

Artículo

Estudio de Aceites de Cannabis Obtenidos a partir de Tres Variedades de *C. sativa* y por Dos Métodos de Extracción Diferentes: Caracterización Fitoquímica y Actividades Biológica

Sebastián Pino¹, Luis Espinoza² , Carlos Jara-Gutiérrez³ , Joan Villena³ , Andrés F. Olea^{4,*} 
and Katy Díaz^{2,*} 

¹ LABSUN (Laboratorio Sustentable Natural), Valparaíso 2340000, Chile; sebastian.pino@alumnos.usm.cl

² Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Avenida España 1680, Valparaíso 2340000, Chile; luis.espinozac@usm.cl

³ Laboratorio de Investigación-Estrés Oxidativo, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Viña del Mar 2520000, Chile; carlos.jara@uv.cl (C.J.-G.); juan.villena@uv.cl (J.V.)

⁴ Grupo QBAB, Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile, El Llano Subercaseaux 2801, Santiago 8900000, Chile

* Correspondencia: andres.olea@uautonoma.cl (A.F.O.); katy.diaz@usm.cl (K.D.); Tel.: +56-32-2652843 (K.D.)

Resumen: En la actualidad, se están dedicando muchos esfuerzos a la obtención de extractos y/o aceites esenciales de Cannabis sativa L. con fines terapéuticos específicos o composiciones farmacológicas. Estas potenciales aplicaciones dependen principalmente de la composición fitoquímica de los aceites, que a su vez vienen determinadas por el tipo de *C. sativa* y el método de extracción utilizado para la obtención de los aceites. En este trabajo, hemos evaluado el contenido de metabolitos secundarios, delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), y cannabidiol (CBD), además del contenido fenólico total, flavonoides y antraquinonas en aceites obtenidos mediante extracción sólido-líquido (SLE) y extracción con fluido supercrítico (SCF). Se eligieron distintas variedades de *C. sativa* en función de la relación entre las concentraciones de THC y CBD. Además, se evaluaron in vitro las actividades antioxidantes, antifúngica y anticancerígena en diferentes líneas celulares de cáncer.

Los resultados indican que los aceites extraídos por SLE, con altos contenidos de CBD, flavonoides y compuestos fenólicos, presentan una elevada capacidad antioxidante e inducen una alta disminución de la viabilidad celular de la línea celular de cáncer de mama ensayada (MCF-7). Las actividades biológicas observadas se atribuyen al efecto séquito, en el que el CBD, los fenoles y los flavonoides desempeñan un papel clave. Por lo tanto, se concluye que la selección correcta de la variedad de *C. sativa* y el disolvente para el método de extracción SLE podrían utilizarse para obtener la composición óptima del aceite para desarrollar un agente anticancerígeno natural.

Palabras clave: marihuana; cannabinoides; efecto citotóxico; aceites medicinales



Citación: Pino, S.; Espinoza, L.; Jara-Gutiérrez, C.; Villena, J.; Olea, A.F.; Díaz, K. Study of Cannabis Oils Obtained from Three Varieties of *C. sativa* and by Two Different Extraction Methods: Phytochemical Characterization and Biological Activities. *Plants* **2023**, *12*, 1772. <https://doi.org/10.3390/plants12091772>

Academic Editors: Rino Ragno and Mijat Božovic

Received: 14 April 2023

Revised: 21 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 26 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introducción

Cannabis sativa L. (Cannabaceae), se ha cultivado ampliamente debido a su potencial industrial [1,2], Ornamental [3], Nutricional [4,5], medicinal [6,7] y recreativo [7]. Desde el punto de vista normativo y de aplicación, las plantas de cannabis se clasifican en función del nivel de Δ -9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC o simplemente THC), uno de los fitocannabinoides más importantes [8-10]. Por lo general, las plantas se clasifican y regulan como cáñamo industrial teniendo en cuenta el contenido de THC en la flor seca. La legislación de la UE ha establecido un umbral de THC del 0,2% ((CE) n° 2860/2000) para diferenciar el cáñamo fibra del Cannabis tipo droga [11]. Así, en los últimos años, cada vez más países están regulando su uso recreativo y medicinal [12-14].

La fitoquímica de *C. sativa* L. se ha estudiado ampliamente y se han identificado cerca de 500 compuestos [9,15]. La mayoría de ellos son metabolitos secundarios, y la clase más específica de componentes del cannabis son los cannabinoides terpenofenólicos C21. De ellos, el THC, responsable de los efectos psicotrópicos [16], y el cannabidiol

(CBD) son las formas predominantes de cannabinoides en las variedades de cannabis tipo droga y tipo fibra, respectivamente. Otros componentes fenólicos del cannabis incluyen flavonoides, espiroindanos, dihidroestilbenos, fenantrenos y dihidrofenantrenos [15,17-21]. La concentración de estos compuestos depende de muchos factores, como la variedad de la planta, las condiciones de crecimiento y el momento de la cosecha. Dado que estos compuestos son metabolitos secundarios, factores externos como las condiciones climáticas, el origen geográfico, el momento de la cosecha y el procedimiento de extracción pueden afectar significativamente a su contenido y a la calidad del extracto en *C. sativa* L. [22], y la distribución de estas moléculas dentro de la planta puede variar la composición final [23]. Sin embargo, *C. sativa* es una especie única, y se han desarrollado cientos de cultivares para aumentar o disminuir el contenido de THC [24]. Ha habido algunos intentos de clasificar los cultivares basándose en la composición química [19,25-27], y se han atribuido diferentes efectos del cannabis a distintos valores de la proporción de THC/CBD [28].

Tanto los extractos como los compuestos aislados de diferentes partes de la planta de cannabis han mostrado efectos antifúngicos, antibacterianos, antioxidantes, antipalúdicos, antileishmaniales, citotóxicos y farmacológicos [18,29-31]. Numerosos estudios han determinado el efecto de Δ^9 -THC y CBD como anticonvulsivos, analgésicos, ansiolíticos y antieméticos [32]. Ambos cannabinoides son metabolizados en el hígado por el citocromo P450 [32,33]. En

la última década, los defensores del cannabis medicinal han demostrado su potencial para el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer [34,35]. Se sabe que los cannabinoides tienen efectos paliativos en pacientes con cáncer [10], ayudando a reducir las sensaciones de náuseas, dolor y vómitos inducidos por la quimioterapia, así como ayudando con el insomnio y el apetito [36]. Curiosamente, los cannabinoides han demostrado inhibir selectivamente el crecimiento *in vitro* de líneas celulares de cáncer y de tumores *in vivo* en modelos animales [37].

En las últimas décadas, la investigación sobre la actividad biológica de *C. sativa* se ha centrado en extractos o aceites de toda la planta (espectro completo), en los que están presentes mezclas de cannabinoides y terpenos naturales [38]. Este enfoque se ha utilizado para obtener mezclas complejas de compuestos o aceites esenciales de plantas aromáticas [39-41], y se ha demostrado que sus actividades biológicas dependen de la concentración relativa de sus componentes [42]. De forma similar, se ha comprobado que los aceites de cannabis presentan mayor actividad que los compuestos aislados, y este efecto sinérgico se conoce como efecto séquito [34,43]. Por lo tanto, el desarrollo de aplicaciones farmacológicas y biotecnológicas basadas en propiedades antioxidantes y antimicobacterianas dependerá en gran medida del procedimiento de extracción [2], que puede modificar significativamente la composición relativa de los aceites obtenidos de *C. sativa* L. [22].

Actualmente, la extracción sólido-líquido (SLE) con disolventes orgánicos es el método más utilizado para aplicaciones médicas del cannabis [4,44-46]. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la extracción con fluidos supercríticos (SCF), que evita el uso de disolventes orgánicos potencialmente tóxicos, produce extractos y rendimientos de mayor calidad en tiempos de operación más cortos [4,46-48].

