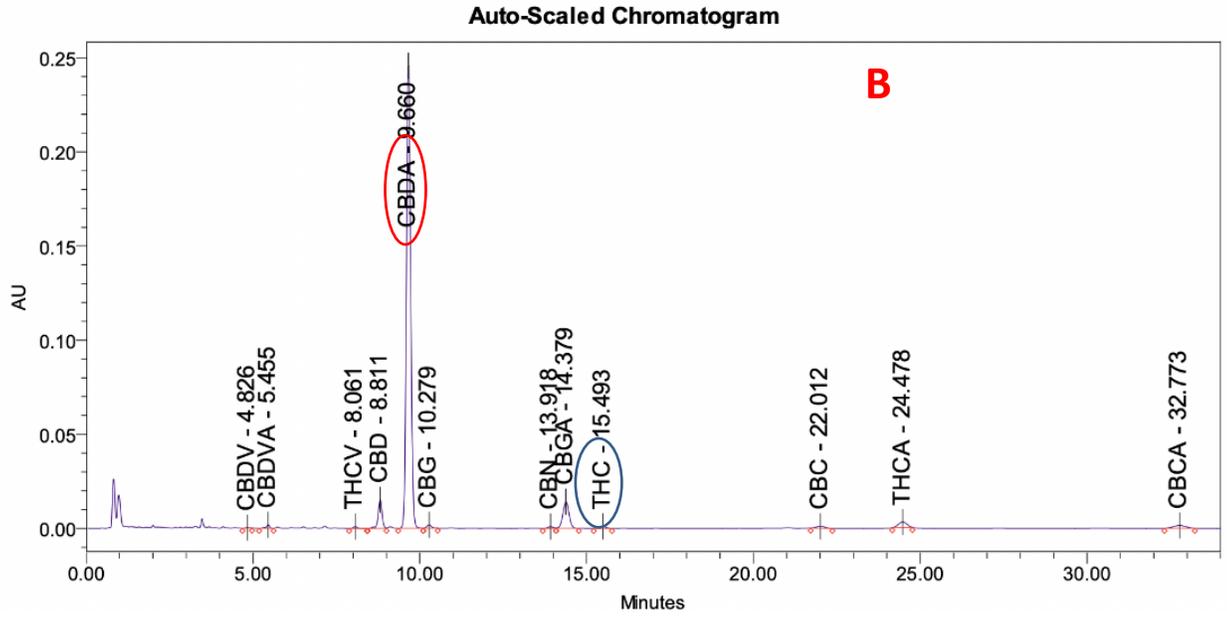


Gráfico 14. Cromatograma *Variedad B*.

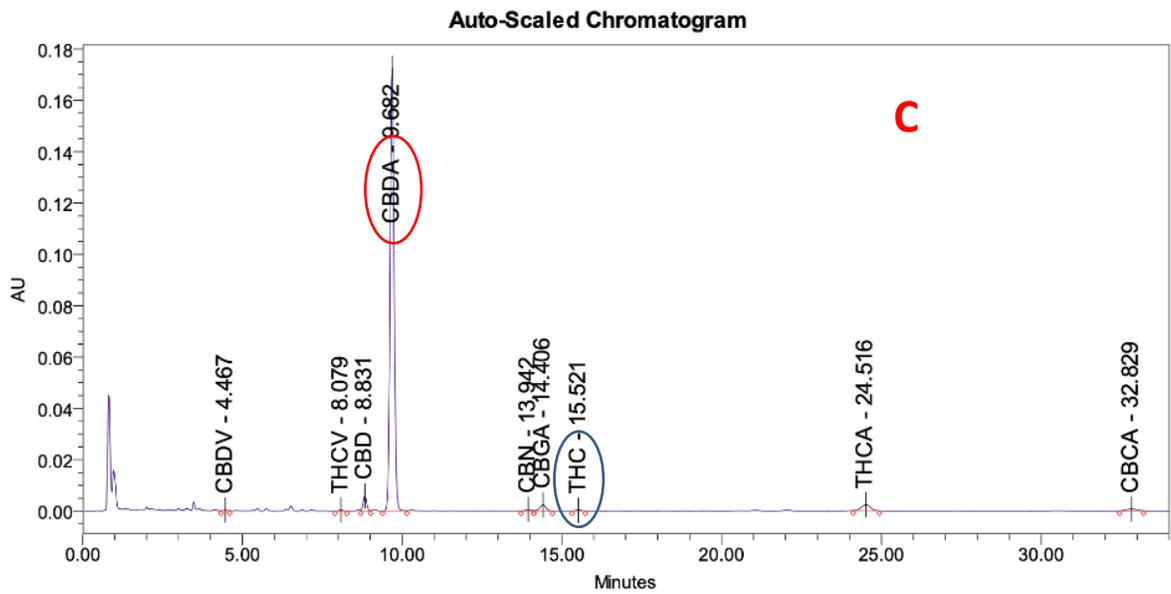


Gráfico 15. Cromatograma *Variedad C*.

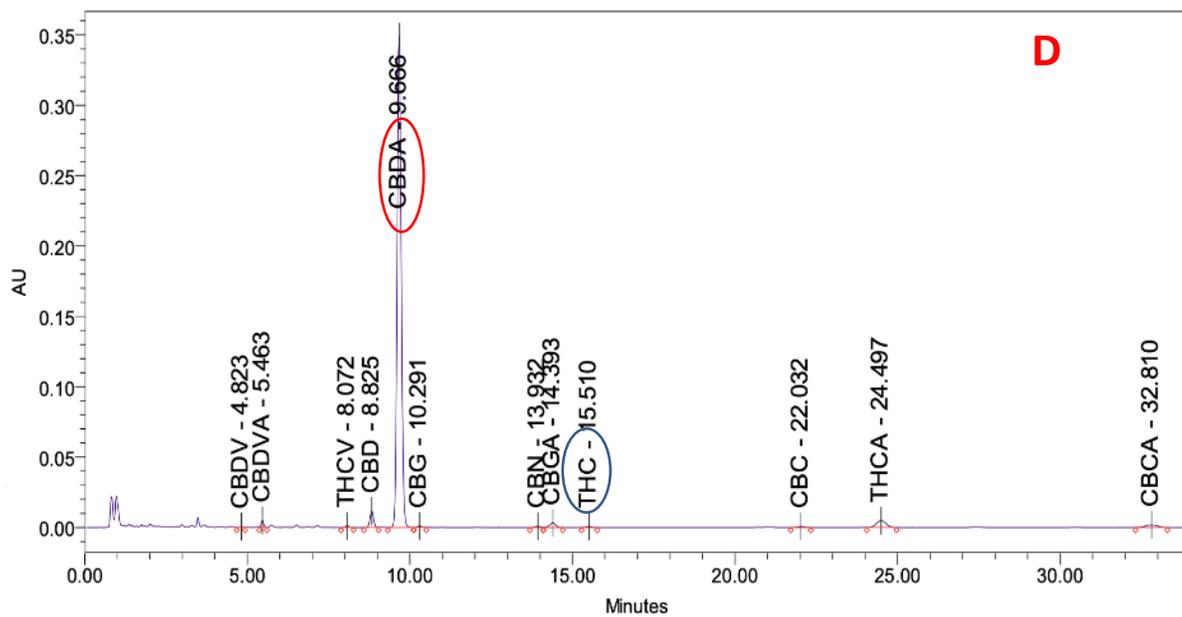


Gráfico 16. Cromatograma Variedad D.

Anexo 2- 7. 2. Capítulo 3 - Materiales y métodos

7.2.1 Localización

El material vegetal de las variedades de *Cannabis sativa L.* analizadas se describen en el capítulo 2, página 56 (ver Tabla 4), material vegetal que se utilizó para realizar las extracciones en el laboratorio del grupo de investigación de Química de Productos Naturales (QPN) del departamento de Química de la Universidad del Cauca en Colombia. Los análisis de cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) se realizaron en el laboratorio del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la facultad de Ciencias Naturales en la Universidad ICESI en Cali. Los análisis de cromatografía de Gases acoplado a masas (CG-EM) se realizó en la Unidad de Análisis Industrial del departamento de química de la Universidad del Cauca. Las pruebas de cuantificación de fitoconstituyentes; fenoles totales, flavonoides totales, y antraquinonas totales se realizaron en el laboratorio de Bioensayos (Estrés oxidativo) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso en Chile.

7.2.2 Reactivos y Materiales

El metanol, etanol absoluto y otros solventes y reactivos utilizados en el análisis por cromatografía de gases son de grado analítico y fueron proporcionados por Merck. Los estándares de los cannabinoides y terpenos se adquirieron por Restek (ver Tabla 29). Reactivo de Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck), Na_2CO_3 , ácido gálico, trolox, quercetina, AlCl_3 (grado analítico, Merck).

Equipo extracción por soxhlet, tubos tipo falcón de 15 mL, balanza analítica, cromatógrafo de gases serie TRACE 1300 acoplado a espectrómetro de masas ISQLT marca Thermo Scientific con automuestreador HTA, equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de arreglo de diodos (UHPLC-DAD) equipado con una columna de fase reversa, equipo de espectrofotometría RAYLEIGH UV-2601. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa Statsoft STATISTICA versión 7.1.

Tabla 29. Analitos analizados en el material vegetal de *Cannabis*.

Analito	Número CAS
Cannabidiol (CBD)	13956-29-1
Cannabidiol ácido (CBDA)	1244-58-2
Cannabinol (CBN)	521-35-7
Delta-9-Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)	1972-08-3
Tetrahidrocannabinol ácido (THCA)	23978-85-0
Delta-8-Tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC)	5957-75-5
Cannabigerol (CBG)	25654-31-3
((-)- α -Bisabolol)	23089-26-1
Canfeno	79-92-5
δ -3-Careno	13466-78-9
β -Cariofileno	87-44-5
Geraniol	106-24-1
Guaiol	489-86-1
α -Humuleno	6753-98-6
p-cimeno	99-87-6
Isopulegol	89-79-2
d-Limoneno	5989-27-5
Linalool	78-70-6
β -Mirceno	123-35-3
Nerolidol	7212-44-4
Ocimeno	13877-91-3
α -Pinenol	80-56-8
(-)- β -Pinenol	18172-67-3
α -Terpineno	99-86-5
γ -Terpineno	99-85-4
Terpinoleno	586-62-9

7.2.3 Métodos

7.2.3.1. Tratamiento de las muestras.

Las cuatro variedades de *Cannabis* (ilustración 19), denominadas muestras A, B, C y D, fueron secadas y molidas para reducir el tamaño de partícula y con ello, mejorar la eficiencia de extracción. El material vegetal fue secado por el productor de la empresa NPC, el proceso consiste en cortar la planta por la parte inferior del tallo, en un cuarto se cuelgan boca abajo por 6 días según se observe que las hojas junto a las inflorescencias estén secas, el tiempo de secado depende de la humedad y la temperatura. La molienda se realizó en el molino de centrifugación ultra ZM 200 de Fisher Scientific de la empresa

PROKPIL ubicada en la ciudad de Cali, posteriormente se tamizó para quedar con un tamaño de partícula de 425 μ m. Las muestras molidas se almacenaron en bolsas selladas a temperatura ambiente hasta su procesamiento.



Ilustración 19. Material vegetal de *Cannabis* no psicoactivo.
Fuente. P. Arango (2021).

