



Optimización de un procedimiento de extracción de compuestos bioactivos y análisis micrográficos de inflorescencias de dos cepas de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en Tucumán (Argentina)

Optimization of a bioactive compound extraction procedure and micrographic analysis of inflorescences from two medicinal *Cannabis* strains cultivated in Tucumán (Argentina)

Matteucci, Enzo A.¹; Florencia Cattaneo^{1,2}; Iris C. Zampini^{1,2}; María I. Mercado³; María I. Isla^{1,2*}

¹ Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal (INBIOFIV), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). San Martín 1545, San Miguel de Tucumán, Argentina.

² Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Miguel Lillo 250, San Miguel de Tucumán, Argentina.

³ Instituto de Morfología Vegetal, Área Botánica, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (T400JFE) San Miguel de Tucumán, Argentina.

* Autor correspondiente: <misla@csnat.unt.edu.ar>

RESUMEN

Cannabis sativa L. es una especie rica en diversos metabolitos especiales o secundarios, entre los que se destacan los cannabinoides, terpenos y compuestos fenólicos, reconocidos por contribuir de forma sinérgica en el aroma, sabor y propiedades terapéuticas de la planta. Los cannabinoides son los metabolitos más conocidos de *Cannabis*, con más de 100 identificados hasta la fecha. Estos compuestos interactúan con el sistema endocannabinoide del cuerpo humano para producir diversos efectos fisiológicos, siendo junto a fenoles y terpenos los principales ingredientes farmacológicamente activos (IFA) de los Productos vegetales elaborados a base de *Cannabis* para su uso y aplicación en medicina humana. La cantidad, calidad, estado de

► Ref. bibliográfica: Matteucci, E. A.; Cattaneo, F.; Zampini, I. C.; Mercado, M. I.; Isla, M. I. 2024. Optimización de un procedimiento de extracción de compuestos bioactivos y análisis micrográficos de inflorescencias de dos cepas de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en Tucumán (Argentina). *Lilloa* 61 (2): 359-377. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/1987>

► Recibido: 5 de agosto 2024 – Aceptado: 16 de octubre 2024 – Publicado: 4 de noviembre 2024.



► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

oxidación y propiedades de los IFA puede variar ampliamente según la cepa utilizada, la forma de cultivo, el proceso de cosecha, el curado de la droga vegetal y la técnica de extracción utilizada, entre otros. En este contexto, obtener productos estandarizados a base de *Cannabis* es importante para lograr fármacos de calidad, que ofrezcan seguridad y eficacia. El objetivo de esta investigación fue caracterizar morfo-anatómicamente a las inflorescencias (sin hojas) de dos cepas de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en la provincia de Tucumán, optimizar técnicas de extracción para la obtención de extractos estandarizados en compuestos fenólicos y cannabinoides y evaluar su capacidad antioxidante. Para ello se seleccionaron inflorescencias de dos cepas, INBIO-1 y 2, cultivadas bajo condiciones controladas en la provincia de Tucumán. Las mismas se caracterizaron macro y microscópicamente. Parte del material se secó en estufa y se fragmentó, para luego proceder a la optimización de la extracción de los IFA. Se ensayaron extracciones utilizando etanol 96° a dos temperaturas (5 y 40 °C) y tres relaciones diferentes de material vegetal (MV) respecto al solvente (S) (1/10, 1/20 y 1/40). Se demostró que la relación MV/S, la temperatura y la cepa utilizada determinan el perfil cualitativo y cuantitativo de metabolitos extraídos y su actividad antioxidante. Los extractos obtenidos a partir de cepas locales de *Cannabis* resultaron estandarizados con una metodología convencional, seleccionando las condiciones para la extracción más eficiente de compuestos bioactivos.

Palabras clave: *Cannabis* para uso medicinal; extractos; resinas; cannabinoides; compuestos fenólicos.

ABSTRACT

Cannabis sativa L. is a rich species in several special or secondary metabolites, among them cannabinoids, terpenes, and phenolic compounds stand out, recognized for their synergistic contributions to the aroma, flavor, and therapeutic properties of the plant. Cannabinoids are the best-known metabolites of *Cannabis*, with more than 100 identified thus far. These compounds interact with the endocannabinoid system of the human body to produce various physiological effects, being together with phenols and terpenes the main Pharmacologically Active Ingredients (PAI) of *Cannabis*-based plant products for use and application in human medicine. The quantity, quality, oxidation state, and therapeutic properties of PAI can vary widely depending on the strain used, the cultivation method, the harvesting process, the curing of the herbal material, and the extraction technique used, among others. In this context, obtaining standardized *Cannabis*-based products is important to achieve quality medical drugs that offer safety and efficacy. The aim of this research was to characterize the morfo-anatomy of the inflorescences (without leaves) of two strains of *Cannabis* grown for medicinal purposes in the province of Tucumán, optimize extraction techniques to obtain standardized extracts in phenolic

and terpene-phenolic compounds, and evaluate their antioxidant capacity. For this purpose, inflorescences of two *Cannabis* strains, INBIO-1 and 2, grown under controlled conditions in Tucumán province, were selected. They were characterized macro- and microscopically employing conventional histological techniques. Part of the material was dried in an oven and fragmented, to then proceed to optimize the extraction of the PAIs. Extractions were tested using 96° ethanol at two temperatures (5 and 40 °C) and three different ratios of plant material (pM) to solvent (S) (1/10, 1/20, and 1/40). It was demonstrated that the plant material/solvent pM/S ratio, temperature, and strain used determine the qualitative and quantitative profile of the extracted metabolites and their antioxidant activity. The extracts obtained from local *Cannabis* strains were standardized with a conventional methodology, selecting the conditions for the most efficient extraction of bioactive compounds.

Palabras clave: Medicinal *Cannabis*; extracts; resins; cannabinoids; phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

Cannabis sativa L. (Cannabaceae) es una especie perteneciente a un género monoespecífico altamente polimórfico (McPartland, 2018). Se trata de plantas herbáceas arbustivas, anuales, dioicas (ocasionalmente monoicas) (Arbo *et al.*, 2019).