Por ello, en este estudio se han utilizado estos dos métodos de extracción para obtener aceites de cannabis a partir de diferentes variedades vegetales de inflorescencia de *C. sativa* L. Los aceites obtenidos se sometieron a un estudio fitoquímico para cuantificar la presencia de metabolitos secundarios, incluyendo Δ^9 -THC y CBD, y el contenido total de fenoles, flavonoides y antraquinonas. A continuación, se evaluaron varias actividades biológicas importantes de estos aceites, como la capacidad antioxidante, la actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes* y la citotoxicidad *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer, es decir, el cáncer de colon HT-29, el cáncer de mama MCF-7 y el cáncer de próstata humano PC-3. Se discuten las posibles correlaciones entre los datos fitoquímicos y las actividades biológicas.

2. Resultados y Debate

En este trabajo se utilizaron tres variedades vegetales de *C. sativa* L. que, según el proveedor, dan diferentes proporciones de Δ^9 -THC/CBD en las inflorescencias de la planta. Se trata de Critical+, Shark Shock CBD y Dinamed CBD con proporciones THC/CBD iguales a 1:0, 1:1 y 0:1, respectivamente. Las semillas se cultivaron en condiciones controladas (véase Material y métodos) y tras la cosecha de la inflorescencia del cannabis, el material vegetal se extrajo mediante SLE utilizando etanol [49], o SCF utilizando CO₂ supercrítico (SC-CO₂). Esta última es una técnica verde, y se utiliza ampliamente para obtener compuestos bioactivos a gran escala [23,45,50,51]. De esta manera, se obtuvieron seis aceites esenciales de cannabis con rendimientos similares para todas las variedades y ambos métodos de extracción (10–13 wt%) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Tabla 1. Cuantificación de cannabinoides (Δ^9 -THC y CBD) mediante HPLC-UV en aceites de inflorescencias recogidos de diferentes variedades de *C. sativa* L. Métodos de extracción: A: SC- CO₂; B: SLE..

Variety <i>C. sativa</i> L.	Oil Sample	Extraction Method	Extraction Yield (wt %)	THC (mg/g Oil)	CBD (mg/g Oil)	Ratio THC/CBD
Critical+	M1	A	10.7	677 ± 50	<1.5	1:0.002
	M2	B	11.4	612 ± 24	32 ± 2.0	1:0.05
Shark Shock CBD	M3	A	12.2	255 ± 8.0	352 ± 7.0	0.72:1.0
	M4	B	13.1	254 ± 2.0	439 ± 3.0	0.58:1.0
Dinamed CBD	M5	A	9.6	22 ± 2.0	508 ± 23.0	0.04:1.0
	M6	B	11.2	6.5 ± 0.4	89 ± 4.0	0.07:1.0

2.1.1. Análisis cromatográfico de aceites esenciales mediante HPLC-UV

La separación y cuantificación de los principales cannabinoides, Δ^9 -THC y CBD, en extractos de inflorescencia vegetal se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopia ultravioleta (HPLC-UV) y utilizando una columna Chromolith RP-18 [52–55] (Tabla 1; Material suplementario Figura S1).

Los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que para las variedades Critical+ y Shark Shock CBD (proporciones 1:0 y 1:1, respectivamente) la extracción con SC-CO₂ da cantidades ligeramente superiores o similares de THC, mientras que el contenido de CBD es superior para el método SLE. Por otra parte, en el caso de los extractos obtenidos a partir de la variedad Dinamed CBD (proporción 0:1), tanto el contenido de THC como el de CBD fueron mucho mayores para la extracción con SC-CO₂. Este resultado está en consonancia con trabajos anteriores en los que se ha demostrado que la extracción SC-CO₂ conduce a mayores rendimientos de CBD [44,56,57]. Sin embargo, las proporciones THC/CBD medidas son muy similares a las dadas por el proveedor, exceptuando Shark Shock CBD cuya proporción debería ser 1:1 y para ambos métodos de extracción la cantidad relativa de CBD es mayor que la de THC (proporciones 0,72:1,0 y 0,58:1,0). Se trata de un resultado interesante porque se han descrito diversas actividades farmacológicas del CBD [57] y, por lo tanto, estos extractos son buenos candidatos para explorar posibles aplicaciones médicas. Teniendo en cuenta que todas las variedades de *C. sativa* se cultivaron en las mismas condiciones, está claro que las diferencias en las cantidades detectadas de cannabinoides se deben a los procedimientos de extracción utilizados. Esta conclusión concuerda con informes anteriores en los que se ha propuesto que las diferencias en el contenido de cannabinoides pueden atribuirse a la extracción preferencial en lugar de las condiciones agrotécnicas [52]. Para variedades con un contenido similar de estos compuestos (proporción 1:1) cualquiera de estos métodos ensayados dará resultados similares.

Cabe destacar que el método de extracción elegido depende de las propiedades deseadas del aceite de cannabis.

2.1.2. Evaluación del contenido total de fenoles, flavonoides y antraquinonas

Se ha propuesto que el efecto séquito se debe principalmente a la interacción entre los cannabinoides y una miríada de compuestos diferentes existentes en los aceites de cannabis, como terpenos, flavonoides y compuestos fenólicos [28,43]. Está bien establecido que, en muchos casos, la actividad farmacológica del THC o el CBD puros es inferior a la exhibida por los extractos de cannabis porque muchos de los componentes menores tienen su propia actividad farmacológica [43]. Por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos fenólicos son responsables de las propiedades antioxidantes de los extractos de *C. sativa* [58] y que algunos flavonoides presentan actividades anticancerígenas [59]. Por lo tanto, para comparar las actividades biológicas de los extractos obtenidos de diferentes variedades de *C. sativa* L., se determinó el contenido total de fenoles, flavonoides y antraquinonas mediante métodos colorimétricos (ver Material y Métodos). Brevemente, la concentración de fenoles, flavonoides y antraquinonas se obtuvo mediante mediciones espectrofotométricas utilizando las curvas de calibración de absorbancia del ácido gálico, la quercetina y la emodina, respectivamente. Los resultados del cuadro 2 se indican como equivalentes de estos patrones (mg/g de aceite seco).

Tabla 2. T Contenido total de fenoles, flavonoides y antraquinonas en los aceites esenciales extraídos por los métodos SC-CO₂ (A) y SLE (B) de inflorescencias femeninas recolectadas de diferentes variedades de *C. sativa* L. Las concentraciones se expresan como equivalentes (mg/g de aceite seco) de ácido gálico (GA). Las concentraciones se expresan como equivalentes (mg/g de aceite seco) de ácido gálico (GAE), quercetina (QE) y emodina (EE).

Muestra	Método de extracción	Fenoles totales (GAE mg/g)	Flavonoides totales (QE mg/g)	Antraquinonas totales (EE mg/g)
M1	A	90.16 ± 6.80 ^a	3.63 ± 0.09 ^a	5.00 ± 0.05 ^a
M2	B	102.07 ± 1.70 ^a	6.32 ± 0.21 ^b	5.38 ± 0.03 ^b
M3	A	91.86 ± 1.70 ^a	5.23 ± 0.06 ^c	6.19 ± 0.03 ^c
M4	B	91.86 ± 3.40 ^a	8.19 ± 0.06 ^d	6.05 ± 0.03 ^d
M5	A	57.84 ± 3.40 ^b	3.96 ± 0.24 ^e	5.35 ± 0.03 ^e
M6	B	78.26 ± 3.40 ^b	9.10 ± 0.06 ^f	6.32 ± 0.03 ^f

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. $p < 0,05$; $n = 3$.