7.2.3.2. Métodos de extracción.

El material vegetal (cogollos) de las cuatro variedades de *Cannabis* fueron sometidas a la extracción por tres métodos diferentes, a excepción de la variedad D, para la cual no se realizó extracción rápida. Los métodos de extracción seleccionados corresponden a protocolos establecidos previamente por el grupo de investigación Química de Productos Naturales (QPN) del departamento de Química de la Universidad del Cauca. La extracción rápida es el resultado de la adaptación al método Live Resin, similar al método utilizado actualmente por la industria, la extracción Rick Simpson Story (RSO), método frecuentemente utilizado por productores y el método soxhlet comúnmente utilizado en los laboratorios de productos naturales. Los tipos de extracción se describen a continuación:

7.2.3.2.1 Extracción rápida (Knodt, 2021)

La extracción rápida es una adaptación realizada al método conocido como “Live Resin”, se tomó 0,5 g de cada muestra de *Cannabis* (variedad A, B y C) se mezclaron con 3 mL de EtOH. Tanto el solvente, etanol al 99.5 %, como la muestra se llevaron previamente al congelador (-13 °C) por espacio de 8 horas, para luego ponerlos en contacto por 5 minutos en tubos tipo falcón. Enseguida se filtró la mezcla, separando el

extracto del material vegetal, el cual se depositó en viales ámbar de 3 mL para ser almacenados en nevera a 4 °C hasta el análisis cromatográfico.

7.2.3.2.2 *Extracción RSO (Knodt, 2021).*

Las extracciones de las variedades de *Cannabis* llevadas a cabo por RSO se realizaron en tubos tipo falcón de 15 mL, depositando 1.0 g de muestra vegetal de *Cannabis* (variedad A, B, C y D) y 10 mL de etanol al 99.5 %. Los tubos se dejaron en reposo durante 48 h, en ambiente fresco y oscuro. Los extractos después de filtrados se guardaron en viales ámbar de 3.0 mL y se enfriaron en nevera a 4 °C antes del análisis por UHPLC-DAD y CG-EM.

7.2.3.2.3 *Extracción por Soxhlet (De Castro, et al., 2010).*

La extracción soxhlet se llevó a cabo siguiendo el protocolo planteado por De Castro (De Castro, et al., 2010). Se utilizó 30 gramos de cada variedad de *Cannabis* (variedad A, B, C y D) y etanol al 99.5 % como solvente. Se trabajó en tres procesos (10 g material vegetal) y cada uno con cuatro sifones. Los extractos se guardaron en frascos ámbar y se almacenaron en nevera a 4 °C hasta el análisis cromatográfico por UHPLC-DAD y CG-EM y las pruebas de actividad biológica.

7.2.3.3 Método de identificación y cuantificación de fitoconstituyentes

Los fitoconstituyentes presentes en los extractos de las cuatro variedades de *Cannabis* no psicoactiva estudiadas se identificaron y cuantificaron mediante métodos cromatográficos y espectrofotométricos.

7.2.3.3.1 *Método de identificación y cuantificación cannabinoides. (Vaclavik et al., 2019)*

El análisis de cannabinoides en los extractos obtenidos se llevó a cabo en el laboratorio del departamento de Ciencias Farmacéuticas de la facultad de Ciencias Naturales de la Universidad ICESI, sede Cali. El protocolo de estandarización se estableció según el protocolo propuesto por Vaclavik et al., 2019 (Vaclavik et al., 2019) con modificaciones realizadas durante el desarrollo del proyecto denominado: “Evaluación de la diversidad metabólica de *Cannabis* medicinal cultivado legalmente en las diferentes subregiones naturales de Colombia”, a través del convenio de colaboración

académico-investigativa Unicauca-ICESI. En la tabla 30 se registran las condiciones experimentales del método de cromatografía UHPLC-DAD utilizado en el análisis de los extractos.

Tabla 30. Condiciones experimentales UHPLC-DAD

Equipo	Hitachi de Merck
Columna analítica	Kinetex 2.6 μm, 100mm x 4.60 mm
Temperatura de columna	25 °C
Flujo analítico	1.0 mL/min
Fase móvil A	Agua con 0,1 % ácido fórmico
Fase móvil B	Metanol con 0,05 % ácido fórmico
Modo de flujo	Gradiente
Detector	Arreglo de diodos (DAD)
Longitud de onda	222 nm
Volumen de inyección	5 μL
Tiempo de corrida	20 minutos
Software	EZchrome Elite

En la tabla 31 se encuentran los datos de la curva de calibración e intervalo lineal y en la tabla 32 se registran los límites de detección y cuantificación del método de cuantificación de cannabinoides analizados por UHPLC-DAD. El método de cuantificación fue por patrón externo usando patrones de los cannabinoides identificados. Se realizó curva de calibración inyectando la mezcla de cannabinoides e identificando por tiempo de retención.

La ecuación 2 se utiliza para el cálculo de la concentración de cannabinoides:

$$\% \text{ Cannabinoide} = \frac{S - b}{m} \cdot f \cdot \frac{V}{M} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

S: es la señal del cannabinoide en la muestra en este caso el área de pico

b: el intercepto de la recta de calibración

m: la pendiente de la recta de calibración

f: el factor de dilución del extracto

V: volumen de solvente usado en la extracción

M : masa de *Cannabis* usada en la extracción.

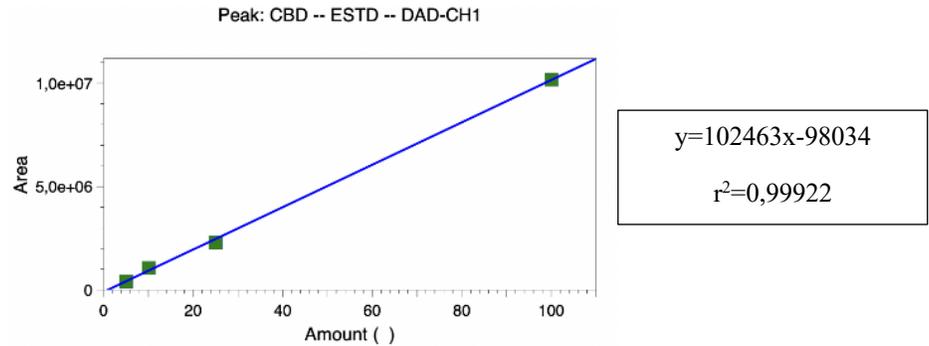
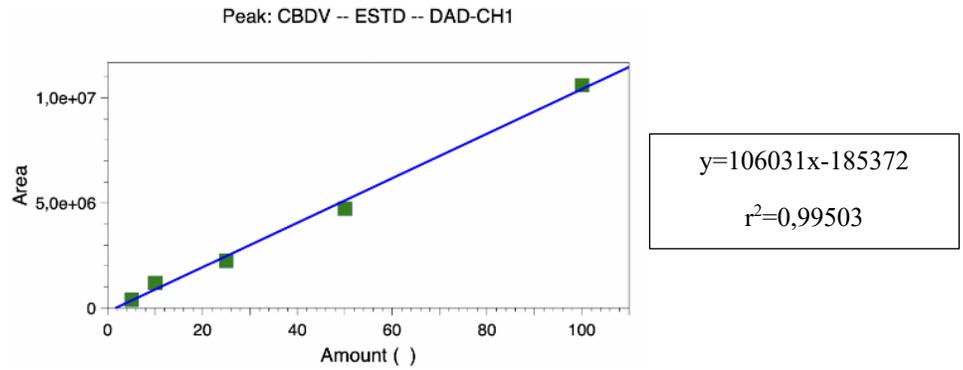
Tabla 31. Curva de calibración e intervalo lineal

NIVEL DE CALIBRACIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
1	5.0
2	10.0
3	25.0
4	50.0
5	100.0

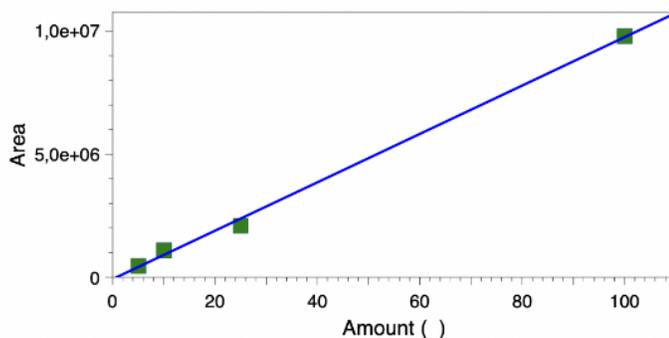
Tabla 32. Límite de detección y cuantificación

ANALITO	LÍMITE DE DETECCIÓN (mg/L)	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (mg/L)
CBDV	1.464	4.832
CBD	0.995	3.108
CBG	0.057	0.172
THCV	1.519	4.205
CBDA	2.358	7.199
CBN	2.834	8.456
THC	0.528	1.445
CBC	2.891	5.178
THCA	0.198	0.417