La especie se originó hace 6000 años en Asia Central y, debido a su valor en la producción de fibras textiles y sus potenciales aplicaciones industriales, medicinales, alimenticias, rituales y recreativas, su cultivo se ha difundido a nivel mundial (Cerino *et al.*, 2021; Fordjour *et al.*, 2023). En base a estudios botánicos morfológicos, genéticos, fitoquímicos y de distribución, McParland y Small (2020) y Lapierre *et al.* (2023) han propuesto la existencia de dos subespecies; *C. sativa* subsp. *sativa* (originaria de Europa, con las variedades *sativa* y *spontanea*) y *C. sativa* subsp. *indica* (con 4 variedades, *indica*, *afghanica*, *himalayensis* y *asperrima* de diferentes orígenes geográficos). Sin embargo, producto de la fuerte hibridación que han sufrido las subespecies para la selección de variedades y cepas con características de interés comercial, se han eliminado a grandes rasgos las diferencias entre ellas (Lapierre *et al.*, 2023).

Actualmente, en nuestro país, bajo las leyes 27350 y 27669 (para la investigación médica y científica de uso medicinal de la planta de *Cannabis* y sus derivados; y para el desarrollo de la industria del *Cannabis* de uso medicinal, y el cáñamo industrial, respectivamente) y mediante la Resolución 781/2022 (posteriormente modificada por la disposición 767/2023) del Ministerio de Salud de la Nación, se creó la categoría de “productos vegetales a base de *Cannabis* y sus derivados destinados al uso y aplicación en la medicina humana”. La disposición 6431/2022 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), en

su guía anexa para la autorización sanitaria de productos vegetales a base de *Cannabis*, define a la droga vegetal como las inflorescencias femeninas y las hojas superiores acompañantes, desecadas, enteras o fragmentadas, obtenidas del pie femenino (o de plantas provenientes de semillas feminizadas) de *C. sativa*, incluyendo todas sus subespecies, variedades y quimiotipos.

Las inflorescencias femeninas son panojas compactas, en las que la unidad estructural (o fitómero) está conformada por un eje con nudos acortados donde se disponen brácteas foliares con estípulas, en cuyas axilas se acomodan las flores femeninas de a pares (Spitzer-Rimon *et al.*, 2019). Cada flor se encuentra rodeada por una bráctea perigonal foliosa, densamente poblada por tricomas, en su mayoría glandulares que sintetizan y acumulan fitocannabinoides, fenoles y terpenoides, responsables del olor y sabor característicos de la planta. En la naturaleza, estos metabolitos secundarios actúan en interacciones ecológicas con el ambiente, incluyendo factores abióticos (como antioxidantes frente a radicales libres, moléculas señalizadoras de stress, entre otras) y bióticos (frente a herbívoros, fitófagos y microorganismos) (André *et al.*, 2016; Biteznik *et al.*, 2023; Hancock *et al.*, 2024). El perianto se compone de una membrana hialina (correspondiente a los ciclos no fértiles reducidos) (Leme *et al.*, 2020a), la cual recubre parcialmente al ovario oval, unilocular y uniovulado, caracterizado por presentar un estilo con dos ramas estigmáticas exertas recubiertas de papilas (Arbo *et al.*, 2019; Reed, 1914; Spitzer-Rimon *et al.*, 2019; Leme *et al.*, 2020a). Cabe destacar que los órganos vegetativos aéreos de la planta, al igual que las inflorescencias, presentan estructuras de secreción como tricomas glandulares; no glandulares (Raman *et al.*, 2017) y laticíferos asociados al floema (Leme *et al.*, 2020b; Vaccarini *et al.*, 2023).

Hasta el presente se han identificado en la planta de *Cannabis* aproximadamente 500 compuestos, entre los que se encuentran terpenos, fenoles, terpeno-fenoles como los fitocannabinoides, alcaloides, aminoácidos, vitaminas y carbohidratos, entre otros (Citti *et al.*, 2020; Flores-Sanchez y Verpoorte, 2008; McPartland y Russo, 2001). Los fitocannabinoides más conocidos y estudiados son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN); los cuales constituyen los principales principios activos del *Cannabis* y presentan diversas propiedades y efectos. Una tendencia es clasificar las variedades de *Cannabis* en quimiotipos o variedades químicas, según la composición de cannabinoides y terpenos en sus inflorescencias, los cuales influyen en sus efectos terapéuticos (Haze-kamp y Fishedick, 2012). Tradicionalmente se definen 3 quimiotipos en base a la relación de sus principales cannabinoides: el I, con altas cantidades de THC (THC: CBD \gg 1), el II con iguales concentraciones de THC y CBD, (THC: CBD = 1, aceptable entre 0,5-2) y el III con alto contenido de CBD (THC: CBD \ll 1) (Pacífico *et al.*, 2008).

Es ampliamente conocido que las condiciones ambientales generan variabilidad química y morfológica en la planta (Flajšman y Ačko, 2020; Saloner y Bernstein, 2021; De Prato *et al.*, 2022; Moher *et al.*, 2022; Tran-

coso *et al.*, 2022). Por otro lado, factores como el solvente de extracción, la temperatura, la relación material vegetal / solvente (MV/S), el método de extracción (maceración, microondas, ultrasonido, fluido supercrítico) definen el tipo y concentración de los metabolitos a extraer (fitocannabinoides, compuestos fenólicos, terpenoides) y por ende varían las propiedades medicinales de los extractos (Al Ubeed *et al.*, 2022; Martínez *et al.*, 2023; Pattnaik *et al.*, 2022).