Los datos de la Tabla 2 indican que el contenido total de compuestos fenólicos es independiente del método de extracción, pero es ligeramente superior en los aceites obtenidos de Critical+ (M1 y M2) y Shark Shock CBD (M3 y M4) que en los aceites de Dinamed CBD (M5 y M6). En otras palabras, las mayores cantidades de compuestos fenólicos se encuentran en las variedades de *C. sativa* con mayor contenido en Δ^9 -THC (proporciones 1:0 y 1:1). Por lo tanto, se podría sugerir que la formación de compuestos fenólicos y Δ^9 -THC están relacionados de alguna manera. Por otro lado, el contenido total de flavonoides varía con el método de extracción; es decir, el método SLE da valores de concentración del orden de 6,32-9,10 QE mg/g (M2, M4 y M6) que casi duplican los valores encontrados para SC-CO₂ (M1, M3 y M5). Es sabido que en el método SLE la composición del extracto dependerá de la polaridad del disolvente utilizado. En este caso, el etanol es más polar que el CO₂, y, por lo tanto, la extracción de flavonoides polares es mayor en el método SLE. Por último, el contenido de antraquinonas (del orden de 5,00 a 6,19 EE mg/g) es independiente del método de extracción y de la variedad de *C. sativa* L.

Por lo tanto, las muestras extraídas por el método SLE (M2, M4 y M6) contienen la mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides. Además, M4 (relación THC: CBD 0,58) es una de las muestras con mayor contenido de THC y CBD

2.2. Evaluación de las actividades biológicas

2.2.1. Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es un término utilizado en los sistemas biológicos para describir la acción protectora de los compuestos frente a la degradación oxidativa inducida por las especies reactivas del oxígeno (ROS). El mecanismo de acción incluye una variedad de procesos diferentes y, por lo tanto, ningún ensayo puede medir por sí solo la capacidad antioxidante de todos los antioxidantes en un sistema complejo. Los distintos métodos que se han desarrollado pueden clasificarse según dos mecanismos principales: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de electrones individuales (SET). En los métodos HAT, el radical se desactiva por la donación de átomos de hidrógeno del compuesto antioxidante, mientras que, en los métodos SET, el radical se desactiva por la transferencia de un electrón del antioxidante. Así, la capacidad antioxidante de todos los aceites extraídos se evaluó mediante tres ensayos comunes: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS), y el poder antioxidante reductor férrico (FRAP). Los resultados obtenidos para todas las muestras de aceite de cannabis se enumeran en la Tabla 3 y se expresan en diferentes unidades en función del método utilizado: IC₅₀ (mg/mL) para DPPH; mM de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) para ABTS y FRAP.

Tabla 3. Capacidad antioxidante de los aceites esenciales extraídos por los métodos SLE y SC-CO₂ de inflorescencias femeninas recogidas de diferentes variedades de *C. sativa* L. En la última columna se enumeran los valores de EC₅₀ para la actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes*.

Muestra de aceite	DPPH (IC ₅₀ mg/mL)	ABTS (TEAC mM)	FRAP (TEAC mM)	Prueba Antifúngica EC ₅₀ (µg/mL)
M1	12.18 ± 0.19 ^a	0.56 ± 0.09 ^a	0.0120 ± 0.0003 ^a	>240
M2	14.34 ± 0.38 ^b	0.75 ± 0.02 ^b	0.0209 ± 0.0007 ^a	212.53 ± 2.27 ^c
M3	14.68 ± 0.28 ^b	0.71 ± 0.01 ^b	0.0173 ± 0.0002 ^a	>240
M4	12.80 ± 0.06 ^a	0.81 ± 0.02 ^b	0.0271 ± 0.0002 ^a	89.37 ± 2.77 ^a
M5	18.38 ± 0.42 ^c	0.61 ± 0.03 ^c	0.0131 ± 0.0007 ^b	123.10 ± 3.03 ^b
M6	13.28 ± 0.51 ^b	0.72 ± 0.03 ^b	0.0301 ± 0.0002 ^a	161.56 ± 2.19 ^b
Gallic Acid	n.a.	1.14 ± 0.01 ^d	1.73 ± 0.026 ^c	n.a.
BHT	0.06 ± 0.00 ^d	1.06 ± 0.03 ^d	1.53 ± 0.08 ^d	n.a.
TROLOX®	0.11 ± 0.00 ^e	1.0	n.a.	n.a.
Fluconazole®	n.a.	n.a.	n.a.	220 ± 1.23 ^c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. $p < 0,05$; $n = 3$; n.a: no aplicable.

Los resultados muestran que, en la prueba ABTS, el extracto M4 registra un valor medio significativo cercano a la unidad. En esta prueba, el catión radical ^{ABTS+} reacciona con compuestos fenólicos por transferencia de átomos de H, y la cantidad consumida se expresa en equivalentes de Trolox (TEAC). Se ha demostrado que TEAC para Trolox es igual a 1 [60] y, por lo tanto, los valores TEAC obtenidos para los aceites de cannabis M2-M6 sugieren que su capacidad antioxidante se debe principalmente al mecanismo HAT. Estos procesos de transferencia de H implican generalmente a flavonoides y compuestos fenólicos.

Esta conclusión se ve respaldada por los resultados obtenidos con el ensayo FRAP, que indican que todos los diferentes aceites de cannabis no muestran actividad antioxidante por transferencia de electrones en comparación con las sustancias de control positivas. El ensayo FRAP no puede detectar compuestos que eliminan radicales mediante la transferencia de H.

Por último, la capacidad antioxidante determinada por el ensayo DPPH se mide por la concentración necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%. Los datos se calculan como concentración inhibitoria media (CI₅₀), lo que significa que los valores más bajos de CI₅₀ corresponden a la mayor capacidad antioxidante. Así, los valores de la Tabla 3 indican que los extractos más activos son M1 y M4.

Cabe destacar que estos tres métodos determinan la capacidad antioxidante mediante reacciones indirectas; es decir, miden la capacidad de reaccionar con el catión radical ABTS, el radical DPPH o el Fe (III) reductor. En consecuencia, existen muchas interferencias que pueden afectar a los resultados, y esto se ha discutido ampliamente en otros trabajos [60,61]. Sin embargo, en este trabajo se han utilizado estos métodos para comparar la capacidad antioxidante de una serie de aceites de cannabis en las mismas condiciones experimentales. Así, las diferencias encontradas en la capacidad antioxidante pueden atribuirse exclusivamente a la composición fitoquímica de estos aceites. Es interesante observar que las muestras con diferentes concentraciones de los principales cannabinoides presentan una actividad antioxidante similar. Por lo tanto, se puede concluir que esta propiedad es consecuencia de la acción de muchos compuestos diferentes, es decir, flavonoides y compuestos fenólicos. Así pues, la capacidad antioxidante puede explicarse como el resultado de un efecto sinérgico entre el THC, el CBD y los metabolitos de tipo fenólico presentes en estos aceites de cannabis [62]. Estos resultados están en consonancia con trabajos anteriores en los que se han notificado diferencias importantes en estos efectos para *Cannabis* con diversas proporciones de THC/CBD [28].