Curvas de Calibración

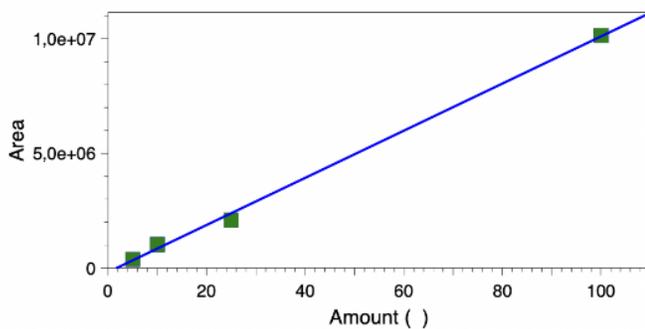


Peak: CBG -- ESTD -- DAD-CH1



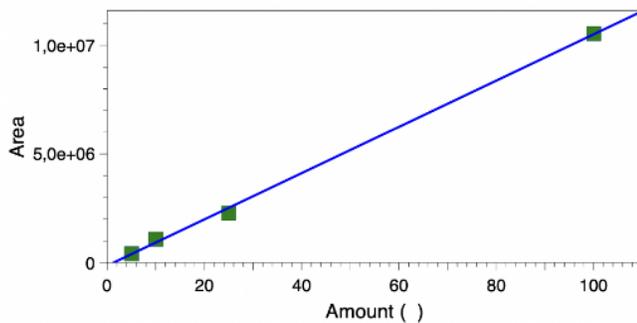
$$y=98200x-70790$$
$$r^2=0,99789$$

Peak: THCV -- ESTD -- DAD-CH1



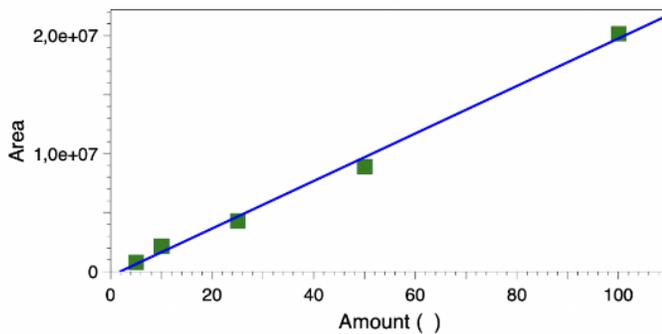
$$y=102818x-184072$$
$$r^2=0,99801$$

Peak: CBDA -- ESTD -- DAD-CH1



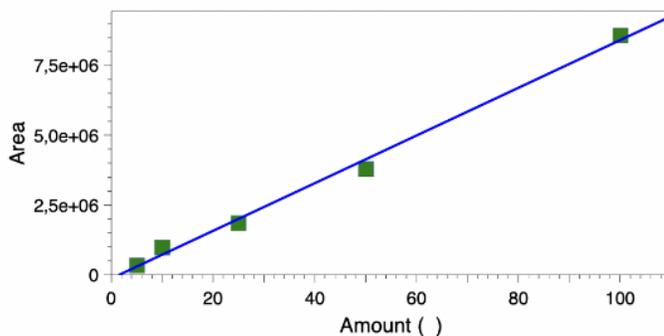
$$y=106406x-135825$$
$$r^2=0,99870$$

Peak: CBN -- ESTD -- DAD-CH1



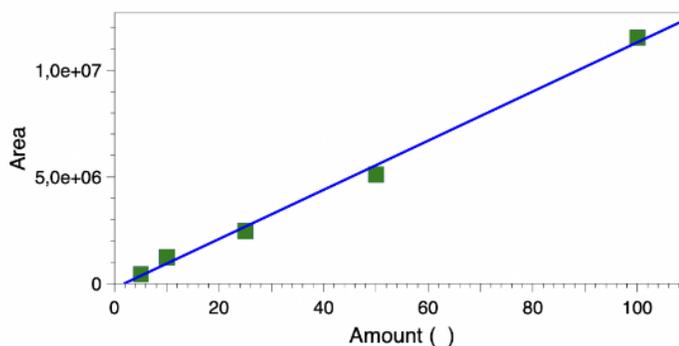
$$y=201520x-388683$$
$$r^2=0,99496$$

Peak: THC -- ESTD -- DAD-CH1



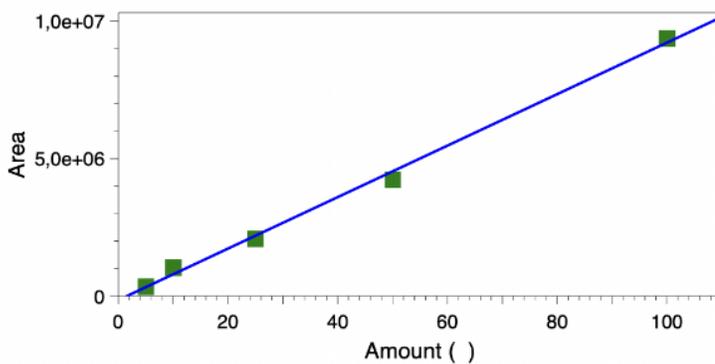
$$y=85429x-136365$$
$$r^2=0,99445$$

Peak: CBC -- ESTD -- DAD-CH1



$$y=115258x-215993$$
$$r^2=0,99537$$

Peak: THCA -- ESTD -- DAD-CH1



$$y=93629x-141273$$
$$r^2=0,99644$$

En los gráficos 17 al 27 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al analizar los extractos de *Cannabis* (variedades A, B, C y D) por UHPLC-DAD.

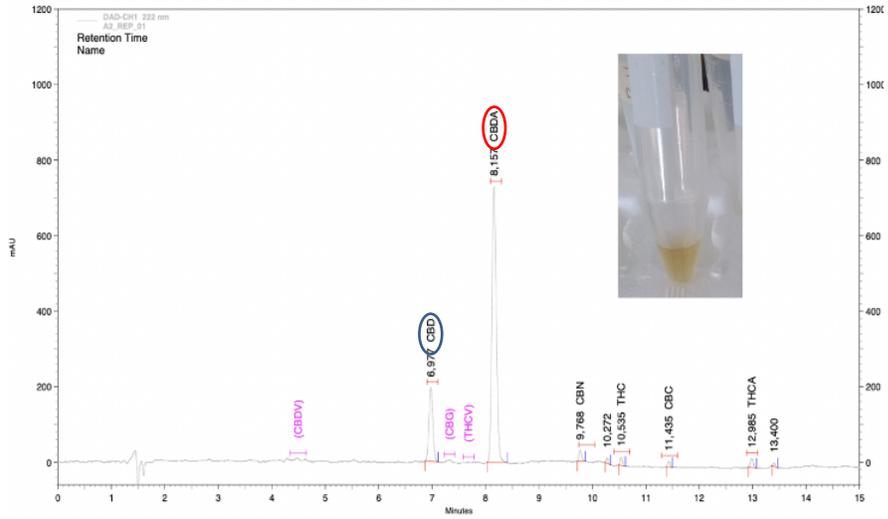


Gráfico 17. Cromatograma extracción rápida variedad A.

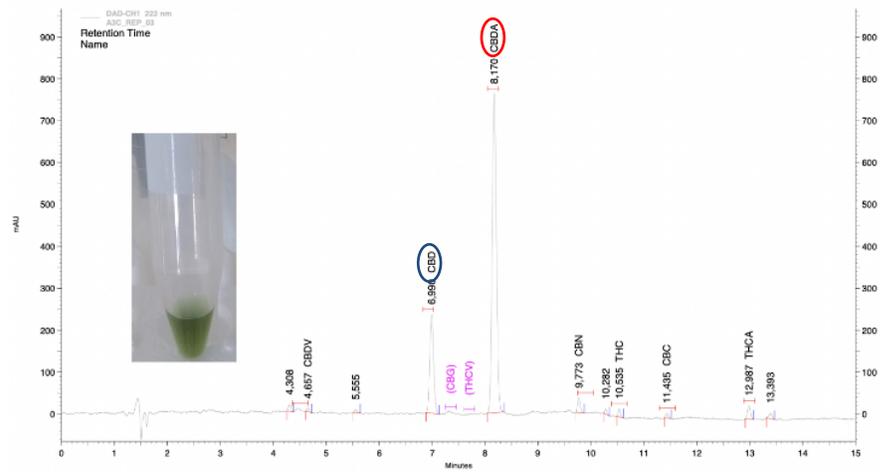


Gráfico 18. Cromatograma extracción por RSO variedad A.

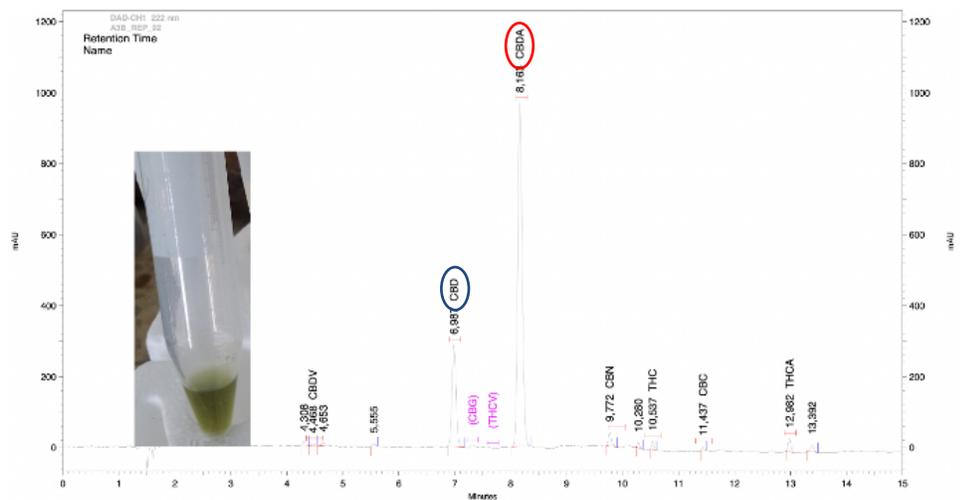


Gráfico 19. Cromatograma extracción soxhlet variedad A.

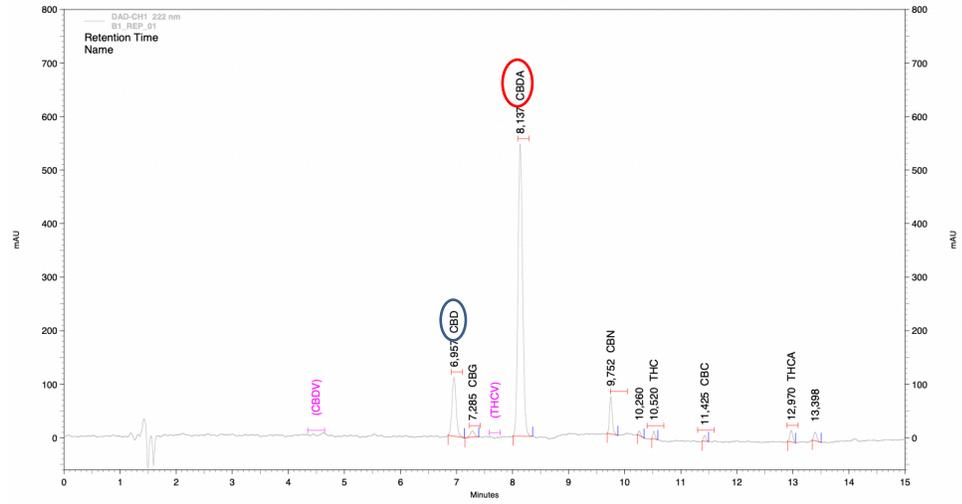


Gráfico 20. Cromatograma extracción rápida variedad B.

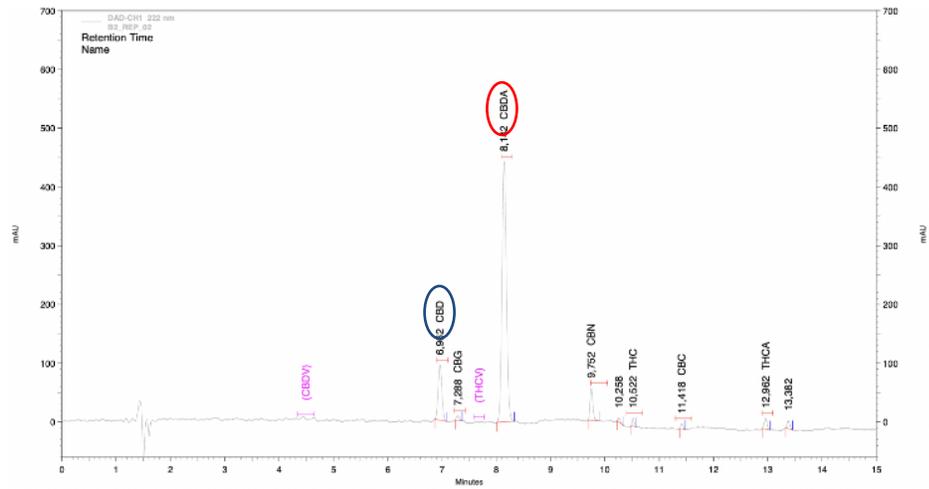


Gráfico 21. Cromatograma extracción por RSO variedad B.

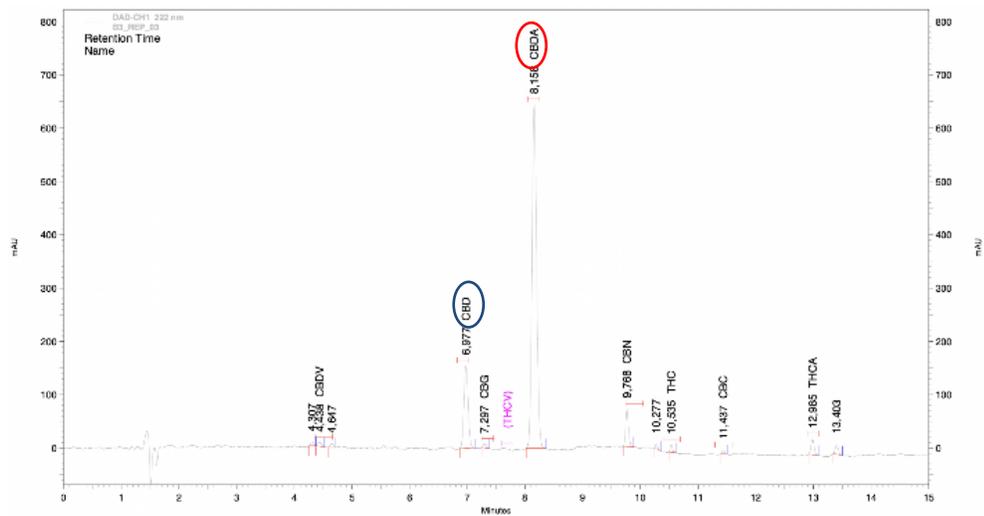


Gráfico 22. Cromatograma extracción soxhlet variedad B.