Por tal motivo, es importante obtener productos estandarizados para lograr fármacos de calidad, que ofrezcan seguridad y eficacia. Por ello el objetivo de esta investigación fue caracterizar morfo-anatómicamente las inflorescencias (droga vegetal) de dos cepas de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en interiores (sistema *In Door*) en la provincia de Tucumán, optimizar técnicas de extracción para la elaboración de extractos estandarizados en compuestos fenólicos y terpeno-fenólicos y evaluar su capacidad antioxidante, a fin de obtener un “Producto vegetal a base de *Cannabis*” de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se trabajó con dos cepas locales de *Cannabis sativa* L., INBIO-1 e INBIO-2, cultivadas en el Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal (INBIO-FIV) CONICET-UNT ARGENTINA. Prov. Tucumán, Dpto. San Miguel de Tucumán 26°49'50.7"S 65°13'13.0"W, 2798 msnm. Las semillas germinaron sobre un soporte humedecido, estéril e inerte y se colocaron en macetas de 5 L con sustrato comercial (GroMix Multipro®-Argentina). Las condiciones de cultivo para la fase de crecimiento vegetativo fueron mantenidas durante 40 días con un fotoperiodo: 18 h de luz y 6 h de oscuridad utilizando una fuente de iluminación Lumatek CMH Aurora 600 w, a una temperatura de 18 °C y con un 80 % de humedad. Luego se estimuló la floración cambiando el fotoperiodo a luz/oscuridad 12/12 h, utilizando una fuente de luz cálida de lámparas de Sodio (1007 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$), a una temperatura de 25 °C y una humedad del 53 %. Producida la floración, se cosecharon las inflorescencias y fueron sometidas a un proceso de secado (estufa de aire forzado a 40 °C), hasta peso constante. Durante todo el proceso de desarrollo vegetativo y floración no se utilizó ningún tipo de plaguicida sintético, ni de fertilizantes. Para el riego se utilizó agua corriente, libre de cloro, pH: $7,92 \pm 0,10$, conductividad: $0,860 \pm 0,14$ ms/cm.

2. Preparación de muestras para estudios morfológicos y micrográficos epidérmicos

Para el análisis macroscópico se utilizaron inflorescencias apicales en el mismo estadio de madurez o desarrollo provenientes de 3 plantas de cada

cepa. De la sección media de la inflorescencia de cada individuo, con ayuda de pinzas de acero inoxidable, se separaron 10 flores maduras y se montaron en una platina para ser fotografiadas con microscopio estereoscópico Zeiss STEMI2000C con AxioCam ERc 5s Zeiss adosada (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Para la caracterización micrográfica, se aislaron flores y brácteas, las cuales fueron fijadas en formol: etanol: ácido acético: agua, 100:500: 50: 350, v/v (FAA). Para los estudios epidérmicos, se separaron 10 flores de cada individuo y 10 fragmentos de 2 cm² de lámina de brácteas foliares previamente fijadas en FAA. El material fue diafanizado en KOH 10% durante 1 mes a temperatura ambiente (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Luego fue lavado en agua corriente y decolorado con hipoclorito de sodio 50%, durante 20 min. Finalmente se enjuagó con agua destilada tres veces sucesivas, se sometió a un proceso de tinción con colorante metacromático violeta de cresil 1% (Sigma aldrich®-Estados Unidos) y se montó en agua glicerizada 50% (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Zarlavsky, 2014). La descripción de las características epidérmicas por órgano analizado se realizó clasificando los tricomas según la terminología propuesta por Vaccarini *et al.* (2023) en tricomas no glandulares: simples (TNS) y cistolíticos (TNC) en forma de aguijón con concreciones de carbonato de calcio; y tricomas glandulares: peltados (TGP) de pie corto unicelular y cabeza pluricelular de hasta 8 células; tricomas peltados estipitados (TGP-E) de pie estipitado pluricelular y cabeza pluricelular de más de 8 células, y capitados-bulbosos (TGC) de pie bicelular y cabeza bi o tetracelular. Para las observaciones y fotografías se utilizó un microscopio óptico binocular Carl Zeiss Lab. A1 Axiolab con polarizador y cámara AxioCam ERc 5s Zeiss adosada (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Las mediciones de las fotografías se realizaron utilizando el software Axio Vision release 4.8.2.

3. Preparación de los extractos

Las inflorescencias de cada cepa fueron molidas con molino de cuchillas (Numak®-Argentina) con dos pulsos cortos de 20 s. Los extractos se realizaron utilizando diferentes relaciones de MV/S, 1:40, 1:20 y 1:10 (p/v), con etanol 96° como solvente. Las extracciones se realizaron a dos temperaturas, 5 °C con asistencia de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner, Model CD-4830) con 2 ciclos de 10 min cada uno; y 40 °C durante 30 min en un baño de incubación con agitación a 40 r.p.m.

4. Determinación del rendimiento

Para determinar el rendimiento se tomó 1 mL de cada extracto y se evaporó el solvente a 40 °C, luego por gravimetría se determinó el peso seco de las resinas obtenidas. Este procedimiento se realizó por triplicado.

5. Análisis fitoquímico

5.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.— Se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos totales utilizando la técnica descrita por Singleton *et al.* (1999). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) en 100 g de material vegetal (mg EAG/100 g MV) y en 100 g de extracto seco (mg EAG/100 g ES) ($R^2 = 0,999$).

5.2. Cuantificación de flavonoides.— Los flavonoides totales (FT) se estimaron mediante el método de Woisky & Salatino (1998). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de quercetina en 100 g de material vegetal (mg EQ/100 g MV) y en 100 g de extracto seco (mg EQ/100 g ES) ($R^2 = 0,9984$).

5.3. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF)

5.3.1. Análisis de los compuestos fenólicos.— Se sembró una alícuota de cada muestra en placa de Sílica Gel F₂₅₄ (Marca Merck F₂₅₄). La CCF se desarrolló con una fase móvil tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). El revelado se realizó con reactivo NP/PEG: ester aminoetílico del ácido difenilbórico (NP, Marca Sigma) al 1 % en metanol y polietilenglicol (PEG) (Wagner y Bladt, 1996) visualizado bajo luz ultravioleta a 254 y 365 nm (Lámpara UV Modelo 5L-58-Mineralight).

5.3.2. Análisis de compuestos cannabinoides.— Se sembró una alícuota de cada extracto en placa de Sílica Gel F₂₅₄ (Merck F₂₅₄). La CCF se desarrolló con una fase móvil formada por hexano/éter etílico (8:2; v/v). Los compuestos cannabinoides se revelaron y visualizaron con Fast Blue BB (Marca Sigma) en 0,3% en metanol seguido de hidróxido de sodio 0,1 M para intensificar la visualización de las bandas (Wagner y Bladt, 1996).