2.2.2. Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de M1-M6 se probó contra *Trichophyton mentagrophytes*, que es un hongo patógeno antropofílico que causa la tinea capitis de los pies y el cuerpo e invade la superficie de las uñas tanto de humanos como de animales [63,64]. Los resultados muestran que los valores de la CE_{50} para los aceites de cannabis están en el rango de 89-240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (véase la última columna en Tabla 3). Los valores más bajos de CE_{50} se obtuvieron para las muestras extraídas por el método SEL, y M4 destaca con la mayor actividad antifúngica ($CE_{50} = 89,4 \mu\text{g}/\text{mL}$). Esto podría atribuirse a que M4 tiene las mayores concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides obtenidos por extracción con etanol (véase la Tabla 2). Curiosamente, una comparación de las actividades antifúngicas entre las muestras 4 y 5 muestra que una disminución de diez veces en THC, pero pequeños cambios en el contenido total de fenólicos y flavonoides (Muestra 5) inducen un pequeño cambio en la CE_{50} . Estos resultados sugieren que la actividad antifúngica de los aceites de cannabis se debe a la acción de varios compuestos diferentes. Esto coincide con un estudio en el que doce dermatofitos fueron tratados con extractos de etanol de dos cepas diferentes de cannabis [65]. Por último, los valores de EC_{50} de M4-M6 son inferiores a los mostrados por el fluconazol, un agente antifúngico comercial. Así pues, los aceites esenciales surgen como alternativas terapéuticas para la dermatofitosis y probablemente otros tipos de infecciones fúngicas.

2.2.3. Evaluación de la citotoxicidad in vitro contra diferentes líneas celulares cancerosas

La citotoxicidad de los aceites de cannabis (M1-M6) se evaluó in vitro contra diferentes líneas celulares de cáncer: Cáncer de colon HT-29, cáncer de mama MCF-7 y cáncer de próstata humano PC-3. Para evaluar su toxicidad contra células normales, se utilizó como control una célula no tumoral, MCF-10A. Se utilizó el ensayo colorimétrico de sulforhodamina B (SRB) para estimar la viabilidad celular de las líneas celulares cancerosas en presencia de diferentes concentraciones de aceite de cannabis (de 15 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A partir de un gráfico del porcentaje de viabilidad celular en función de las concentraciones de aceite esencial de cannabis, se obtuvieron los valores de IC_{50} ajustando los datos a una ecuación dosis-respuesta. Las curvas obtenidas para las muestras más activas (M2, M4 y M6) se muestran en la Figura S2 del Material suplementario, y todos los valores de IC_{50} se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto citotóxico (IC₅₀ µg/mL) e índice de selectividad (SI) de los aceites de *C. sativa* frente a diferentes líneas celulares de cáncer.

Extracto	IC ₅₀ (µg/mL)				SI		
	MCF-10	MCF-7	HT-29	PC-3	MCF-7	HT-29	PC-3
M1	61.2 ± 21.5	60.2 ± 16.9	62.6 ± 1.3	64.2 ± 0.7	1	1	1
M2	70.3 ± 4.1	18.0 ± 1.5	17.7 ± 1.4	21.0 ± 1.0	4	4	3
M3	30.9 ± 8.1	26.7 ± 1.0	37.2 ± 2.2	43.2 ± 0.9	1	1	1
M4	60.4 ± 25.3	13.0 ± 0.9	18.4 ± 1.0	21.9 ± 0.4	5	3	3
M5	61.8 ± 1.4	36.8 ± 1.5	47.8 ± 2.5	59.9 ± 15.2	2	1	1
M6	35.7 ± 6.2	15.4 ± 0.8	19.6 ± 0.9	22.5 ± 0.6	2	2	2

Por otra parte, el índice de selectividad (IS), que da la selectividad de los extractos que actúan sobre las células cancerosas con respecto a su efecto sobre una línea celular normal, puede calcularse como la relación entre el valor IC₅₀ obtenido para la línea celular de control, MCF-10A, y los valores IC₅₀ calculados para las líneas celulares tumorales (MCF-7, HT-20 y PC-3). Si este número es superior a 2, significa que la citotoxicidad del aceite es altamente selectiva; es decir, el efecto del aceite sobre las células tumorales es mayor que sobre las células normales. Estos valores SI también figuran en la Tabla 3.

Los datos indican que los valores de IC₅₀ de los aceites de cannabis oscilan entre 13,0 y 64,2 µg/mL para las líneas celulares cancerosas y que M2, M4 y M6 presentan la mayor citotoxicidad (el valor de IC₅₀ más bajo). Al mismo tiempo, el índice SI correspondiente de los aceites de cannabis más activos se sitúa entre 2 y 5. Por ejemplo, el aceite de cannabis M4 presentó el valor IC₅₀ más bajo (13 µg/mL) y el valor SI más alto en el ensayo de citotoxicidad en la línea celular del cáncer de mama, MCF-7. En otras palabras, el M4 es el extracto más citotóxico y selectivo que actúa sobre esta línea celular. Además, las muestras M2, M4 y M6 también presentan una importante actividad citotóxica y selectiva sobre todas las líneas celulares de cáncer. Se ha informado de la acción selectiva de los cannabinoides sobre las células tumorales, pero el mecanismo sigue sin estar claro [37]. Así, se puede concluir que los aceites de cannabis obtenidos por el método de extracción LSE (M2, M4 y M6) presentan una mayor citotoxicidad sobre las líneas celulares de cáncer de mama, colon y próstata que los obtenidos por el método SCF. Estas sorprendentes diferencias en la citotoxicidad pueden explicarse en términos de la química composición de los aceites obtenidos por extracción LSE o SCF. Los datos de las Tablas 1-3 indican que los aceites obtenidos a partir de la misma variedad vegetal, pero utilizando métodos de extracción diferentes, dan lugar a una composición fitoquímica completamente distinta.

Así, las cantidades de THC detectadas son similares en ambos extractos (Tabla 1); sin embargo, al mismo tiempo, las concentraciones de CBD y flavonoides son mayores en los extractos de LSE (Tablas 1 y 2). Estos resultados sugieren que el efecto citotóxico de los aceites de cannabis se debe principalmente a la presencia de CBD, flavonoides y probablemente otros compuestos fenólicos, que actúan conjuntamente a través del efecto séquito. Estudios anteriores han demostrado que el CBD induce la muerte celular en líneas celulares de cáncer de mama [66-69] y de pulmón [70], mientras que su molécula madre, el ácido cannabidiólico CBD-A, inhibe la migración celular del cáncer de mama a través de un mecanismo que inhibe la proteína quinasa [71]. También se ha demostrado que algunos flavonoides comunes, como la quercetina y la luteolina, reducen la proliferación celular de MCF-7 [59,72], y otros flavonoides específicos de *C. sativa*, las canflavinas, muestran también actividades anticancerígenas [62]. Las canflavinas preniladas han mostrado actividad anticancerígena in vitro en líneas celulares de cáncer de mama humano [73] e in vivo contra tumores pancreáticos en animales [74].

Por lo tanto, se puede concluir que la composición de los aceites de cannabis extraídos mediante el método SLE se puede modular para obtener una mezcla de CBD y flavonoides con el efecto séquito óptimo para crear un efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materia vegetal y condiciones de cultivo

Las variedades vegetales de *C. sativa* L. seleccionadas para este experimento proceden del banco de semillas Dinafem Seeds (Gipuzkoa, España), con ejemplares cultivados a partir de esquejes para mantener la estabilidad genética: Critical+ con ratio 1:0 (inflorescencias con alto contenido en Δ^9 -THCA), Shark Shock CBD con ratio 1:1 (inflorescencias con contenido equilibrado tanto de CBD-A como de Δ^9 -THCA), y Dinamed CBD con ratio 0:1 (inflorescencias con alto contenido en CBD-A).

Todas las variedades de *C. sativa* L. se cultivaron en interior utilizando las instalaciones de investigación de la empresa LABSUN (Valparaíso, Chile) y bajo las mismas condiciones ambientales. Brevemente, en dos parcelas de 80cm², bajo techo, se colocaron cuatro plantas cada una en macetas de 11 L con sustrato biobizz® (ALLMIX), junto con un sistema de iluminación de panel LED de 300 w y una lámpara tradicional de alta presión de 250 w. Se utilizó la línea de nutrientes BIOBIZZ para el crecimiento durante el primer mes (BIOGROW, ALGA-MIC). A continuación, se utilizaron BIO-BLOOM, BIO-HEAVEN y TOP-MAX para la floración durante tres meses. Se analizó la electroconductividad del agua de riego (rangos de 600 a 2000 μ S (0,6~2,0 EC) y pH (5,8-6,8)). De cada temporada de cultivo se obtuvieron 100 g de inflorescencias secas durante el mes de agosto.