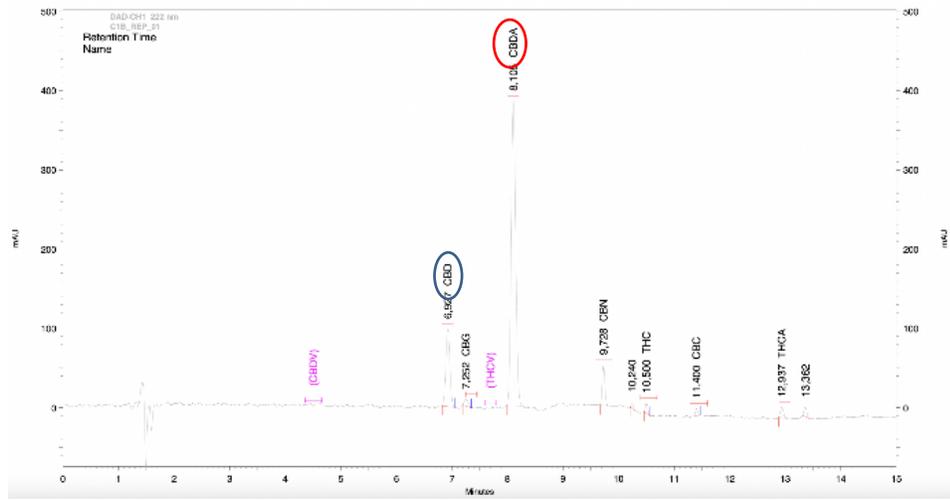


Gráfico 23. Cromatograma extracción rápida variedad C.

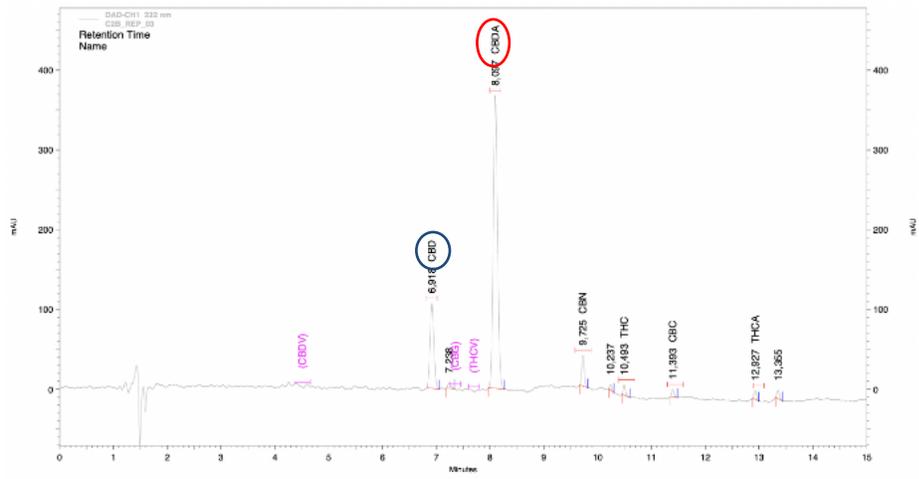


Gráfico 24. Cromatograma extracción por RSO variedad C.

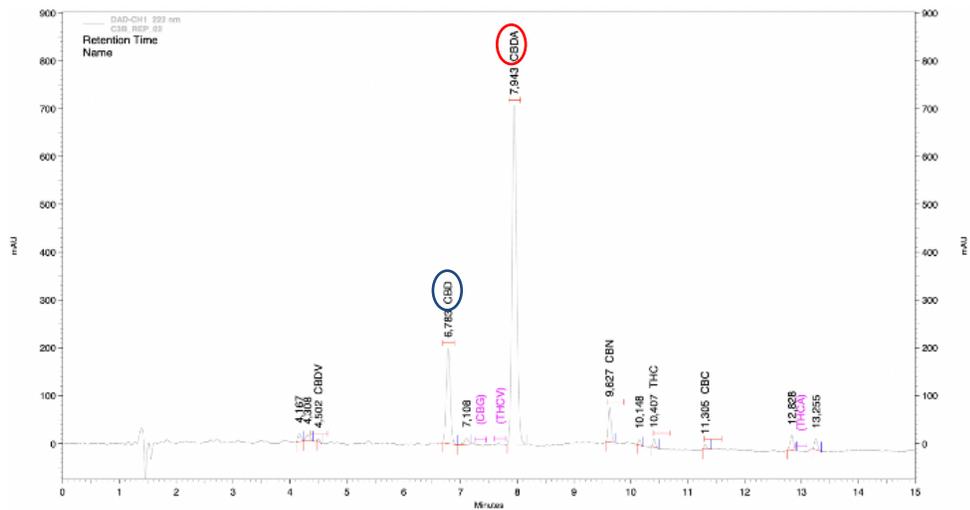


Gráfico 25. Cromatograma extracción soxhlet variedad C.

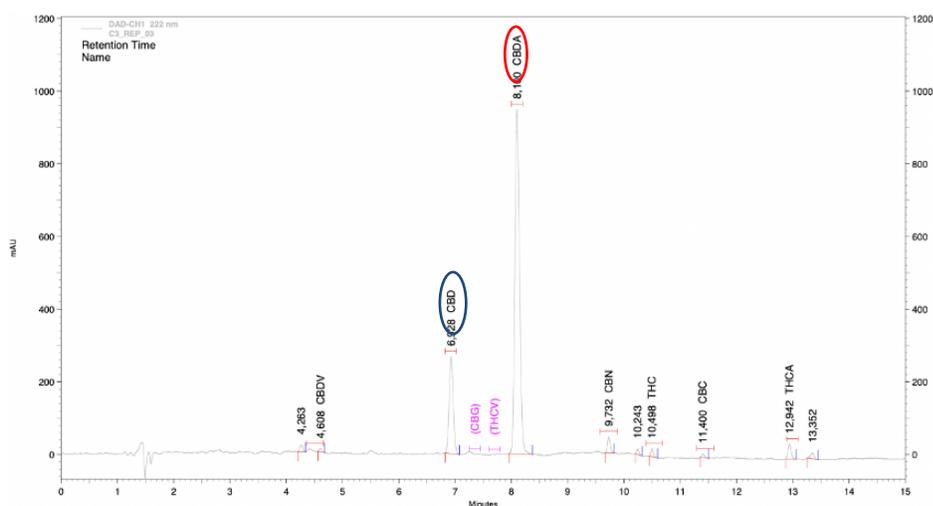


Gráfico 26. Cromatograma extracción por RSO variedad D.

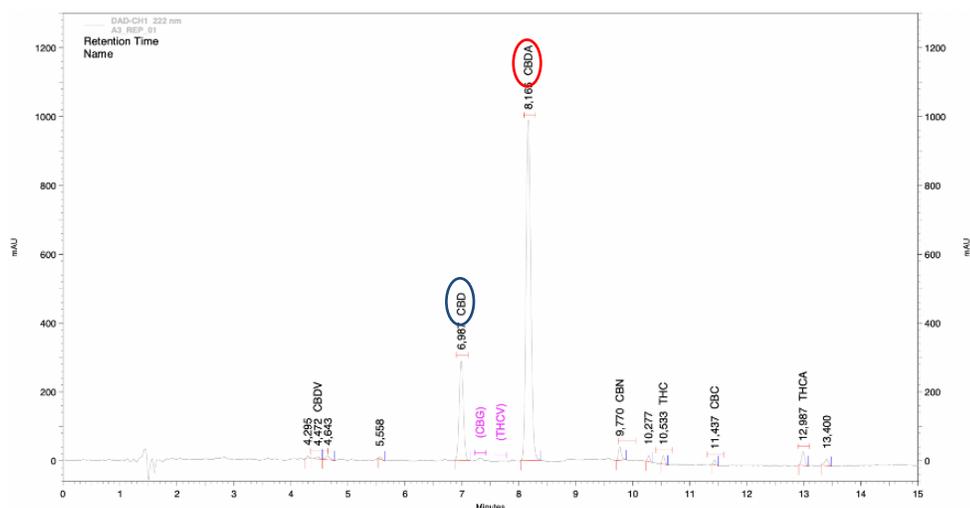


Gráfico 27. Cromatograma extracción soxhlet variedad D.

7.2.3.3.2 *Método de identificación y cuantificación de terpenos (Zekič, et al, 2020).*

El análisis de terpenos se desarrollo siguiendo la metodología de Zekič, et al 2020 (Zekič, et al, 2020), *método adaptado* por el grupo de Investigación Química de Productos Naturales e implementado en los laboratorios de la Unidad de Análisis Industrial de la Universidad del Cauca. La cuantificación se realiza por estándar externo, en la tabla 31 se registran las condiciones experimentales del método de cromatografía de gases acoplado a masas.

Tabla 33. Condiciones experimentales Cromatografía de gases acoplado a masas

Equipo	Cromatógrafo de gases acoplado a masas (CG-EM) serie TRACE 1300 acoplado a espectrómetro de masas ISQLT marca Thermo Scientific con automuestrador HTA
Detector	Masas ISQT
Columna analítica	TG-5MS (30m, ID 0,25 μ m Film: 0,25 μ m)
Temperatura de línea de transferencia	250 °C
Temperatura surco de iones	230 °C
Temperatura de inyector	280 °C
Split	50 mL/min
Rampa	desde 80°C sube a 250 °C a 20 °C/min
Tiempo de análisis	9 minutos
Detector	MS Impacto electrónico
Rango de masas	40 - 450
Volumen de inyección	0,6 μ L
Software	Chromeleon 7

En la tabla 34 se encuentran los datos de la curva de calibración e intervalo lineal y en la tabla 35 se registran los límites de detección y cuantificación del método de cuantificación de terpenos analizados por CG-EM.

Tabla 34. Curva de calibración e intervalo lineal

NIVEL DE CALIBRACIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL (μ g/mL)
1	0.25
2	0.5
3	1.0
4	5.0
5	10.0
6	15.0
7	20.0

Tabla 35. Límite de detección y cuantificación

ANALITO	LÍMITE DE DETECCIÓN (μ g/L)	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (μ g/L)
α -pineno	1.1	3.5
Canfeno	1.1	3.8
β -mirreno	1.2	4.1
β -pineno	1.2	4.0
Delta-3-careno	0.6	1.9
α -terpineno	1.0	3.3
o-cimeno	1.0	3.2
d-Limoneno	1.3	4.4
β -ocimeno	1.0	3.5
γ -terpineno	1.1	3.7
Terpinoleno	1.2	3.9

El método de cuantificación fue por patrón externo usando patrones de los terpenos identificados. Se realizó curva de calibración inyectando la mezcla de terpenos e identificando por tiempo de retención y probabilidad de similitud del espectro de masa con la base de datos del NIST.