5.4. Determinación del perfil de cannabinoides y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).— Para la identificación y cuantificación de los principales cannabinoides en los diferentes extractos (1 mg de extracto seco/mL) se utilizó un equipo Waters 1525 (Waters Corporation®-Estados Unidos) con sistema binario de bombas, detector de arreglo de diodos Waters 2998 y *loop* de 20 μ L (Rheodyne Inc., Cotati, CA). Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ (Columna X Bridge C₁₈, 4,6 x 250mm, 5 μ m), con condiciones de corrida isocráticas, utilizando acetonitrilo: agua 80:20 v/v; velocidad de flujo 1 mL/min. La identificación de los cannabinoides se llevó a cabo comparando los tiempos de retención y análisis espectrales (220–600 nm) de cada pico con los correspondientes cannabinoides comerciales (Restek-Jenck®-Estados Unidos). Para la cuantificación de los principales cannabinoides [tetrahidrocannabinol (THC), cannabigerol (CBG), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) y cannabicromeno (CBC)] se elaboró una curva de calibración para determinar la rela-

ción entre el área del pico y la concentración de cada uno de los cannabinoides. Los resultados se expresaron en μg de cada cannabinoide por mg de principio soluble ($\mu\text{g}/\text{mgPS}$). Por otro lado, se calculó el contenido total de cannabinoides (CT) mediante la sumatoria de los valores de concentración obtenidos para los diferentes cannabinoides y se expresó como mg/100 g PS y como mg/100 g de MV. Se calculó además la relación THC/CBD, parámetros que contribuyen a evaluar la calidad y el potencial terapéutico del *Cannabis* y sus derivados.

6. Actividad depuradora del radical-cati3n ABTS

El ensayo frente al radical-cati3n ABTS se llev3 a cabo mediante la t3cnica descripta por Re *et al.* (1999). A diferentes diluciones del extracto se agreg3 la soluci3n de trabajo de ABTS^{•+}. La absorbancia se midi3 a 734 nm a los 1 y 6 minutos despu3s del inicio de la reacci3n en Lector de microplaca (Thermo Scientific[®]- Estados Unidos). La capacidad antioxidante se calcul3 como el valor de capacidad depuradora 50 (CD₅₀) que representa la concentraci3n de extracto seco requerida para depurar el 50 % de radicales libres del ABTS.

7. An3lisis estadístico

Los an3lisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Infostat (Di Rienzo, 2010). Las diferentes variables en estudios fueron ensayadas al menos por triplicado. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm el desvío est3ndar. Para ver los efectos de los factores temperatura y relaci3n MV/S se realiz3 un Anova de dos vías seguido de post Test de Tukey con un valor de significancia de 0,05. Para el Anova de dos vías se consideraron dos factores: Temperatura con dos niveles 5 y 40 °C y relaci3n MV/S con tres niveles 1:10, 1:20 y 1:40.

RESULTADOS Y DISCUSI3N

1. Estudios morfo-anat3micos y microgr3ficos de la inflorescencia de *Cannabis* para uso medicinal

Según la disposici3n 6431/2022 de ANMAT, la droga vegetal de *Cannabis* corresponde a las sumidades floridas de la planta de *Cannabis*, de las cuales no se ha extraído la resina (Fig. 1). Uno de los primeros pasos para asegurar la calidad de una droga vegetal es la identificaci3n y caracterizaci3n bot3nica adecuada del material vegetal que se utilizar3 como materia prima, considerando la presencia de caracteres de valor diagn3stico de la especie y la ausencia de otras especies o partes de la planta no incluidas dentro de la definici3n de la droga vegetal propiamente dicha. Por tal motivo se anali-



Fig. 1. Inflorescencias (sumidades floridas) de *Cannabis sativa*: A) Cepa INBIO-1 luego de su secado en estufa de aire forzado. B) Cepa INBIO-2 luego de su secado en estufa de aire forzado. C) Comparación de flor femenina de ambas cepas INBIO-1 (a) e INBIO-2 (b).

Fig. 1. Inflorescences (flowering tops) of *Cannabis sativa*: A) Strain INBIO-1 after drying in a forced air oven. B) Strain INBIO-2 after drying in a forced air oven. C) Comparison of female flowers of both strains INBIO-1 (a) and INBIO-2 (b).

zaron los caracteres morfo anatómicos de valor diagnóstico en las muestras de *Cannabis* cosechadas, demostrando que el material es una panoja compacta, en la que, sobre el eje se disponen las flores pistiladas acompañadas de brácteas foliares estipuladas.

En las muestras analizadas para ambas cepas, las brácteas foliares se encontraron incompletas, producto de la práctica denominada “manicura”, la cual consiste en recortar las hojas de las sumidades floridas para evitar la acumulación de humedad y formación de hongos. En cuanto a sus características epidérmicas, no se observaron diferencias entre las cepas. En ambos casos se observó una epidermis superior con células poligonales de paredes anticlinales rectas a curvadas o ligeramente lobuladas y estomas anomocíticos. La epidermis superior se caracterizó por tener escasos estomas, TNS, TNC, TGP y TGP-E (Tabla 1). La epidermis inferior presentó abundantes estomas, TNS, TGC, TGP y TGP-E mayormente restringidos a nervaduras y márgenes foliares, siendo muy frágiles y desprendiéndose fácilmente (Tabla 1).

En la cepa INBIO-1 las flores femeninas presentaron mayores dimensiones $0,40 \pm 0,02$ cm de largo por $0,18 \pm 0,01$ cm de ancho con relación a la cepa INBIO-2 de $0,30 \pm 0,01$ cm de largo por $0,10 \pm 0,02$ cm de ancho (Fig. 1). En ambos casos presentaron una bráctea o bractéola perigonal de aspecto papiráceo verde densamente hirsuto, rodeando completamente al gineceo el cual lleva una o dos ramas estigmáticas papiladas y exertas. Leme *et al.* (2020a) describen dos ramas estilares en el desarrollo ontogenético, sin embargo, debido a la amplia la polimorfía exhibida por la especie, no se descarta la posibilidad de que existan flores o variedades con una o dos ramas estilares y uno o dos estigmas, respectivamente.

Tabla 1. Caracterización micrográfica del indumento de brácteas foliares y bráctea perigonal de las flores pistiladas aisladas de inflorescencias de *Cannabis sativa*.
Table 1. Micrographic characterization of the indumentum of leaf bracts and perigonal bract of pistillate flowers isolated from *Cannabis sativa* inflorescences.

Órgano	Superficie epidérmica	Tricomas no glandulares				Tricomas glandulares			Estomas
		Simple	Cistolítico	Peltado estipitado	Peltado	Capitado / bulboso			
Bráctea foliar	Superior	+	++	++	+	-	-	-	
	Inferior	++	-	+	++	+	++	++	
Bráctea perigonal	Superior-externa	+	+	-	+	+	+	+	
	Inferior-interna	++	+	++	+	+	++	++	

Referencias: (++) Muy frecuente. (+) Presente. (-) Poco frecuente. (- -) ausente.