3.2. Extracción

Se obtuvieron seis aceites de cannabis utilizando dos métodos de extracción, a saber, extracción sólido-líquido utilizando etanol al 96% [49] y extracción por SCFE utilizando CO₂ supercrítico (SC-CO₂). En el primer método, 100 g de inflorescencias se precalentaron en un horno a 120 °C durante 30 min para descarboxilar los cannabinoides ácidos THCA y CBDA [49,75]. A continuación, se trituró el material vegetal y se añadieron 500 mL de etanol. La mezcla se agitó durante 3 min y se filtró, y el disolvente se evaporó a presión reducida [76]. La extracción con fluido supercrítico se realizó utilizando un extractor SuperC (OCO Labs, Sierra Vista, AZ, USA). Brevemente, el caudal de CO₂ fue de 1,5 lb/h y el proceso de extracción se llevó a cabo a 250 bar a 63°C durante 1 h.

3.3. Estudio fitoquímico

3.3.1. Análisis HPLC

Para separar y cuantificar los cannabinoides THC y CBD se utilizó un HPLC Young YL 9110 Plus acoplado a un detector de matriz de diodos. La separación se realizó con una matriz de dos columnas en serie (Chromolith RP-18e, Merck). Se utilizaron mezclas de agua (A)/acetonitrilo (B) como fase móvil a un caudal de 2 mL/min. La separación se obtuvo con el siguiente gradiente: 0-3 min 20% B; 3-10 min 60% B; 10-11 min 95% B. El volumen de inyección fue de 20 μ L, y la detección se fijó a 211 nm [53,55].

3.3.2. Determinación contenido fenólico total

El contenido fenólico total de los extractos se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu [77-79]. Los extractos de cannabis (2,0 mg) se disolvieron en etanol (2,0 mL), y 500 µL de cada solución se mezclaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu (2,5 mL, 0,2 N) y se incubaron durante 5 min. A continuación, se añadió una solución de Na₂ CO₃ (2,0 mL, 7,5% *p/v*) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h. Se midió la absorbancia de la solución a 700 nm frente al etanol en un espectrofotómetro (RayLEIGH, UV-2601, Pekín, China). Los valores de absorbancia se convirtieron en concentración utilizando una curva de calibración de ácido gálico (0-200 mg/L) y, por tanto, el contenido fenólico total se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (mg GAE) por g de extracto seco. Todas las mediciones se repitieron tres veces

3.3.3. Estimación del contenido total de flavonoides

Para determinar el contenido total de flavonoides se utilizó una versión modificada del método de Dowd [80]. Se mezcló tricloruro de aluminio (AlCl₃) en etanol (1 mL, 2% *p/v*) con una disolución de cada extracto en etanol (1,0 mg/mL). La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 415 nm frente a una muestra en blanco consistente en 1,0 mL de disolución de extracto con 1,0 mL de metanol sin AlCl₃. Los valores de absorbancia se convirtieron en concentración utilizando una curva de calibración de quercetina (0-100 mg/L). El contenido total de flavonoides se expresó como mg de equivalentes de quercetina (mg QE) por g de extracto seco. Todas las mediciones se repitieron tres veces.

3.3.4. Estimación del contenido total de antraquinonas

El contenido de antraquinonas se determinó mediante el siguiente protocolo [79,80]. Se mezcló tricloruro de aluminio (AlCl₃) en etanol (1 mL, 2% *p/v*) con una disolución de cada extracto en etanol (1,0 mg/mL). La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 486 nm frente a una muestra en blanco consistente en 1,0 mL de disolución de extracto con 1,0 mL de metanol sin AlCl₃. Los valores de absorbancia se convirtieron en concentración utilizando una curva de calibración de emodina (0-70 mg/L). El contenido total de antraquinonas se expresó como mg de equivalentes de emodina (mg EE) por g de extracto seco. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.4. Evaluación de las actividades biológicas

3.4.1. Medición de la capacidad antioxidante

Ensayo ABTS

Se han propuesto varias modificaciones del método original [81]; en este trabajo, hemos utilizado el método desarrollado por Romay et al. [82]. Brevemente, un volumen de una solución 10 mM de ABAP (2,2'-azo-bis (2-amidino propano) se mezcló con el mismo volumen de una solución 150 µM de ABTS (ácido 2,2'-azinobi (3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) utilizando PBS 100 mM a un pH de 7,4 (solución TRAP). La mezcla se incubó a 45°C durante 30 min y luego se enfrió a temperatura ambiente. La solución de muestra (10 µL, 1,0 mg/mL de cada extracto) se mezcló con la solución TRAP (990 µL), y la absorbancia del catión radical ABTS se midió después de 50s a 734 nm frente a la solución ABTS utilizada como referencia. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva estándar de Trolox (0-200 mg/L), y los resultados se expresaron en mM de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (mM TEAC). Todas las mediciones se repitieron tres veces.

Ensayo DPPH

La capacidad de barrido de radicales libres de los aceites se determinó siguiendo el método propuesto por Brand-Williams y modificado por Miliauskas [83,84]. Las muestras de aceites (M1-M6) se disolvieron en etanol (0-10 mg/mL), y 100 µL de cada solución y se mezclaron con solución de DPPH (2,9 mL, 50 µM) recién preparada en etanol. Una mezcla preparada con 100 µL de etanol se utilizó como control. Las muestras y las soluciones de control se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, y la absorbancia de los radicales DPPH se midió a 517 nm. La actividad de eliminación de radicales se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%DPPH \text{ radical scavenging} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100 \quad (1)$$

donde A_c y A_s son las absorbancias del control y de los aceites, respectivamente. El trazado de los datos obtenidos frente a la concentración de aceite de cannabis y el ajuste de estos datos a la ecuación dosis-respuesta proporcionan los valores de IC_{50} que se enumeran en la Tabla 4.

Ensayo del poder antioxidante férrico reductor (FRAP)

El ensayo FRAP se realizó siguiendo el siguiente protocolo [38]. El reactivo TPTZ recién preparado (10 volúmenes de tampón acetato 300 mM, pH 3,6) con 1,0 volumen de 10 mM TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) en ácido clorhídrico 40 mM, y 1,0 volumen de reactivo FRAP de cloruro férrico 20 mM (3,0 mL) se mezcló con agua desionizada (300 µL) y la muestra (100 µL, 1,0 mg/mL de cada extracto). La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C en un baño de agua, y se midió la absorbancia a 593 nm utilizando etanol como solución de referencia. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva de calibración de Trolox (0-200 mg/L), y los resultados se expresaron en mM de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (mM TEAC). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.4.2. Ensayos Antifúngicos

Las pruebas se realizaron con *Trichophyton mentagrophytes* (CCCT 18.262), hongo capaz de producir dermatofitosis o tiñas. El aislado se obtuvo de la "Colección Chilena de Cultivos Tipo" de la Universidad de la Frontera (CCCT-UFRO/BIOREN) y se cultivó en agar papa dextrosa (PDA) durante dos semanas a 28°C para obtener el inóculo. El cultivo puro se almacenó en la colección de patógenos del Laboratorio de Ensayos Biológicos del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María.

La actividad antifúngica de todos los aceites esenciales se evaluó determinando la inhibición del crecimiento micelial de *T. mentagrophytes* en la prueba de crecimiento radial [85].