Para el cálculo de la concentración de terpenos se utilizó la ecuación 3:

$$\% \text{ Terpeno} = \frac{S-b}{m} \cdot f \cdot \frac{V}{M} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

S: es la señal del terpeno en la muestra en este caso el área de pico

B: el intercepto de la recta de calibración

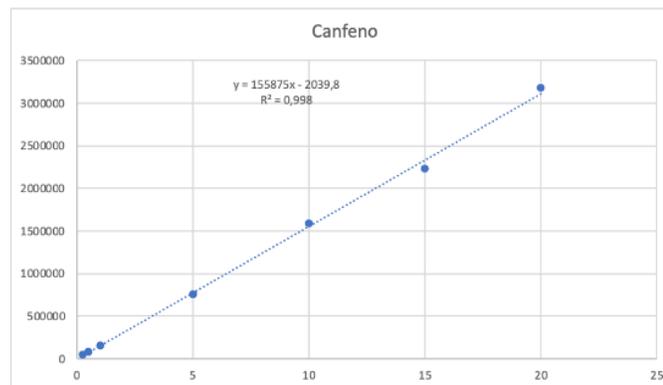
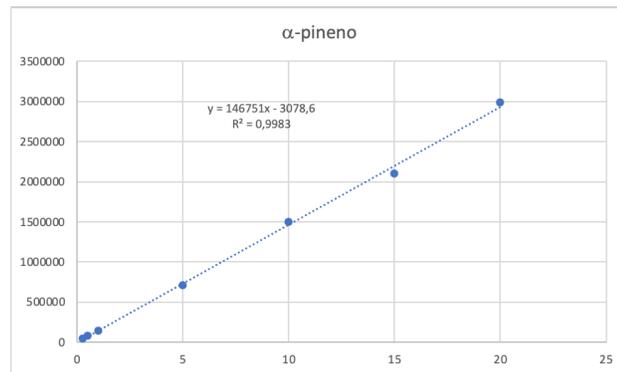
m la pendiente de la recta de calibración

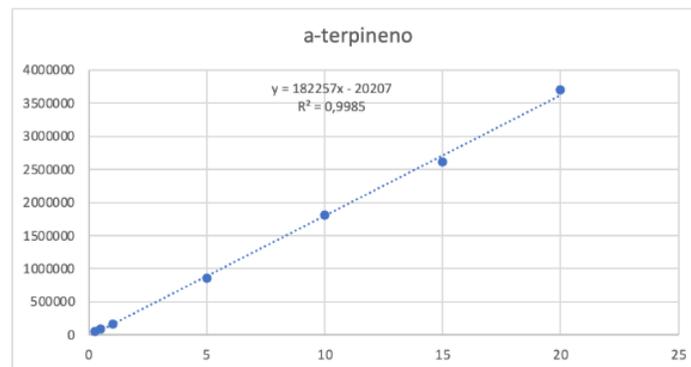
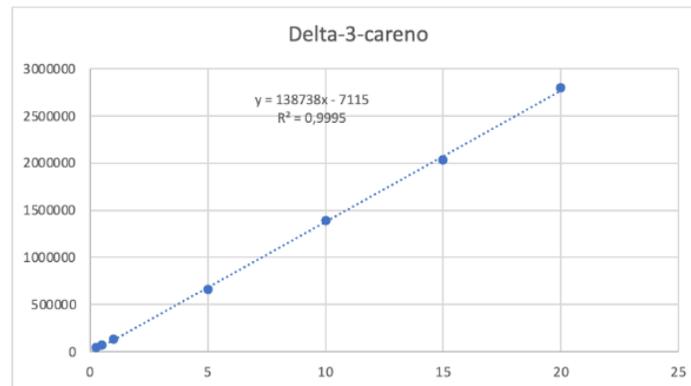
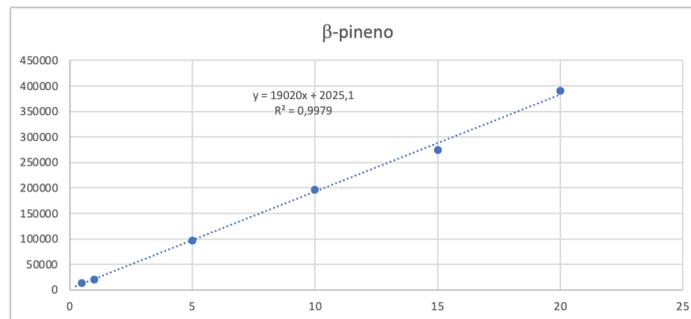
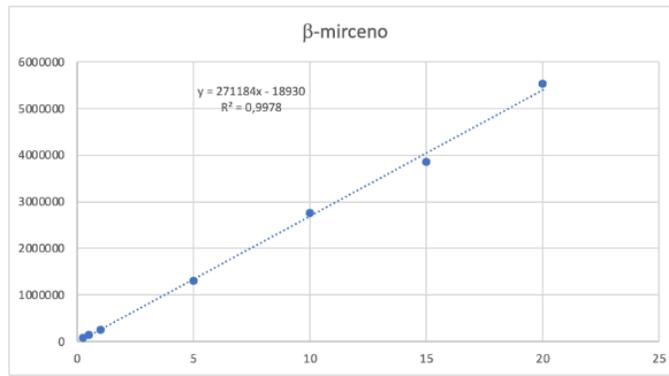
f: el factor de dilución del extracto.

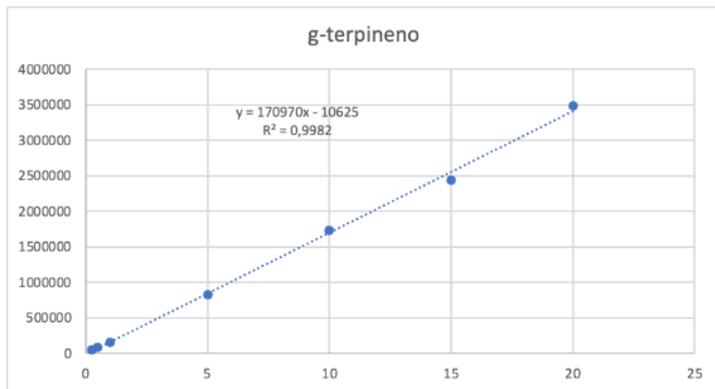
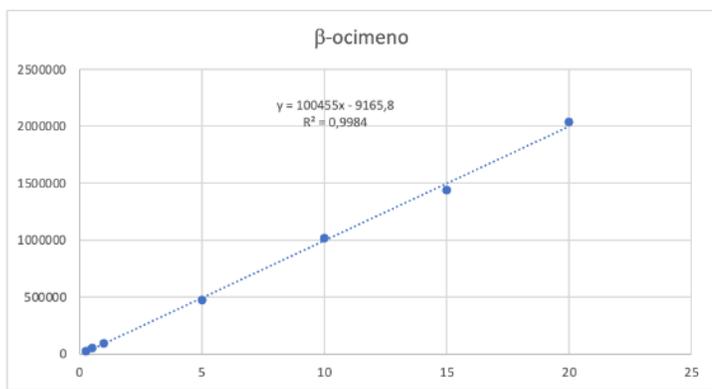
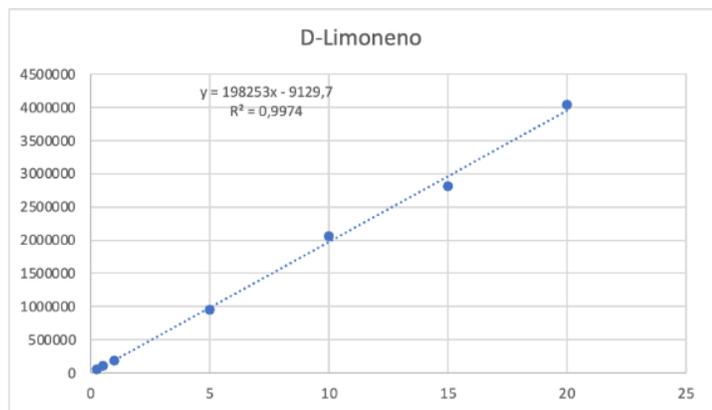
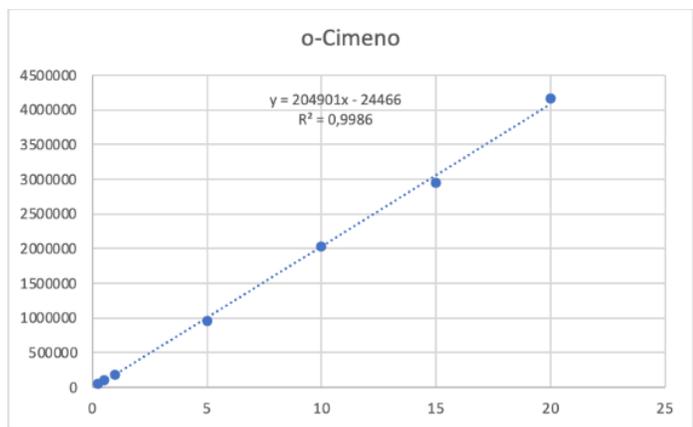
V: volumen de solvente usado en la extracción

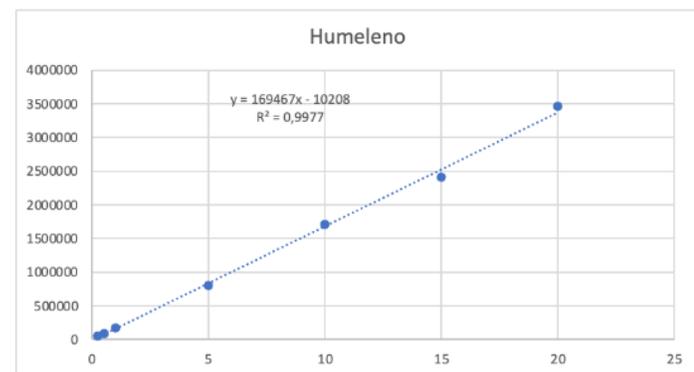
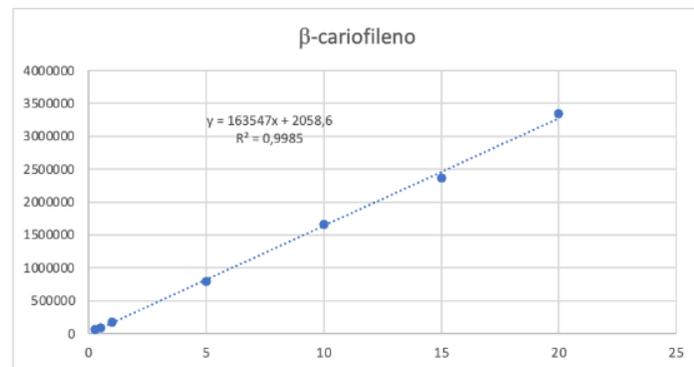
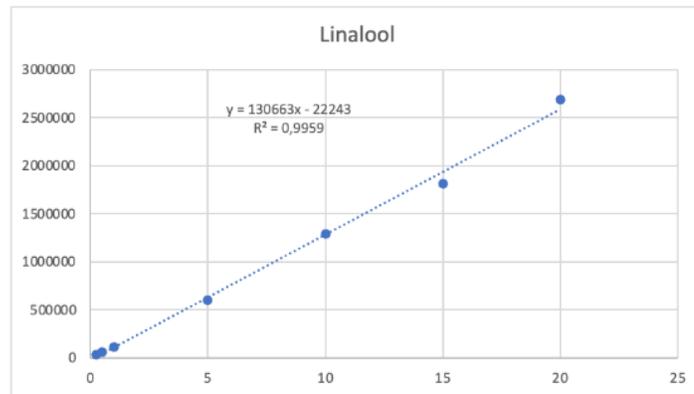
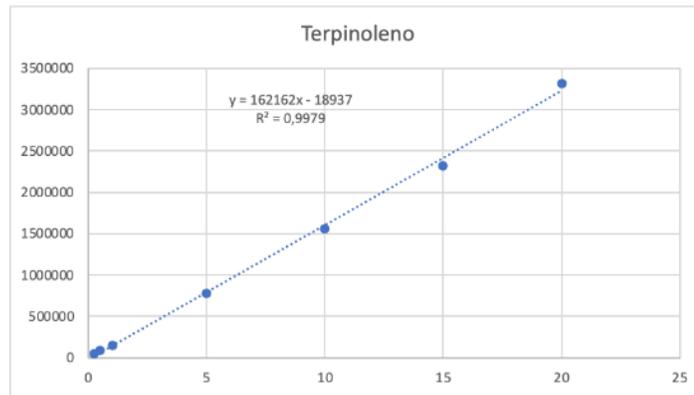
M : masa de *Cannabis* usada en la extracción.