References: (++) Very frequent. (+) Present. (-) Less frequent. (- -) absent.

La bractéola perigonal exhibió forma cónica, piriforme a cordiforme de ápice acuminado. En el ciclo interno a la misma, cubriendo los dos tercios inferiores de la base del ovario, se observó una membrana translúcida, correspondiente al verdadero perianto o perigonio vestigial (con cáliz y corola indiferenciadas), tal como lo describen Leme *et al.* (2020a).

Anatómicamente, las brácteas o bractéolas perigonales exhibieron epidermis anfiestomáticas con estomas anomocíticos (poco frecuentes en la epidermis superior) y abundantes tricomas en su cara expuesta (inferior). La superficie inferior-externa presentó células epidérmicas poligonales de paredes anticlinales fuertemente lobuladas, TNS, TGC, TGP y abundantes TGP-E característicos de la especie (Tabla 1). La epidermis superior-interna mostró aspecto hialino con células epidérmicas poligonales de paredes anticlinales lobuladas a ligeramente curvadas y escasos tricomas de los diferentes tipos descritos (Tabla 1).

2. Rendimiento obtenidos según los métodos de extracción

La temperatura y la relación MV/S influyen en la cantidad de resina extraída en ambas cepas demostrando interacción entre ambos factores. Producto de la interacción de estos factores observamos que la mejor combinación para extraer la mayor cantidad de resina es 40 °C con una relación MV/S 1:20 para INBIO-1 y con una relación MV/S 1:40 para INBIO-2 (Tabla 2). En ambas cepas vemos que la extracción a 40 °C es la óptima en términos

Tabla 2. Rendimiento y perfil fitoquímico de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) de inflorescencias de dos cepas de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en Tucumán.

Table 2. Yield and phytochemical profile of total phenolic compounds (CFT) and total flavonoids (FT) inflorescences of two *Cannabis* strains for medicinal use cultivated in Tucumán.

Cepa	Temperatura (°C)	Relación MV/S	Rendimiento (mg resina/100 g MV)	CFT (mg EA-G/100g de MV)	FT (mg EQ/100g de MV)
INBIO 1	40	1:40	11,7±0,8 ^B	1604,1±94,8 ^{A,B,C}	7,4±1,3 ^A
		1:20	15,4±0,9 ^C	1851,9±324,3 ^{B,C}	8,0±0,9 ^A
		1:10	10,8±0,2 ^{A,B}	1403,9±91,8 ^{A,B}	10,3±1,1 ^B
	5	1:40	9,8±0,1 ^A	1519,3±113,1 ^{A,B,C}	7,0±0,7 ^A
		1:20	11,6±0,3 ^B	1964,8±232,2 ^C	13,7±1,5 ^C
		1:10	9,6±0,1 ^A	1137,7±19,1 ^A	10,1±0,9 ^B
INBIO 2	40	1:40	14,8±0,7 ^D	1763,5±125,6 ^D	11,4±1,8 ^C
		1:20	13,1±0,2 ^C	1480,7±177,1 ^C	12,2±1,4 ^C
		1:10	7,5±0,1 ^A	756,0±11,3 ^A	7,5±1,3 ^{A,B}
	5	1:40	10,8±0,5 ^B	1480,7±58,2 ^C	5,5±1,5 ^A
		1:20	12,7±0,3 ^C	1612,2±107,3 ^{C,D}	10,8±2,3 ^C
		1:10	10,9±0,2 ^B	1158,8±27,8 ^B	9,7±2,5 ^{B,C}

Los valores son medias ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas para cada extracto de acuerdo con el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

The values are reported as mean ± standard deviation of triplicates. Different letters in the same column indicate significant differences for each extract according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

de rendimiento de resina. Si bien las dimensiones de las flores femeninas de INBIO-1 fueron mayores que las de INBIO-2, las diferencias observadas en la relación MV/S pueden deberse a la densidad de flores y cantidad de restos de brácteas foliares por inflorescencia en cada cepa en particular, estructuras que a su vez condicionan la densidad de TGP-E, principales responsables de la síntesis de metabolitos bioactivos (Livingston *et al.*, 2020; Vaccarini *et al.*, 2023).

3. Composición fitoquímica

3.1. Compuestos fenólicos totales y flavonoides.— El perfil fitoquímico obtenido con CCF y posterior revelado con NP y luz UV-365 nm, mostró que todos los extractos obtenidos de las cepas INBIO-1 e INBIO-2, presentan compuestos fenólicos del tipo ácidos fenólicos (bandas azules) y flavonoides (bandas naranjas, amarillas y verdes). En los análisis cuantitativos del contenido de compuestos fenólicos de los extractos, la relación MV/S fue un factor significativo que influyó en la cantidad de compuestos extraídos de INBIO-1 e INBIO-2 utilizando como solvente etanol ($p=0,0002$ y $0,1081$ respectivamente). Para INBIO-2, la relación MV/S ($p < 0,0001$) y la interacción de factores ($p < 0,0001$) resultaron menores a $0,05$ por lo que se consideran significativos.

Los extractos obtenidos de inflorescencias de la cepa INBIO-1 utilizando una relación 1:20 MV/S a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$; y de la cepa INBIO-2 utilizando una relación 1:40 MV/S a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una relación 1:20 MV/S a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, fueron los más enriquecidos en compuestos fenólicos totales, exhibiendo valores máximos de $1964,8 \pm 232,2$ mg EAG/100 g de inflorescencia para INBIO-1 y $1763,5 \pm 125,6$ mg EAG/100 g de inflorescencia para INBIO-2 (Tabla 2). Utilizando un método de extracción similar, Cantele *et al.* (2020) lograron un rendimiento de 1973 mg EAG/100 g de inflorescencia de *Cannabis*, comparable a los obtenidos para INBIO-1 e INBIO-2 en el presente aporte. Es importante destacar que, según una investigación realizada por Ahmed *et al.* (2019), las hojas de *C. sativa* presentan un contenido de compuestos fenólicos de 270 mg EAG/100g de hoja, 6 veces menor que los valores encontrados en las inflorescencias de INBIO-1 e INBIO-2.