Todos los aceites de cannabis ensayados se disolvieron en etanol y agua y se añadieron a agar papa dextrosa (PDA) a 50°C, alcanzando concentraciones finales que oscilaban entre 1 y 240 µg/mL. Tras la solidificación, se inocularon placas de Petri con discos de agar de 4 mm de diámetro que contenían micelio fino de *T. mentagrophytes*. El control negativo contenía únicamente medio de cultivo PDA, y como control positivo se utilizó Fluconazole® (IPhSA, INTHERFARMA S.A). Se hicieron tres réplicas para cada tratamiento. Todas las placas se incubaron a 28°C en la oscuridad. Después de 7 días, se midió el diámetro del crecimiento micelial y se calculó el porcentaje de inhibición micelial (%I). Estos valores se trazaron frente a la concentración de fungicida y se ajustaron a una ecuación dosis-respuesta. Este ajuste da la concentración a la que el crecimiento del micelio se inhibe en un 50% en comparación con el control negativo (EC_{50}). El trazado de los datos, el ajuste y el cálculo de los valores de EC_{50} se realizaron con Origin 8.0. Las diferencias significativas se evaluaron con un análisis de varianza de dos vías (prueba de Tukey; $p < 0,05$).

3.4.3. Citotoxicidad de las células cancerosas

Líneas Celulares Cultivadas

Las siguientes líneas celulares experimentales se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE.UU.): MCF-7 (cáncer de mama humano; ATCC N.º HTB-22), HT-29 (cáncer de colon humano; ATCC N.º HTB-38), PC-3 (cáncer de próstata humano ATCC N.º CRL-1435) y MCF-10A (célula epitelial mamaria ATCC N.º CRL-10317). Todas las líneas celulares se cultivaron en un medio DMEM-F12 que contenía un 10% de FCS, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 1 mM de glutamina.

Detección de citotoxicidad in vitro mediante el ensayo de sulforodamina B

El ensayo con sulforodamina B se llevó a cabo según los métodos descritos anteriormente [86,87]. Las células se sembraron en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano de 100 µl con una densidad de siembra de 3 × 10³ células/pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37°C (bajo una atmósfera de dióxido de carbono humidificado al 5% para permitir la fijación celular), se prepararon soluciones madre de aceite de cannabis en etanol y se añadieron al medio de crecimiento para alcanzar concentraciones finales (5-100 µg/mL). Los controles negativos se prepararon añadiendo etanol, y la concentración final de este disolvente se mantuvo constante al 1%. Las células se trataron con diferentes concentraciones de extractos y se incubaron durante 72 h en las mismas condiciones. Todas las microplacas de cultivo se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ humidificado al 5% durante 72 h. Al final de la exposición al extracto, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 50% a 4°C. Después de lavar con agua destilada, las células se tiñeron con SRB al 0,1%, disuelto en ácido acético al 1% (50 µl/pocillo) durante 30 min, y después se lavaron con ácido acético al 1% para eliminar la tinción no unida. La tinción unida a proteínas se solubilizó con tris base sin tamponar (100 µl, 10 mM). La densidad celular se determinó utilizando un lector de microplacas de fluorescencia (longitud de onda 540 nm). Los datos obtenidos se expresaron como porcentajes de viabilidad de las células tratadas frente al control negativo, para el que la viabilidad se consideró del 100%. Todas las mediciones se repitieron tres veces. Por último, a partir de un gráfico del porcentaje de viabilidad frente a la concentración de aceite de cannabis, se obtuvieron los valores IC₅₀ ajustando los datos a curvas dosis-respuesta (Sigma Plot, Systat® Software, Inc). El índice de selectividad (IS) de cada extracto se calculó como la relación entre IC₅₀ (MCF-10A)/IC₅₀ (líneas celulares cancerosas). Si los valores de SI eran iguales o superiores a 2, se asumía que el extracto era selectivo.

4. Conclusiones

Se utilizaron diferentes variedades de *C. sativa* identificadas por la proporción de THC:CBD para extraer aceite de cannabis mediante dos métodos de extracción. La evaluación de las actividades biológicas de los aceites indica que están determinadas principalmente por su composición química. Por ejemplo, todos los aceites de Cannabis muestran una capacidad antioxidante y efectos antiproliferativos en las líneas celulares de cáncer ensayadas. En ambos tipos de experimentos, el aceite de Cannabis más activo probado fue el M4, lo que sugiere una relación directa entre su capacidad antioxidante y la citotoxicidad de las células cancerosas. Además, el M4 muestra una alta selectividad contra las líneas celulares de cáncer de mama y, por lo tanto, los aceites de Cannabis pueden considerarse potenciales agentes anticancerígenos. Este aceite se obtuvo por SLE, y contiene altas cantidades de THC y CBD y el mayor contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides. Así, sus mayores actividades biológicas pueden atribuirse al efecto séquito del CBD y sus compuestos flavonoides. El trabajo futuro se centrará en la selección de diferentes variedades de *C. sativa*, pero utilizando un quimiovar que proporcione información más específica sobre el contenido fenólico y de flavonoides, además de la relación THC/CBD.

La extracción de inflorescencias mediante el método SLE con un disolvente polar proporcionaría una forma de obtener aceites de Cannabis que podrían utilizarse en el desarrollo de agentes antifúngicos, antioxidantes y anticancerígenos.

Materiales Complementarios: Los siguientes están disponibles en línea en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants12091772/s1>. Figura S1: Cromatogramas de muestras de Cannabis sp. (M1-M6) analizadas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectroscopia ultravioleta (HPLC-UV). La cuantificación de THC y CBD en sus respectivos tiempos de retención de 8 y 10 min, respectivamente. Figura S2: Gráficos del porcentaje de viabilidad celular de MCF-7, una línea celular de cáncer de mama, en presencia de diferentes aceites esenciales de cannabis: (a) M2, (b) M4, (c) M6, y (d) líneas celulares MCF-10A (control) en presencia de M2.

Contribuciones de los autores: S.P., metodología, conceptualización, recursos, análisis formal, investigación y redacción-revisión y edición; L.E., recursos, análisis formal y redacción-revisión y edición; A.F.O., análisis formal y redacción-revisión y edición; C.J.-G., metodología, análisis formal, software, investigación y revisión; J.V., metodología, análisis formal, software, investigación y revisión; K.D., conceptualización, supervisión, metodología, investigación, análisis formal y redacción-revisión y edición. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada por el Laboratorio de Ensayos Biológicos y el Laboratorio de Síntesis Química del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Laboratorio de Investigación-Estrés Oxidativo, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, y Empresa LABSUN, Valparaíso, Chile.

Declaración de disponibilidad de datos: No procede.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Innovación y Emprendimiento de la Universidad Técnica Federico Santa María (DGIIE-UTFSM).