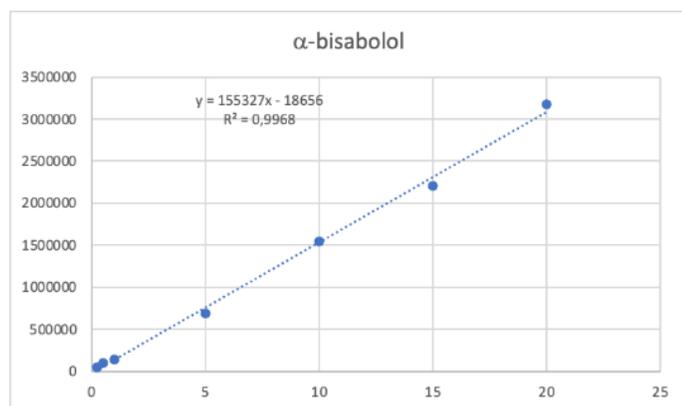
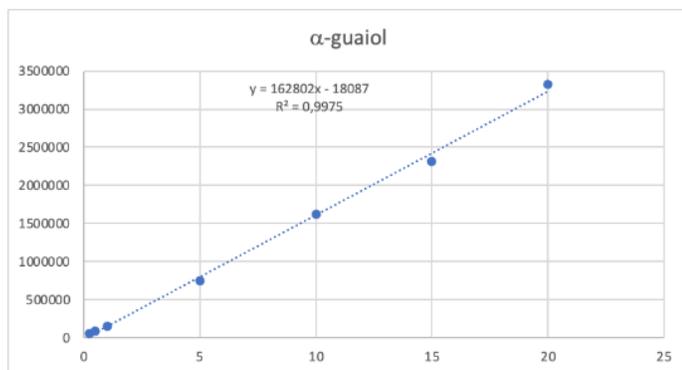
Curvas de Calibración











En los gráficos 28 al 38 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al analizar los extractos de *Cannabis* (variedades A, B, C y D) por CG-EM.

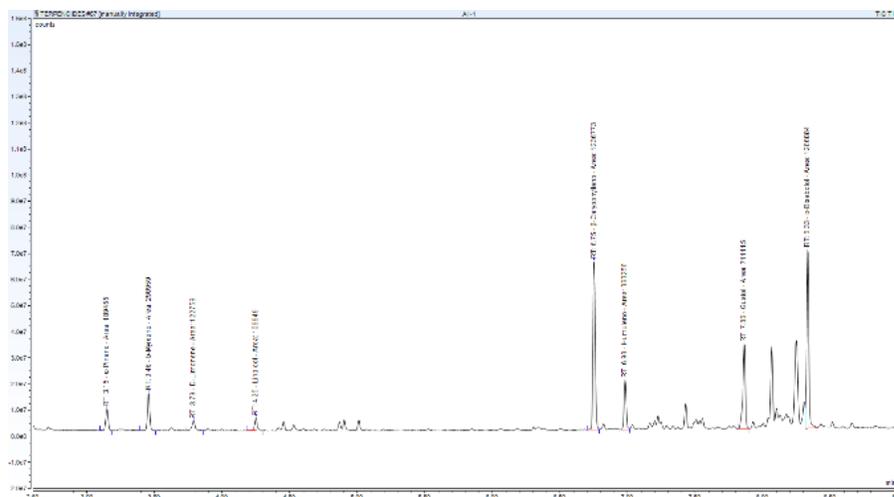


Gráfico 28. Cromatograma extracción rápida variedad A.

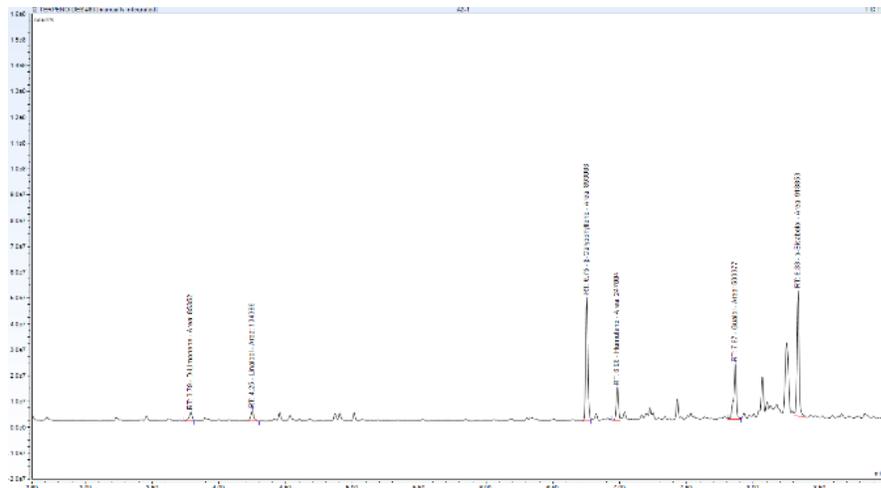


Gráfico 29. Cromatograma extracción RSO variedad A.

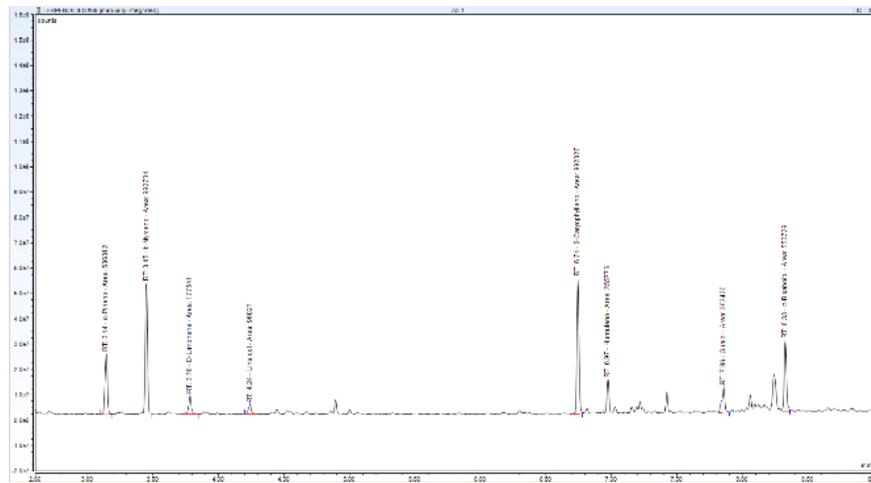


Gráfico 30. Cromatograma extracción soxhlet variedad A.

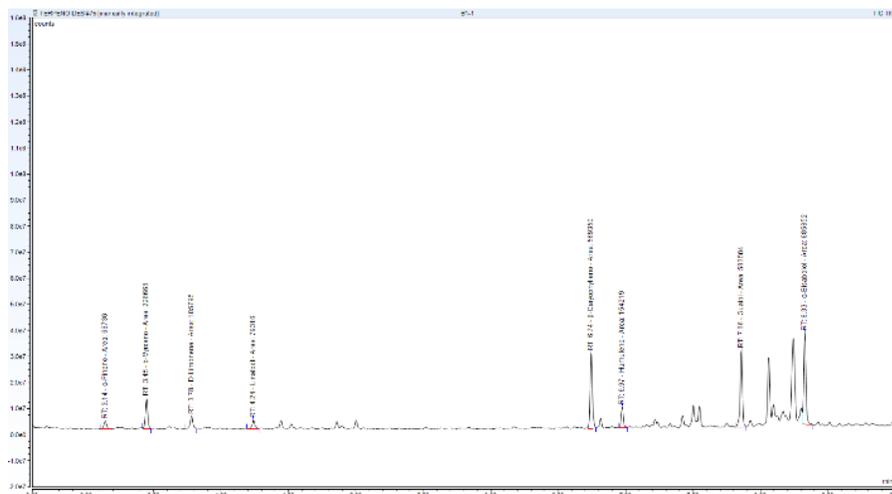


Gráfico 31. Cromatograma extracción rápida variedad B.

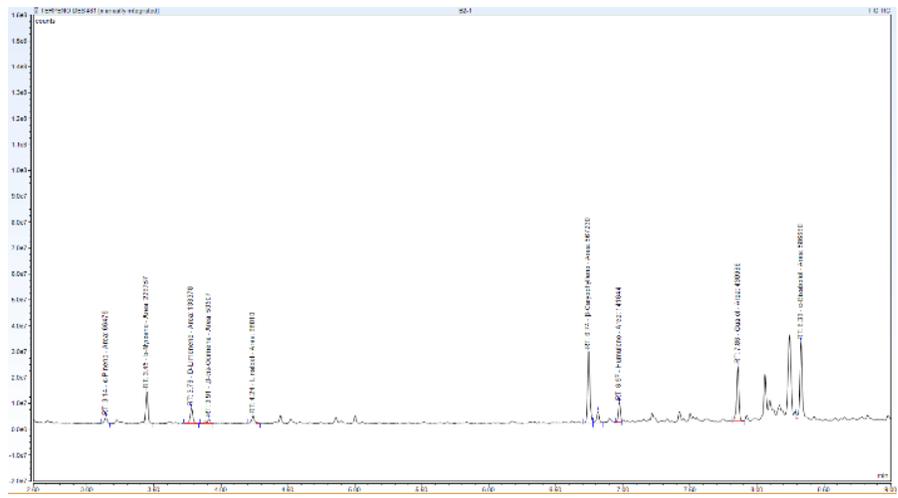


Gráfico 32. Cromatograma extracción RSO variedad B.

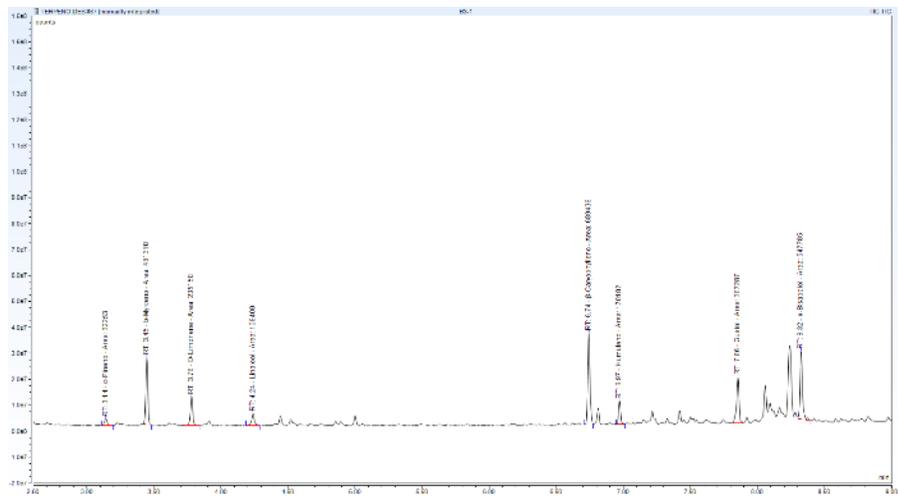


Gráfico 33. Cromatograma extracción soxhlet variedad B.

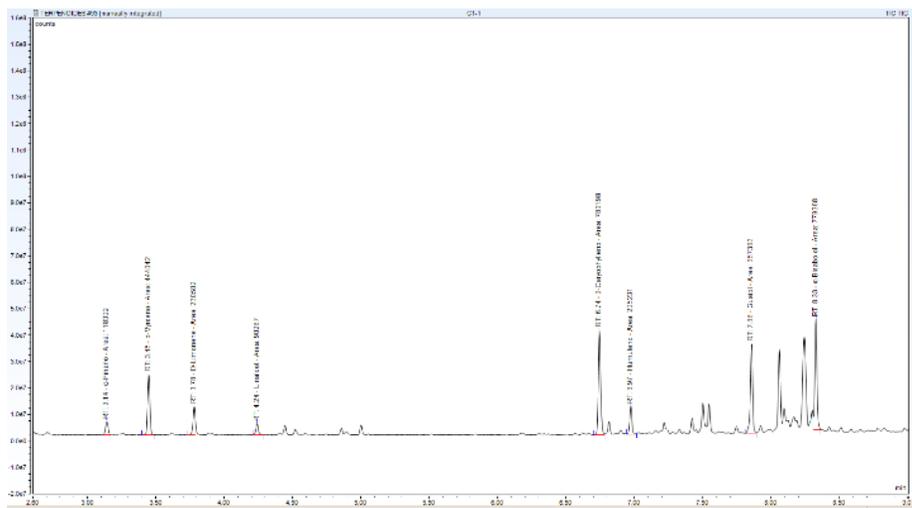


Gráfico 34. Cromatograma extracción rápida variedad C.