El contenido de compuestos fenólicos totales /g de resina de ambas cepas bajo estudio, osciló entre 127 mg EAG/g resina y 92 mg EAG/g resina, valores semejantes a los informados por Hacke *et al.* (2019) para otras cepas de *Cannabis* para uso medicinal.

En cuanto al contenido de compuestos flavonoides para INBIO-1 se observó un valor máximo de 13,7 mg EQ/100 g de inflorescencia obtenida a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando una relación 1:20 de MV/S. Cuando la extracción se realizó a mayor temperatura ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$), se obtuvo mayor rendimiento de extracción de la relación MV/S 1:10 (Tabla 2). En el caso de INBIO-2 la extracción de flavonoides fue más eficiente utilizando una relación MV/S 1:20 tanto a 5

°C como a 40 °C, sin mostrar diferencias significativas entre ellas (Tabla 2). De acuerdo con los resultados obtenidos para diferentes cepas de *Cannabis* donde se analizó el contenido de flavonoides de las inflorescencias se puede concluir que estos compuestos no resultan los fitoquímicos principales en este órgano (Jin *et al.*, 2020; Zagórska-Dziok *et al.*, 2021). André *et al.* (2020), estudiaron el contenido de flavonoides de diferentes cepas, obteniendo valores variables entre 7,37 mg de flavonoides/g de MV y 0,06 mg de flavonoides/g de MV, que disminuyeron con la maduración de la flor. Por otra parte, Kobus *et al.* (2022), reportaron un contenido de flavonoides totales de 62 mg EQ/100g de inflorescencia de *Cannabis*, siendo estos valores más altos que los encontrados para las cepas bajo estudio. Como se mencionó anteriormente, estas diferencias pueden deberse a variaciones intrínsecas de las genéticas seleccionadas y/o al momento madurativo de la inflorescencia muestreada.

Comparando el contenido de compuestos fenólicos totales y de flavonoides de las inflorescencias de las cepas analizadas en el presente trabajo con el de flores de una especie afín, *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) se observó que esta última presenta mayores niveles de compuestos fenólicos (3393 mg EAG/100 g de material vegetal), y de flavonoides (5447 mg EQ/100g de MV), que los encontrados en *C. sativa* (Almeida *et al.*, 2020).

3.2. Perfiles de cannabinoides.— Los perfiles de cannabinoides en CCF revelados con reactivos específicos para cannabinoides mostraron claramente que los extractos etanólicos de las inflorescencias de las cepas INBIO-1 e INBIO-2 están enriquecidos en THC (Rf 0,5). El resto de los cannabinoides no revelaron por lo que se estimó que se encuentran en bajas concentraciones, menores al límite de detección de la técnica utilizada. Para la identificación y cuantificación de los cannabinoides se realizaron perfiles en HPLC-DAD utilizando estándares analíticos de CBD, CBN, CBG, CBC y THC. El THC fue el cannabinoide mayoritario en las resinas de las dos cepas analizadas (Tabla 3). Los niveles de CBD fueron similares a los de CBG y CBN.

Las resinas más ricas en cannabinoides fueron las obtenidas de INBIO-1 y de INBIO-2 con una relación MV/S 1:20 y 1:10 extraídos a 40 °C, y 1:10 a 5 °C. Los análisis estadísticos demostraron que en ambas cepas la interacción entre los factores fue significativa ($p < 0,0001$ para INBIO-1 y $p < 0,0260$ para INBIO-2). Los niveles de cannabinoides totales encontrados en las resinas de las cepas locales analizadas (INBIO-1 = 204,62 mg/g de resina e INBIO-2 = 132,13 mg/g de resina) son menores que los reportados para resinas de otras cepas cultivadas en Argentina, que están en el orden de los 358,8 mg/g de resina (Sedan *et al.*, 2023).

La relación entre el contenido de THC y CBD es considerado un importante descriptor de una cepa, medicamento o producto herbario a base de *Cannabis*. En todos los extractos obtenidos se evidenció que ambas cepas tienen mayor contenido de THC que de CBD, con una relación que

Tabla 3. Cuantificación de cannabinoides en inflorescencias de cepas de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en Tucumán.

Table 3. Quantification of cannabinoids in inflorescences of *Cannabis* for medicinal use cultivated in Tucumán.

Cepas	Temperatura (°C)	Relación MV/S	THC	CBG	CBD	CBN	CBC	Σ cannabinoides cuantificados	
			μg /mg PS					mg / g resina	mg / g inflorescencia
INBIO 1	40	01:40	61,99	0,90	0,97	1,30	0,24	65,4	0,76
		01:20	141,57	2,93	1,89	6,68	0,64	153,71	2,36
		01:10	145,43	2,40	2,51	2,76	0,96	154,06	1,66
	5	01:40	52,68	0,93	0,77	0,85	0,25	55,48	0,54
		01:20	88,75	1,62	1,45	1,45	0,51	93,78	1,09
		01:10	192,58	3,54	3,37	3,23	1,90	204,62	1,96
INBIO 2	40	01:40	61,46	1,48	1,41	1,98	0,65	66,98	0,99
		01:20	79,78	2,42	2,14	4,06	0,52	88,92	1,16
		01:10	120,32	3,48	3,35	4,28	0,70	132,13	0,99
	5	01:40	46,99	1,48	1,47	2,24	0,30	52,48	0,57
		01:20	47,91	1,39	1,37	1,93	0,23	52,83	0,69
		01:10	118,38	2,88	3,17	4,67	0,65	129,75	1,41

va entre 54:1 a 74:1 (Tabla 3). Un indicador del estado de conservación del MV es el contenido de CBN. Los valores de CBN de los extractos obtenidos a partir de las cepas analizadas resultaron bajos indicando un buen estado de conservación del material vegetal. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los informados para otras cepas argentinas (Sedan *et al.*, 2023).