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Karche, T.; Singh, M. The application of hemp (*Cannabis sativa* L.) for a green economy: A review. *Turk. J. Bot.* **2019**, *43*, 710–723. [[CrossRef](#)]
- Fiorini, D.; Molle, A.; Nabissi, M.; Santini, G.; Benelli, G.; Maggi, F. Valorizing industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products: Cannabidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *128*, 581–589. [[CrossRef](#)]
- Hesami, M.; Pepe, M.; Baiton, A.; Salami, S.A.; Jones, A.M.P. New Insight into Ornamental Applications of Cannabis: Perspectives and Challenges. *Plants* **2022**, *11*, 2383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blake, A.; Nahtigal, I. The evolving landscape of cannabis edibles. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *28*, 25–31. [[CrossRef](#)]
- Krüger, M.; van Eeden, T.; Beswa, D. Cannabis sativa Cannabinoids as Functional Ingredients in Snack Foods—Historical and Developmental Aspects. *Plants* **2022**, *11*, 3330.
- Bridgeman, M.B.; Abazia, D.T. Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, and Implications for the Acute Care Setting. *Pharm. Ther.* **2017**, *42*, 180–188.
- Cáceres Guido, P.; Riva, N.; Calle, G.; Dell’Orso, M.; Gatto, M.; Sberna, N.; Schaiquevich, P. Medicinal cannabis in Latin America: History, current state of regulation, and the role of the pharmacist in a new clinical experience with cannabidiol oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2020**, *60*, 212–215. [[CrossRef](#)]
- Kovalchuk, I.; Pellino, M.; Rigault, P.; Velzen, R.; Ebersbach, J.; Ashnest, J.R.; Mau, M.; Schranz, M.E.; Alcorn, J.; Laprairie, R.B.; et al. The Genomics of Cannabis and Its Close Relatives. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2020**, *71*, 713–739. [[CrossRef](#)]
- ElSohly, M.A.; Slade, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* **2005**, *78*, 539–548. [[CrossRef](#)]
- Andre, C.M.; Hausman, J.-F.; Guerriero, G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 19. [[CrossRef](#)]
- Vantreese, V.L. Hemp Support. *J. Ind. Hemp* **2002**, *7*, 17–31. [[CrossRef](#)]
- Wu, R.P.; Hayashi, T.; Cottam, H.B.; Jin, G.; Yao, S.; Wu, C.C.; Rosenbach, M.D.; Corr, M.; Schwab, R.B.; Carson, D.A. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 7479–7484. [[CrossRef](#)]
- Lancet, T. Cannabinoids: Just like any other medication? *Lancet* **2018**, *392*, 188. [[CrossRef](#)]
- Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Pérez-Acevedo, A.P.; Hladun, O.; Torres-Moreno, M.C.; Muga, R.; Torrens, M.; Farré, M. Cannabinoids: From pot to lab. *Int. J. Med. Sci.* **2018**, *15*, 1286–1295. [[CrossRef](#)]
- ElSohly, M.A. Chemical Constituents of Cannabis. In *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential*; Grotenhermen, F., Russo, E., Eds.; Haworth Integrative Healing Press: New York, NY, USA, 2002; pp. 27–36.
- Mackie, K. Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 10–14. [[CrossRef](#)]
- Pate, D.W. *Taxonomy of Cannabinoids In Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential*; Grotenhermen, F., Russo, E., Eds.; Haworth Integrative Healing Press: New York, NY, USA, 2002; pp. 15–26.
- Radwan, M.M.; Elsohly, M.A.; Slade, D.; Ahmed, S.A.; Khan, I.A.; Ross, S.A. Biologically active cannabinoids from high-potency Cannabis sativa. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 906–911. [[CrossRef](#)]
- Fischedick, J.T.; Hazekamp, A.; Erkelens, T.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L. cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2058–2073. [[CrossRef](#)]

20. Booth, J.K.; Bohlmann, J. Terpenes in *Cannabis sativa*—From plant genome to humans. *Plant Sci.* **2019**, *284*, 67–72. [[CrossRef](#)]
21. Jin, D.; Dai, K.; Xie, Z.; Chen, J. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3309. [[CrossRef](#)]
22. Calzolari, D.; Magagnini, G.; Lucini, L.; Grassi, G.; Appendino, G.B.; Amaducci, S. High added-value compounds from Cannabis threshing residues. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *108*, 558–563. [[CrossRef](#)]
23. Marzorati, S.; Friscione, D.; Picchi, E.; Verotta, L. Cannabidiol from inflorescences of *Cannabis sativa* L.: Green extraction and purification processes. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *155*, 112816. [[CrossRef](#)]
24. Flores-Sanchez, I.J.; Ramos-Valdivia, A.C. A review from patents inspired by the genus Cannabis. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 639–675. [[CrossRef](#)]
25. Hazekamp, A.; Fishedick, J.T. Cannabis—From cultivar to chemovar. *Drug Test. Anal.* **2012**, *4*, 660–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hillig, K.W. A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 875–891. [[CrossRef](#)]
27. Lewis, M.A.; Russo, E.B.; Smith, K.M. Pharmacological Foundations of Cannabis Chemovars. *Planta Med.* **2018**, *84*, 225–233. [[CrossRef](#)]
28. Nahler, G. Cannabidiol and Contributions of Major Hemp Phytocompounds to the “Entourage Effect”; Possible Mechanisms. *Altern. Complement. Integr. Med.* **2019**, *5*, 1–16. [[CrossRef](#)]
29. Sarmadyan, H.; Solhi, H.; Hajimir, T.; Najarian-Araghi, N.; Ghaznavi-Rad, E. Determination of the Antimicrobial Effects of Hydro-Alcoholic Extract of *Cannabis sativa* on Multiple Drug Resistant Bacteria Isolated from Nosocomial Infections. *Iran. J. Toxicol.* **2014**, *7*, 967–972.
30. Aizpurua-Olaizola, O.; Soydaner, U.; Öztürk, E.; Schibano, D.; Simsir, Y.; Navarro, P.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 324–331. [[CrossRef](#)]
31. Karas, J.A.; Wong, L.J.M.; Paulin, O.K.A.; Mazeh, A.C.; Hussein, M.H.; Li, J.; Velkov, T. The Antimicrobial Activity of Cannabinoids. *Antibiotics* **2020**, *9*, 406. [[CrossRef](#)]
32. Baker, D.; Pryce, G.; Giovannoni, G.; Thompson, A.J. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 291–298. [[CrossRef](#)]
33. Stout, S.M.; Cimino, N.M. Exogenous cannabinoids as substrates, inhibitors, and inducers of human drug metabolizing enzymes: A systematic review. *Drug Metab. Rev.* **2014**, *46*, 86–95. [[CrossRef](#)]
34. Hand, A.; Blake, A.; Kerrigan, P.; Samuel, P.; Friedberg, J. History of medical cannabis. *Cannabis Med. Asp.* **2016**, *9*, 387–394.
35. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee on the Health Effects of Marijuana: An Evidence Review and Research Agenda. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research*; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2017.
36. Byars, T.; Theisen, E.; Bolton, D.L. Using Cannabis to Treat Cancer-Related Pain. *Semin Oncol. Nurs.* **2019**, *35*, 300–309. [[CrossRef](#)]
37. Guzmán, M. Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 745–755. [[CrossRef](#)]
38. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774. [[CrossRef](#)]
39. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [[CrossRef](#)]
40. Demirpolat, A.; Akman, F.; Kazachenko, A.S. An Experimental and Theoretical Study on Essential Oil of *Aethionema sancakense*: Characterization, Molecular Properties and RDG Analysis. *Molecules* **2022**, *27*, 6129. [[CrossRef](#)]
41. Pandey, A.; Kumar, P.; Singh, P.; Tripathi, N.N.; Bajpai, V. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*, 2161. [[CrossRef](#)]
42. Harris, R. Synergism in the essential oil world. *Int. J. Aromather.* **2002**, *12*, 179–186. [[CrossRef](#)]
43. Russo, E.B. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 1344–1364. [[CrossRef](#)]
44. Fathordoobady, F.; Singh, A.; Kitts, D.D.; Pratap Singh, A. Hemp (*Cannabis sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Rev. Int.* **2019**, *35*, 664–684. [[CrossRef](#)]
45. Ramirez, C.L.; Fanovich, M.A.; Churio, M.S. Chapter 4—Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta ur, R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 61, pp. 143–173.
46. Lazarjani, M.P.; Young, O.; Kebede, L.; Seyfoddin, A. Processing and extraction methods of medicinal cannabis: A narrative review. *J. Cannabis Res.* **2021**, *3*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Aladić, K.; Jarni, K.; Barbir, T.; Vidović, S.; Vladić, J.; Bilić, M.; Jokić, S. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *76*, 472–478. [[CrossRef](#)]
48. Agarwal, C.; Máthé, F.; Hofmann, T.; Csóka, L. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. Optimized by Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 700–710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Romano, L.L.; Hazekamp, A. Cannabis oil: Chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids* **2013**, *1*, 1–11.
50. Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **2013**, *117*, 426–436. [[CrossRef](#)]