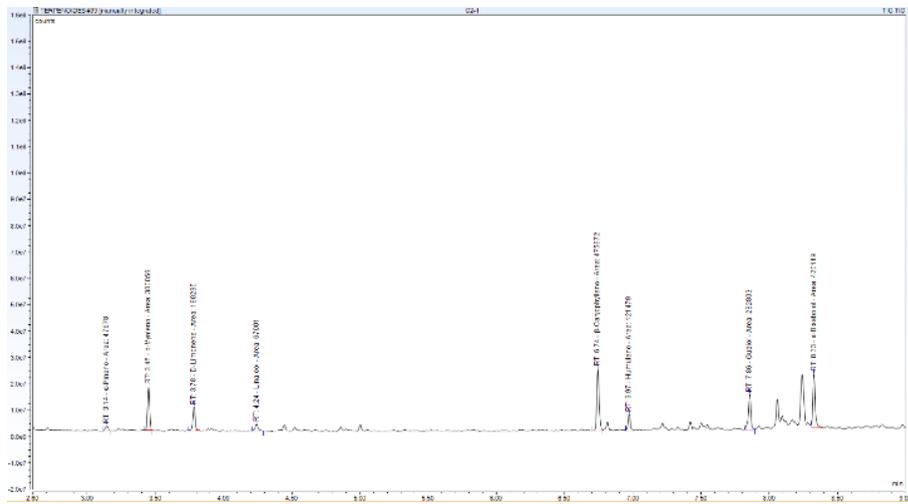


Gráfico 35. Cromatograma extracción RSO variedad C.

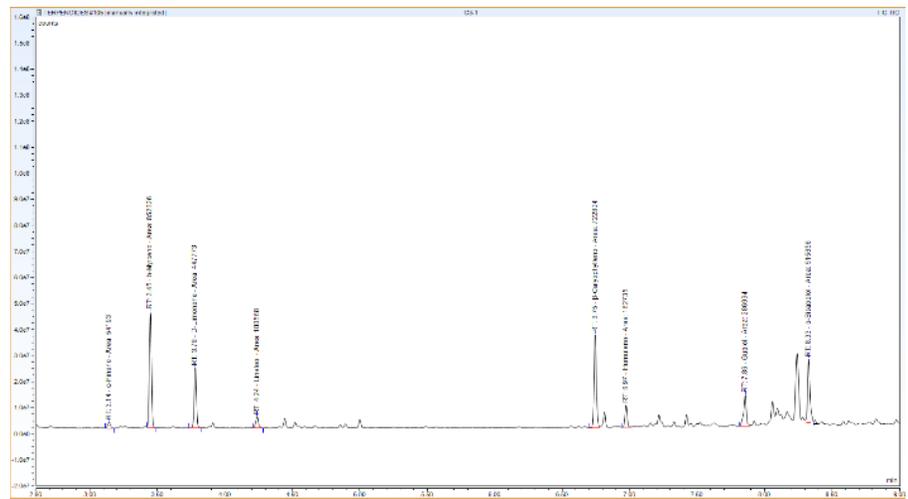


Gráfico 36. Cromatograma extracción soxhlet variedad C.

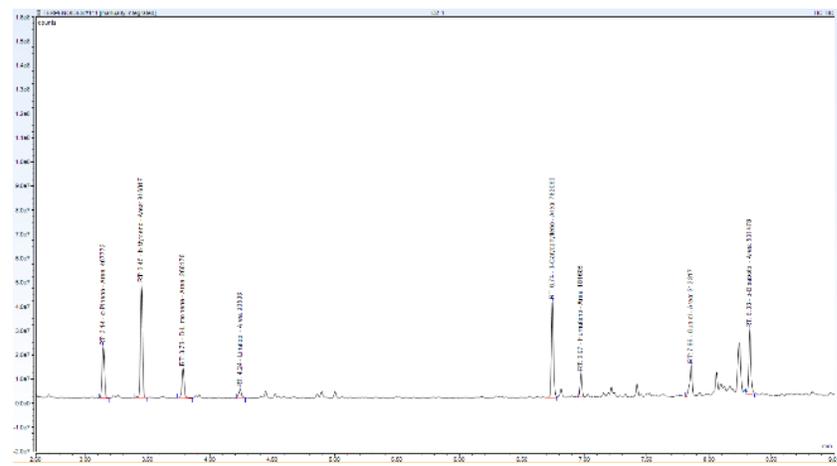


Gráfico 37. Cromatograma extracción RSO variedad D.

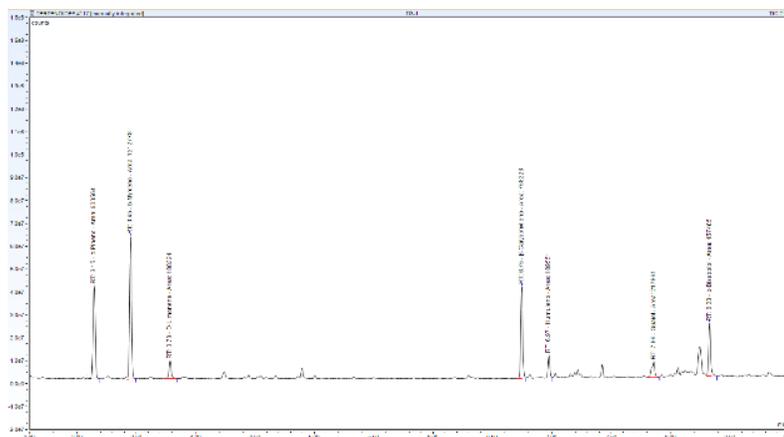


Gráfico 38. Cromatograma extracción soxhlet variedad D.

7.2.3.3.3 Método de cuantificación de fenoles, flavonoides y antraquinonas totales

Los análisis de fenoles, flavonoides y antraquinonas se realizaron en el laboratorio de Bioensayos (Estrés oxidativo) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso en Viña del Mar – Chile, dicho laboratorio cuenta con los protocolos y estandarización de los métodos de análisis utilizados.

- **Contenido de fenoles totales (Waterman & Mole, 1994):**

El ensayo se desarrolló siguiendo la metodología propuesta por Waterman & Mole, 1994 (Waterman & Mole, 1994), mediante la reacción del reactivo de Folin & Ciocalteu con compuestos orgánicos que presentan anillo aromático hidroxilado en un medio alcalino, es posible determinar el contenido de polifenoles por espectrofotometría. En la determinación, 500 μL de extracto ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) fueron mezclados con 2,5 mL del reactivo Folin & Ciocalteu (0,2 N) e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Al término de este tiempo, la solución se mezcló con 2 mL de Na_2CO_3 (7,5%). La mezcla fue incubada en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 2 horas y se evaluó por espectrofotometría a 700 nm. Los datos de absorbancia fueron extrapolados en una curva de calibrado de ácido gálico. El total del contenido de polifenoles fue expresado en milimol de equivalentes ácido gálico (GAE mM).

- **Contenido de flavonoides totales (Arvouet-Grand et al., 1994):**

El contenido de flavonoides se determinó por espectrofotometría siguiendo la metodología propuesta por Arcouet-Grand et al., 1994 (Arcouet-Grand et al., 1994). Las muestras se trataron con AlCl_3 para la formación de quelatos coloreados típicos de los flavonoides cuando se tratan con el ácido de Lewis tricloruro de aluminio. El análisis consistió en mezclar 5 mL de extracto ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con 5 mL de una solución de AlCl_3 (2% en etanol) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se obtuvo la absorbancia de las muestras medidas a longitud de onda de 415 nm. Los datos fueron extrapolados en una curva de calibrado de quercetina. El total de flavonoides fue expresado en milimol de equivalentes de quercetina (QE mM).

- **Contenido de antraquinonas (Mellado et al., 2012):**

El análisis se realizó siguiendo la metodología propuesta por Mellado et al., 2012 (Mellado et al., 2012). Al igual que para la determinación de flavonoides, las antraquinonas forman quelatos cuando reaccionan con AlCl_3 , pero son detectados a una longitud de onda diferente. Para esto, se mezcló 5 mL de extracto ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con 5 mL de una solución de AlCl_3 (2% en etanol) y se dejó en incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se obtuvo la absorbancia de cada extracto, a través de espectrofotometría, a una longitud de onda de 486 nm. Los datos obtenidos fueron extrapolados en una curva de calibrado de emodina. El total de antraquinonas fue expresado en milimol de equivalentes de emodina (EE mM).

7.2.3.4 Análisis estadístico.

Los datos fueron sometidos a pruebas de distribución para definir si correspondían a datos paramétricos o no paramétricos. En el caso de ser paramétricos, se realizó ANOVA one way y en el caso de ser no paramétrico, se realizó ANOVA Kruskal-Wallis. Se utilizó un nivel de significancia de valor de p de 0,05. Además, para evaluar la relación entre las variables obtenidas, se realizó correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica 7.0.

Anexo 3- 7. 3. Capítulo 4 - Materiales y métodos

7.3.1 Localización

Las pruebas de actividad antioxidante; capacidad antioxidante total (TRAP), ensayo de actividad secuestradora del radical (DPPH) y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), al igual que las pruebas biológicas sobre la viabilidad celular en líneas celulares humanas de cáncer, se realizaron en el laboratorio de Bioensayos (Estrés oxidativo), del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso en Chile.

7.3.2 Materiales

Se utilizó; Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), ácido gálico, como antioxidante de referencia. El DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS; catión radical 2,2 – azinobis –(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato). Se emplearon 3 líneas celulares de cáncer humano: HT-29 (colon), MCF-7 (mama), PC-3 (próstata) y línea celular no tumoral de epitelio de mama, MCF-10A. Todas las líneas celulares fueron obtenidas desde la American Type Culture Collection (ATCC), (Rockville, Maryland, E.E.U.U).

Equipo de espectrofotometría RAYLEIGH UV-2601, lector de placas BioTek modelo EL808, cabina de seguridad biológica Haier modelo: HR30-IIA2.

7.3.3 Métodos

Los análisis de capacidad antioxidante y las pruebas biológicas de viabilidad celular en líneas celulares humanas de cáncer, se realizaron en el laboratorio de Bioensayos (Estrés oxidativo) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso en Viña del Mar – Chile, dicho laboratorio cuenta con los protocolos y estandarización de los métodos de análisis utilizados.

7.3.3.1 Capacidad antioxidante total.

7.3.3.1.1 Capacidad antioxidante total – TRAP (Romay et al., 1996).

Este método se basa en la capacidad de algunos antioxidantes en secuestrar un electrón desapareado del radical blanco. Para ello se utiliza el ensayo de atrapamiento del catión radical 2,2 – azinobis – (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), que presenta una coloración verde azulada intensa, cuya absorbancia es medida por espectrofotometría (Romay et al., 1996). La presencia de antioxidantes en la muestra analizada es determinada por la disminución de la coloración del radical, por ende, un descenso en la absorbancia (ilustración 20).

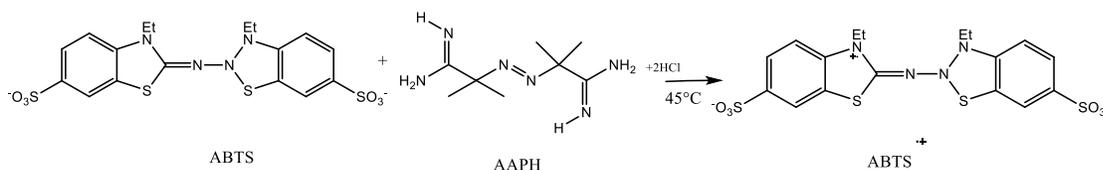


Ilustración 20. Reacción de generación del radical ABTS^{•+} catión radical 2,2 – azinobis – (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato); AAPH= Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano).