4. Actividad antioxidante

Se analizó la actividad antioxidante de los extractos de *Cannabis* obtenidos de las dos cepas evaluando la capacidad de transferencia de electrones frente al radical catión ABTS. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4. Para la actividad antioxidante de los extractos de INBIO-1 e INBIO-2 se demuestra que la relación MV/S fue significativa para ambas cepas, observándose mayor actividad antioxidante en la relación 1:10 en ambas temperaturas para INBIO-1 ($p=0,0005$), mientras que para INBIO-2 los factores de MV/S y la temperatura que permite obtener mayor actividad antioxidante es la relación 1:40 a 5°C. Los valores de CD_{50} , indican que la actividad antioxidante de los extractos alcohólicos de inflorescencias de cepas INBIO-1 y 2 frente a ABTS (4,8 a 8,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) es mayor que la de extractos de otras cepas de *Cannabis* informadas por Spano *et al.* (2021) que están en el orden de 160 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cepas Carmagnola; Fibranova; Kompolti; Tisza; Antal; Tiborszallasi). Resultados similares a los obtenidos para las cepas argentinas se informaron para 7 extractos de *Cannabis* obtenidos con fluido supercrítico con valores de CD_{50} entre 5 y 7,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hacke *et al.*, 2019).

Tabla 4. Actividad depuradora del radical catión ABTS, cepa INBIO 1.**Table 4.** Scavenging activity of the ABTS radical cation, strain INBIO 1.

Cepa	Temperatura (°C)	Relación MV/S	CD ₅₀ ABTS (µg/mL)
INBIO 1	40	1:40	6,4 ± 0,5 ^{B,C,D}
		1:20	7,0 ± 0,9 ^{C,D}
		1:10	5,5 ± 0,4 ^{A,B}
	5	1:40	5,8 ± 0,6 ^{A,B,C}
		1:20	7,5 ± 0,3 ^D
		1:10	4,8 ± 0,1 ^A
INBIO 2	40	1:40	6,8 ± 0,7 ^B
		1:20	7,3 ± 0,2 ^{B,C}
		1:10	7,7 ± 0,5 ^{B,C}
	5	1:40	5,3 ± 0,2 ^A
		1:20	8,1 ± 0,1 ^C
		1:10	7,2 ± 0,1 ^{B,C}

CD₅₀: Concentración depuradora 50. Los valores son medias ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas para cada extracto de acuerdo con el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

CD₅₀: Scavenging concentration 50. The values are reported as mean ± standard deviation of triplicates. Different letters in the same column indicate significant differences for each extract according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

El análisis realizado a inflorescencias de dos cepas (INBIO-1 e INBIO- 2) de *Cannabis* para uso medicinal cultivadas en Tucumán, permitió caracterizarlas morfo-anatómicamente y optimizar la técnica de extracción de metabolitos de interés para obtener extractos estandarizados en compuestos fenólicos y terpeno-fenólicos. Además, se evaluó su capacidad antioxidante y el efecto de los distintos factores ensayados sobre esta actividad. Los resultados demostraron que la relación MV/S, la temperatura de extracción y la cepa utilizada influyen significativamente en el perfil cuali-cuantitativo de los metabolitos extraídos y en su actividad antioxidante.

En resumen, la selección de las condiciones de extracción debe ajustarse a los compuestos bioactivos que se pretende extraer y las propiedades terapéuticas deseadas en los productos. La estandarización de los extractos de *Cannabis* mejoraría la calidad de estos.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se enmarca en el Proyecto “*Estudio químico, fisiológico y biológico de Cannabis sativa cultivadas en Tucumán, para la obtención de productos de uso medicinal*” avalado por el Ministerio de Salud de la Nación (Res.2021-9APN SAS#MS). Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Tucumán (PIUNT G727), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnica (PIP 2321) y Consejo Federal de Ciencia, Tecnología e Innovación (COFECyT TU-04 PFI-2021).

CONFLICTOS DE INTERÉS

No existen conflictos de interés entre autores o con terceros.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M., Ji, M., Qin, P., Gu, Z., Liu, Y., Sikandar, A. y Javeed, A. (2019). Phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of *Citrullus colocynthis* L. and *Cannabis sativa* L. *Applied Ecology and Environmental Research* 17 (3): 6961-6979.
- Almeida, A. D. R., Maciel, M. V. D. O. B., Machado, M. H., Bazzo, G. C., de Armas, R. D., Vitorino, V. B. y Barreto, P. L. M. (2020). Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology* 55 (1): 340-347.
- Al Ubeed, H. M. S., Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Basu, A. y Vuong, Q. V. (2022). A comprehensive review on the techniques for extraction of bioactive compounds from medicinal *Cannabis*. *Molecules* 27 (3): 604.
- André, C. M., Hausman, J. F. y Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science* 7: 174167.
- André, A., Leupin, M., Kneubühl, M., Pedan, V. y 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. <https://doi.org/10.3390/plants9121740>
- Arbo, M., Gonzalez, M., Ocanto, N., Cáceres, A., Popoff, O., Rojas, J., ... y Sosa, M. (2019). Morfología de plantas vasculares (M. Arbo & S. Ferrucci, Eds.). Chaco-Corrientes- Argentina: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste.
- Biteznik, L., Dermastia, M. y Trdan, S. (2023). Secondary metabolites of hemp (*Cannabis sativa* L.) and their role in defence against pests and pathogens. *Acta Biologica Slovenica* 66 (1): 78.
- Cantele, C., Bertolino, M., Bakro, F., Giordano, M., Jędryczka, M. y Cardenia, V. (2020). Antioxidant effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) inflorescence extract in stripped linseed oil. *Antioxidants* 9 (11): 1131.
- Cerino, P., Buonerba, C., Cannazza, G., D'Auria, J., Ottoni, E., Fulgione, A., . y Gallo, A. (2021). A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis and cannabinoid research* 6 (1): 19-27.
- Citti, C., Russo, F., Sgrò, S., Gallo, A., Zanotto, A., Forni, F. y Cannazza, G. (2020). Pitfalls in the analysis of phytocannabinoids in *Cannabis* inflorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412 (17): 4009-4022.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de Técnicas de Histología Vegetal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- De Prato, L., Ansari, O., Hardy, G. E. S. J., Howieson, J., O'Hara, G. y