51. Karğılı, U.; Aytaç, E. Supercritical fluid extraction of cannabinoids (THC and CBD) from four different strains of cannabis grown in different regions. *J. Supercrit. Fluids* **2022**, *179*, 105410. [[CrossRef](#)]
52. Pacifici, R.; Marchei, E.; Salvatore, F.; Guandalini, L.; Busardò, F.P.; Pichini, S. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2017**, *55*, 1555–1563. [[CrossRef](#)]
53. Mudge, E.M.; Murch, S.J.; Brown, P.N. Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 3153–3163. [[CrossRef](#)]
54. Citti, C.; Braghiroli, D.; Vandelli, M.A.; Cannazza, G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 565–579. [[CrossRef](#)]
55. Burnier, C.; Esseiva, P.; Roussel, C. Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta* **2019**, *192*, 135–141. [[CrossRef](#)]
56. Sexton, M.; Shelton, K.; Haley, P.; West, M. Evaluation of Cannabinoid and Terpenoid Content: Cannabis Flower Compared to Supercritical CO₂ Concentrate. *Planta Med.* **2018**, *84*, 234–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Fasinu, P.S.; Phillips, S.; ElSohly, M.A.; Walker, L.A. Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacotherapy* **2016**, *36*, 781–796. [[CrossRef](#)]
58. Pollastro, F.; Minassi, A.; Fresu, L.G. Cannabis Phenolics and their Bioactivities. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1160–1185. [[CrossRef](#)]
59. Tuli, H.S.; Garg, V.K.; Bhushan, S.; Uttam, V.; Sharma, U.; Jain, A.; Sak, K.; Yadav, V.; Lorenzo, J.M.; Dhama, K.; et al. Natural flavonoids exhibit potent anticancer activity by targeting microRNAs in cancer: A signature step hinting towards clinical perfection. *Transl. Oncol.* **2023**, *27*, 101596. [[CrossRef](#)]
60. Roginsky, V.; Lissi, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **2005**, *92*, 235–254. [[CrossRef](#)]
61. Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2009**, *2*, 41–60. [[CrossRef](#)]
62. Isidore, E.; Karim, H.; Ioannou, I. Extraction of Phenolic Compounds and Terpenes from *Cannabis sativa* L. By-Products: From Conventional to Intensified Processes. *Antioxidants* **2021**, *10*, 942. [[CrossRef](#)]
63. Rubio, M.C.; Rezusta, A.; Gil Tomás, J.; Ruesca, R.B. Mycological view of dermatophytes in humans. *Rev. Iberoam. Micol.* **1999**, *16*, 16–22.
64. Díaz Jarabrán, M.C.; Díaz González, P.; Espinoza Rodríguez, J.; Carrillo Muñoz, A.J. Evaluación del perfil de sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* en Santiago, Chile. *Rev. Iberoam. Micol.* **2015**, *32*, 83–87. [[CrossRef](#)]
65. Skala, T.; Kahánková, Z.; Tauchen, J.; Janatová, A.; Klouček, P.; Hubka, V.; Fraňková, A. Medical cannabis dimethyl ether, ethanol and butane extracts inhibit the in vitro growth of bacteria and dermatophytes causing common skin diseases. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 953092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ligresti, A.; Moriello, A.S.; Starowicz, K.; Matias, I.; Pisanti, S.; De Petrocellis, L.; Laezza, C.; Portella, G.; Bifulco, M.; Di Marzo, V. Antitumor Activity of Plant Cannabinoids with Emphasis on the Effect of Cannabidiol on Human Breast Carcinoma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Shrivastava, A.; Kuzontkoski, P.M.; Groopman, J.E.; Prasad, A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 1161–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. ChoiPark WH, D.; Baek, S.H.; Chu, J.P.; Kang, M.H.; Mi, Y.J. Cannabidiol Induces Cytotoxicity and Cell Death via Apoptotic Pathway in Cancer Cell Lines. *Biomol. Ther.* **2008**, *16*, 87–94. [[CrossRef](#)]
69. Sultan, A.S.; Marie, M.A.; Sheweita, S.A. Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast* **2018**, *41*, 34–41. [[CrossRef](#)]
70. Hamad, H.; Olsen, B.B. Cannabidiol Induces Cell Death in Human Lung Cancer Cells and Cancer Stem Cells. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1169. [[CrossRef](#)]
71. Takeda, S.; Okajima, S.; Miyoshi, H.; Yoshida, K.; Okamoto, Y.; Okada, T.; Amamoto, T.; Watanabe, K.; Omiecinski, C.J.; Aramaki, H. Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol. Lett.* **2012**, *214*, 314–319. [[CrossRef](#)]
72. Tao, S.F.; He, H.F.; Chen, Q. Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *402*, 93–100. [[CrossRef](#)]
73. Brunelli, E.; Pinton, G.; Bellini, P.; Minassi, A.; Appendino, G.; Moro, L. Flavonoid-induced autophagy in hormone sensitive breast cancer cells. *Fitoterapia* **2009**, *80*, 327–332. [[CrossRef](#)]
74. Moreau, M.; Ibeh, U.; Decosmo, K.; Bih, N.; Yasmin-Karim, S.; Toyang, N.; Lowe, H.; Ngwa, W. Flavonoid Derivative of Cannabis Demonstrates Therapeutic Potential in Preclinical Models of Metastatic Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 660. [[CrossRef](#)]
75. Veress, T.; Szanto, J.I.; Leisztner, L. Determination of cannabinoid acids by high-performance liquid chromatography of their neutral derivatives formed by thermal decarboxylation: I. Study of the decarboxylation process in open reactors. *J. Chromatogr. A* **1990**, *520*, 339–347. [[CrossRef](#)]
76. Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Maran, D.; Benvenuti, S. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *143*, 228–236. [[CrossRef](#)]

77. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1999; Volume 299, pp. 152–178.
78. Waterman, P.G.; Mole, S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK, 1994.
79. Mellado, M.; Soto, M.; Madrid, A.; Montenegro, I.; Jara-Gutiérrez, C.; Villena, J.; Werner, E.; Godoy, P.; Aguilar, L.F. In vitro antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 53. [[CrossRef](#)]
80. Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Pourrat, A.; Legret, P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J. Pharm. Belg.* **1994**, *49*, 462–468.
81. Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407–412. [[CrossRef](#)]
82. Romay, C.; Pascual, C.; Lissi, E.A. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 175–183.
83. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
84. Miliauskas, G.; Venskutonis, P.R.; van Beek, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **2004**, *85*, 231–237. [[CrossRef](#)]
85. Brito, C.; Hansen, H.; Espinoza, L.; Faúndez, M.; Olea, A.F.; Pino, S.; Díaz, K. Assessing the Control of Postharvest Gray Mold Disease on Tomato Fruit Using Mixtures of Essential Oils and Their Respective Hydrolates. *Plants* **2021**, *10*, 1719. [[CrossRef](#)]
86. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. [[CrossRef](#)]
87. Bosio, C.; Tomasoni, G.; Martinez, R.; Olea, A.F.; Carrasco, H.; Villena, J. Cytotoxic and apoptotic effects of leptocarpin, a plant-derived sesquiterpene lactone, on human cancer cell lines. *Chem. Biol. Inter.* **2015**, *242*, 415–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son responsabilidad exclusiva de los autores y colaboradores individuales y no de MDPI y/o el/los editor/es. MDPI y/o el/los editor/es declinan toda responsabilidad por daños personales o materiales derivados de ideas, métodos, instrucciones o productos a los que se haga referencia en el contenido.