El ensayo se desarrollo siguiendo la metodología propuesta por Romay et al., 1996 (Romay et al., 1996). La técnica consistió en preparar una solución 10 mM de AAPH (ácido 6 hidroxí-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico) y mezclarla con una solución de 150 μ M de ABTS (catión radical 2,2 – azinobis – (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)), en un buffer fosfato salino 100 mM (pH 7,4). La mezcla fue incubada a 45 °C durante 30 minutos, resultando en la formación del radical ABTS^{•+} de color verde azulado. Luego, 10 μ L de extracto (1mg/mL) fueron mezclados con 990 μ L de la solución del radical ABTS^{•+} y se determinó la absorbancia en una cinética de 50 segundos a 734 nm. A partir de las absorbancias registradas para cada extracto, se obtuvo el porcentaje de inhibición del radical (IR), el cual fue calculado a través de la ecuación 4:

$$\text{IR (\%)} = \left(\frac{(A_0 - A_{50})}{A_0} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 4})$$

Donde A_0 es la absorbancia registrada al tiempo 0 segundos y A_{50} representa la absorbancia obtenida a los 50 segundos.

Una vez obtenidos los porcentajes de IR de cada extracto, los datos se extrapolaron en una curva de TROLOX (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), antioxidante sintético mimético de la vitamina E y se expresaron en milimol de capacidad antioxidante de equivalentes TROLOX (TEAC mM). Los resultados TEAC obtenidos, fueron comparados con dos potentes antioxidantes puros, ácido gálico y BHT (Butil hidroxitolueno).

7.3.3.1.2 Ensayo de actividad secuestradora del radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

Este método es utilizado para medir la capacidad reductora de algunos antioxidantes frente al radical DPPH· (2,2'-dinitrofenil-1-picrilhidracil), un radical estable en solución etanólica (ilustración 21).

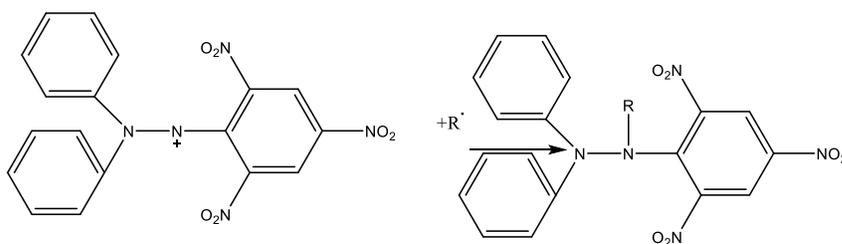


Ilustración 21. Reacción del radical DPPH con un agente reductor (R).

El ensayo se desarrollo siguiendo la metodología propuesta por *Brand-Williams et al., 1995* (*Brand-Williams et al., 1995*). Se mezclaron 100 μ L de extracto con 2,9 mL de una solución de DPPH· 50 μ M en etanol. Luego, se agitaron las muestras en vortex y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm. Este procedimiento se realizó para cada extracto en cuatro concentraciones, 1, 10, 30 y 50 mg/mL. Con la información de la absorbancia en las tres concentraciones para cada extracto, se procedió a calcular el porcentaje de secuestro del radical DPPH· (RSA%) a través de la ecuación 5:

$$\text{RSA}\% = \left(\frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Control}}} \right) \times 100 \quad \text{(Ec. 5)}$$

Donde, A_{Control} corresponde a la absorbancia de la solución DPPH· sin la muestra y A_{muestra} es la absorbancia de la solución DPPH· con el correspondiente extracto. A partir de la obtención del RSA% y la concentración de los extractos se obtuvo el IC_{50} , que representa la concentración a la que el 50% del radical es neutralizado. Dichos IC_{50} fueron comparados con dos antioxidantes de referencia, TROLOX y BHT.

7.3.3.1.3 Poder antioxidante reductor del hierro – FRAP (Dudonné *et al.*, 2009).

El ensayo FRAP es un método colorimétrico que se utiliza para determinar el poder reductor del ion férrico a ion ferroso de una muestra determinada (ilustración 22).

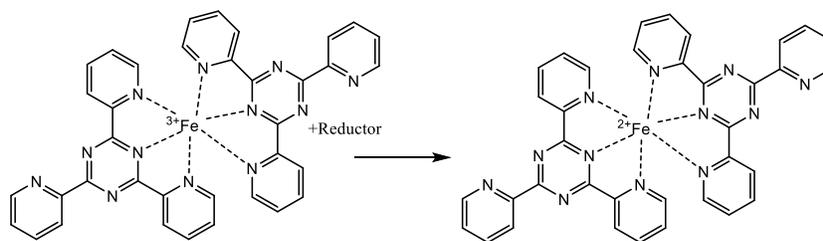


Ilustración 22. Reacción de reducción del hierro detectada por el método FRAP. Reducción de ion férrico a ion ferroso, generada por la reacción con un agente reductor.

El ensayo se desarrollo siguiendo la metodología propuesta por Dudonné *et al.*, 2009 (Dudonné *et al.*, 2009). Para este análisis se preparó una solución FRAP, que contiene 10 volúmenes de buffer acetato 300 mM, 1 volumen de FeCl₃ 20 mM y 1 volumen de TPTZ 10 mM (2,4,6-tri(2-piridil)-S-triazina). Luego, se tomó 100 μ L de extracto (1 mg/mL) y se mezcló con 300 μ L de la solución FRAP, agitando por 15 segundos. Después, la mezcla fue incubada 30 minutos a 37 °C en baño termostático. Finalmente fue medida la absorbancia a 593 nm. Los valores de absorbancia fueron extrapolados en una curva de calibrado de TROLOX y expresados como TEAC (Mm).

7.3.3.2 Análisis de la citotoxicidad de extractos de *Cannabis* en líneas celulares humanas.

7.3.3.2.1 Cultivo de células.

Las líneas celulares de cáncer HT-29 (Cáncer colon), MCF-7 (Cáncer mama), PC-3 (Cáncer próstata) y línea celular no tumoral de epitelio de mama, MCF-10A (línea normal mama) se mantuvieron en medio de cultivo Ham's-F12:DMEM medio alto en

glucosa, suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) a 37 °C en una incubadora humidificada de CO₂ al 5 %. Se tomaron volúmenes indicados de los 11 extractos de *Cannabis* no psicoactivo y se agregaron al medio para alcanzar las concentraciones indicadas (12.5, 25, 50, 100 µg/mL), posteriormente las células se incubaron durante 72 horas. Se utiliza DMSO al 0,1 % como grupo de control.

7.3.3.2.2 *Ensayo de inhibición del crecimiento in vitro.*

El ensayo de sulforrodamina B, se desarrollo siguiendo la metodología propuesta por Vichai y Kirtikara (Vichai, et al., 2006). Después de ser tratadas las células son fijadas con ácido tricloroacético 50 % (25 µl/pocillo) a 4 °C durante 1 h, posteriormente son lavadas con agua destilada, 3 veces por inmersión. Luego las células son teñidas con 0.1% sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en ácido acético 1% (50 µl/pocillo) durante 30 min y lavadas 3 veces con ácido acético 1% (150 µl/pocillo) para eliminar el colorante no unido. El colorante unido a proteína se solubiliza con 100 µl de buffer Tris (hidroximetil amino metano) 10 mM. La densidad celular se analiza en un lector de placas a 540 nm. Para este ensayo se realizaron 3 experimentos cada uno por triplicado, los datos obtenidos permitieron calcular los valores de IC₅₀ de cada extracto de *Cannabis*.

7.3.3.3 **Análisis estadístico.**

Los datos fueron sometidos a pruebas de distribución para definir si correspondían a datos paramétricos o no paramétricos. En el caso de ser paramétricos, se realizó ANOVA one way y en el caso de ser no paramétrico, se realizó ANOVA Kruskal-Wallis. Se utilizó un nivel de significancia de valor de p de 0,05. Además, para evaluar la relación entre las variables obtenidas, se realizó correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica 7.0

Anexo 4- 7.4. Estancia en Laboratorios de Investigaciones de Instituciones Nacionales e Internacionales



Laboratorio EmpiriaLab - Rio Negro – Colombia (junio-2021)

Entre junio y julio del 2021 se visitó el laboratorio del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la facultad de Ciencias Naturales de la Universidad ICESI en Cali-Colombia, donde se analizó las muestras por cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC-DAD).

En agosto del 2021 se realizó estancia de investigación en el laboratorio del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá-Colombia, donde se recibió capacitación en el trabajo con líneas celulares.



Universidad Técnica Federico Santa María – Valparaiso - Chile (octubre 2021)



Universidad de Valparaiso – Viña del Mar – Chile (noviembre 2021)

Anexo 5 - 7.5. Divulgaciones

FIRST WORKSHOP ON NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY AND ITS APPLICATIONS

November 25 – 27, 2019

Chillan – Chile

Prof. Paola Arango Romero.
Departamento de Química
Universidad del Cauca,
Colombia

Chillan, Chile, September 30, 2019

Dear Prof. Paola Arango R.,

It is our great pleasure to announce the "**First workshop on Natural Products Chemistry and its Applications**" to be held at Universidad del Bio Bio, Campus Fernando May, Chillan, Chile from November 25-27, 2019.

The organizers are the Research Group of Chemistry and Biotechnology of Bioactive Natural Products-Basic Sciences Department, University of Bio Bio Campus Chillan. A number of eminent scientists have agreed to participate in the event.

1-WNPCA-2019 will be unique in disseminating translational characteristics of recent biomedical, pharmaceutical, agrochemical and chemico-ecological researches, with scientists and students associated with natural products research. This event will provide a platform to present, the most important recent developments in natural products.

Due to your eminent expertise on bioactive functional molecules from plant, we would like to invite you to participate and deliver a Lecture about "**Cannabis Medicinal: Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica del Cannabis sativa que se cultiva en el departamento del Cauca**". The abstract have been accepted for oral presentation.

Due to financial constraints, the organizers will not be able to provide you complete financial assistance. Then, on behalf the organizers I am inviting you as plenary lecturer at this workshop.

Looking forward to hearing from you soon, with kind regards,

Sincerely,



Dr. Carlos Leonardo Céspedes Acuña
Profesor e Investigador Titular a Tiempo Completo

Dr. Carlos L. Céspedes
Chair Organizing Committee
International Coordinator
Email: ccespedes@ubiobio.cl



XVIII CONGRESO COLOMBIANO de Química

Sostenibilidad e Innovación: Compromiso de Paz

CERTIFICA QUE EL TRABAJO TITULADO:

Evaluación fitoquímica y actividad biológica del *Cannabis sativa*
que se cultiva en el Departamento del Cauca

De los autores:

**Paola Andrea Arango Romero, Johnnatan Mauricio Giraldo,
Ricardo Benítez Benítez, Jaime Martín Franco, Sandra Muñoz Burbano**

Fue presentado en el XVIII Congreso Colombiano de Química, realizado en Popayán - Colombia,
del 6 al 8 de Noviembre de 2019

Fernando Hernández
Presidente Comité Organizador

Andrea Carolina Cabanzo
Presidente (E) ASQUIMCO-SUR



El comité científico del 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2.

Certifican que el trabajo titulado:

“COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE TRES VARIEDADES DE CANNABIS NO PSICOACTIVO DEL CAUCA Y SU POSIBLE APLICACIÓN MÉDICA”

Fue presentado por: Paola Arango Romero, Ricardo Benítez Benítez, Jaime Martín

Presentado en modalidad oral

En el marco del 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020.

Llevado a cabo en la ciudad de Cartagena, Colombia del 11 al 15 de octubre de 2021.

Dr. Harold Ardila
Presidente Comité organizador

Dra. Elena Stashenko
Presidente Comité Científico
CLAQ 2020, XVIII COLACRO, X COCOCRO, II SPAE

Dra. Maricela Viola
Presidente Comité Científico IV C2B2