- Ruthrof, K. X. (2022). The cannabinoid profile and growth of hemp (*Cannabis sativa* L.) is influenced by tropical daylengths and temperatures, genotype and nitrogen nutrition. *Industrial Crops and Products* 178: 114605. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114605>
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M. y Walter Robledo, C. (2010). Infostat: software para análisis estadístico. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/10346>
- Flajšman, M. y Ačko, D. K. (2020). Influence of edaphoclimatic conditions on stem production and stem morphological characteristics of 10 European hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties. *Acta agriculturae Slovenica* 115 (2): 399-407. <http://ojs.aas.bf.uni-lj.si/index.php/AAS/article/view/1528/405>
- Flores-Sanchez, I. J. y Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry reviews* 7 (3): 615-639.
- Fordjour, E., Manful, C. F., Sey, A. A., Javed, R., Pham, T. H., Thomas, R. y Cheema, M. (2023). *Cannabis*: a multifaceted plant with endless potentials. *Frontiers in Pharmacology* 14: 1200269.
- Hacke, A. C. M., Lima, D., de Costa, F., Deshmukh, K., Li, N., Chow, A. M., ... y Kerman, K. (2019). Probing the antioxidant activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in *Cannabis sativa* extracts. *Analyst* 144 (16): 4952-4961. <https://doi.org/10.1039/c9an00890j>
- Hancock, J., Livingston, S. J. y Samuels, L. (2024). Building a biofactory: Constructing glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Current Opinion in Plant Biology* 80: 102549. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102549>
- Hazekamp, A. y Fishedick, J. T. (2012). *Cannabis* from cultivar to chemovar. *Drug testing and analysis* 4 (7-8): 660-667.
- Jin, D., Dai, K., Xie, Z. y Chen, J. (2020). Secondary metabolites profiled in *Cannabis* inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Scientific Reports* 10 (1): 1-14.
- Kobus, Z., Pecyna, A., Buczaj, A., Krzywicka, M., Przywara, A. y Nadulski, R. (2022). Optimization of the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Cannabis sativa* L. Leaves and Inflorescences Using Response Surface Methodology. *Applied Sciences* 12 (13): 6747.
- Lapierre, É., Monthony, A. S. y Torkamaneh, D. (2023). Genomics-based taxonomy to clarify *Cannabis* classification. *Genome* 66 (8): 202-211. <https://doi.org/10.1139/gen-2023-0005>
- Leme, F. M., Schönenberger, J., Staedler, Y. M. y Teixeira, S. P. (2020a). Comparative floral development reveals novel aspects of structure and diversity of flowers in Cannabaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 193 (1): 64-83.
- Leme, F. M., Borella, P. H., Marinho, C. R. y Teixeira, S. P. (2020b). Expanding the laticifer knowledge in Cannabaceae: distribution, morphology, origin, and latex composition. *Protoplasma* 257: 1183-1199. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01500-5>

- Livingston, S. J., Quilichini, T. D., Booth, J. K., Wong, D. C., Rensing, K. H., Laflamme-Yonkman, J., y Samuels, A. L. (2020). Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *The Plant Journal* 101 (1): 37-56. <https://doi.org/10.1111/tpj.14516>
- Martínez, A. S., Lanaridi, O., Stigel, K., Halbwirth, H., Schnürch, M. y Bica-Schröder, K. (2023). Extraction techniques for bioactive compounds of Cannabis. *Natural Product Reports* 40 (3): 676-717.
- 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. y 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. M. y Small, E. (2020). A Classification of Endangered High-THC Cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *indica*) Domesticates and Their Wild Relatives. *PhytoKeys* 144: 81-112. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.144.46700>
- Moher, M., Llewellyn, D., Jones, M. y Zheng, Y. (2022). Light intensity can be used to modify the growth and morphological characteristics of Cannabis during the vegetative stage of indoor production. *Industrial Crops and Products* 183: 114909. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114909>
- Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A. y Mandolino, G. (2008). Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica* 160: 231-240.
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K. y Naik, S. (2022). Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere* 289: 133012.
- Raman, V., Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A. y El Sohly, M. A. (2017). Morpho-anatomy of marijuana (*Cannabis sativa* L.). In *Cannabis sativa* L. *Botany and Biotechnology*: 123-136.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9-10): 1231-1237.
- Reed, J. (1914). Morphology of *Cannabis sativa* L. (Doctoral dissertation, State University of Iowa).
- Saloner, A. y Bernstein, N. (2021). Nitrogen supply affects cannabinoid and terpenoid profile in medical Cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products* 167: 113516. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113516>
- Sedan, D., Vaccarini, C., Demetrio, P., Morante, M., Montiel, R., Sauri, A. y Andrinolo, D. (2023). Cannabinoid content in Cannabis flowers and homemade Cannabis-based products used for therapeutic purposes in Argentina. *Cannabis and Cannabinoid Research* 8 (1): 197-206.

- Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Spano, M., Di Matteo, G., Ingallina, C., Botta, B., Quaglio, D., Ghirga, F., y Sobolev, A. P. (2021). A multimethodological characterization of *Cannabis sativa* L. inflorescences from seven dioecious cultivars grown in Italy: The effect of different harvesting stages. *Molecules* 26 (10): 2912.
- Spitzer-Rimon, B., Duchin, S., Bernstein, N. y Kamenetsky, R. (2019). Architecture and florogenesis in female *Cannabis sativa* plants. *Frontiers in plant science* 10: 350.
- Trancoso, I., de Souza, G. A., dos Santos, P.R., dos Santos, K. D., de Miranda, R. M. D. S. N., da Silva, A. L. P. M., Zsolt Santos, D., Garcia Tejero, I. F. y Campostrini, E. (2022). *Cannabis sativa* L.: Crop management and abiotic factors that affect phytocannabinoid production. *Agronomy* 12 (7): 1492. <https://doi.org/10.3390/agronomy12071492>
- Vaccarini, C., Mercado, M. I., Ponessa, G., Pinto Alman, L., Sedan, D. y Andrinolo, D. (2023). Caracterización histoquímica y morfoanatomica de hojas y flores femeninas de tres cepas argentinas terapéuticas de *Cannabis*. *Cannabis y Salud* 2: 66-75. <https://heyzine.com/flip-book/9536cea987.html#page/67>
- Wagner, H. y Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media.
- Woisky, R. G. y Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37 (2): 99-105.
- Zagórska-Dziok, M., Bujak, T., Ziemlewska, A. y Nizioł-Łukaszewska, Z. (2021). Positive effect of *Cannabis sativa* L. herb extracts on skin cells and assessment of cannabinoid-based hydrogels properties. *Molecules* 26 (4): 802.
- Zarlavsky, G. (2014). Histología Vegetal. Técnicas simples y complejas, Buenos Aires, Argentina.