OPTIMIZAREA EXTRACȚIEI ASISTATE CU ULTRASUNETE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN SEMINȚELE DE *CANNABIS SATIVA L.*

OPTIMIZATION OF THE ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *CANNABIS SATIVA L.* SEEDS

CZU: 542.943'78:633.854.434 **https://doi.org/10.59295/spd2025e.92**

Angela LIS
ORCID: 0000-0003-1111-7485
E-mail: angela.lis@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Viorica GLADCHI
ORCID: 0000-0002-5847-4466
E-mail: viorica.gladchi@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Elena BUNDUCHI
ORCID: 0000-0003-2275-9918
E-mail: elena.bunduchi@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Vladislav BLONSCHI
ORCID: 0000-0001-8628-6756
E-mail: vlad.blonschi@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Summary.*This study investigates the application of modern extraction techniques for isolating bioactive compounds from Cannabis sativa L. (hemp) seeds and characterizes the resulting extracts in terms of total phenolic content, flavonoid concentration, and antioxidant activity. The results demonstrate that hemp seed extracts contain a diverse range of biologically active compounds, including approximately 239 mg GAE/g seeds of polyphenols and 177 mg QE/g seeds of flavonoids. The ultrasound-assisted extraction (UAE) method was optimized using a 50% ethanol and water solvent system, which enhanced the recovery of these compounds. Furthermore, the antioxidant capacity of the extracts was confirmed via the ABTS cation radical decolorization assay, with inhibition values ranging from 9.55% to 101.91%, indicating a strong potential for use in cosmetic products.*

Keywords*: Cannabis sativa L., antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, ABTS.*

INTRODUCERE

Cânepa (*Cannabis sativa L.*) este o plantă erbacee din familia *Cannabaceae*, cultivată pe scară largă la nivel global. În ultimele decenii, interesul științific pentru această specie a crescut considerabil, ca urmare a valorii sale nutriționale, farmaceutice și cosmetice. Deși, în mod tradițional, cânepa era cultivată pentru obținerea fibrelor textile din tulpină și a uleiului din semințe, multiplele sale utilizări terapeutice sunt documentate de peste 5000 de ani [1].

Semințele de cânepă sunt mici, rotunde, de culoare maro închis, având un diametru cuprins între 3 și 5 mm. Acestea conțin 20–38% proteine, 30–40% fibre și 19–38% ulei. Studiile arată că coaja semințelor conține o cantitate mai mare de polifenoli decât miezul. În compoziția plantei se regăsesc numeroși compuși fenolici, precum acizi fenolici, amide fenolice, flavonoide (flavone, flavanoli, flavanone) [1, 2]. Dintre compușii bioactivi specifici *Cannabis sativa L.*, canabinoizii (fitocanabinoizii) ocupă un loc central. Cei mai cunoscuți sunt tetrahidrocanabinolul (THC) și canabidiolul (CBD). Extractele din frunze și inflorescențe de cânepă industrială sunt bogate în terpene volatile și fitocanabinoide, CBD-ul fiind apreciat pentru numeroasele proprietăți terapeutice. Produsele care conțin CBD, precum uleiuri, creme, unguente sau capsule, sunt asociate cu ameliorarea unor afecțiuni dermatologice (eczeme, psoriazis), inflamatorii (artrită reumatoidă), oncologice sau neurologice (scleroză multiplă). Pe lângă canabinoizi, cânepa conține o gamă variată de compuși bioactivi valoroși, precum polifenoli, flavonoide, peptide bioactive, tocoferoli, carotenoizi și fitosteroli, al căror conținut este influențat de factori genetici și agroecologici. Inflorescențele soiurilor industriale sunt o sursă importantă de polifenoli, responsabili pentru efectele antioxidante, antiinflamatoare, neuroprotectoare, antihipertensive, antiproliferative și hipocolesterolemiante [1-3].

Interesul crescut pentru utilizarea ingredientelor naturale în industria cosmetică a condus la dezvoltarea unor tehnologii moderne și ecologice pentru extracția compușilor activi. Metodele convenționale, bazate pe solvenți organici și temperaturi ridicate, pot duce la degradarea compușilor sensibili. Din acest motiv, tehnologiile verzi de extracție, cu eficiență crescută și impact redus asupra mediului, au devenit o alternativă viabilă. Dintre acestea, extracția asistată cu ultrasunete (UAE) s-a remarcat prin avantajele sale multiple: timp redus de extracție, temperaturi scăzute, consum minim de solvent și energie, și eficiență ridicată în extragerea compușilor termolabili. În plus, UAE contribuie la inactivarea enzimelor degradative și a microorganismelor, ceea ce poate extinde perioada de valabilitate a extractelor. Mai multe studii confirmă eficiența metodei UAE în extragerea canabinoizilor și flavonoidelor din frunze și inflorescențe de *Cannabis sativa L.* [1-3].

În acest context, scopul prezentului studiu constă în optimizarea procesului de extracție a compușilor cu activitate antioxidantă din semințele de *Cannabis sativa L.*, caracterizarea compoziției chimice a extractelor obținute și evaluarea potențialului acestora de utilizare în formulări cosmetice de tip cremă.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetarea a fost efectuată în Laboratorul de Cercetări Științifice a Departamentului Chimie Industrială și Ecologică „Academician Gheorghe Duca", Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Universitatea de Stat din Moldova.

Reactivi și aparate

Substanțele utilizate în studiu au fost chimic pure. Semințe de cânepă (*Cannabis sativa L.*), supliment alimentar procurat de la distribuitorul „MIRA OSF SRL", carbonat de sodiu; nitrit de sodiu; persulfat de potasiu; acid clorhidric; clorură de aluminiu; hidroxid de sodiu (NaOH); alcool etilic (C_2H_5OH), *Ecochimie;* 3-etilbenzotiazolina-6-acid sulfonic (ABTS); reactivul Folin-Ciocâlteau; trolox; *Sigma-Aldrich, Germania*. Omogenizator, model IKA Eurostar 60 digital; ultrasonificator, model JP Selecta; pH-metru, model Consort C11; cântar analitic; etuvă model SNOL 4/1300; exicator; termostat, model Memmert WTB6; centrifugă, model Gyrozen 416; spectrofotometru UV-VIS model T80+, baie ultrasonică cu încălzire Bandelin Sonorex.

Organizarea experimentului

Prepararea extractelor

Semințele de *Cannabis sativa L.* au fost măcinate fin într-un mojar de porțelan, după care s-au cântărit probe reprezentative de material vegetal. Acestea au fost tratate cu un solvent hidroalcoolic (etanol 50%) sau cu apă distilată, în rapoarte solid–lichid 1. Amestecul rezultat a fost supus extracției asistate cu ultrasunete (UAE), utilizând un generator cu frecvență controlată (30 kHz), timp de 10–60 minute, la temperatura constantă de 40 °C. După tratament, probele au fost răcite la temperatura camerei, filtrate prin hârtie de filtru și extractele lichide colectate. Extractele au fost concentrate prin evaporare, conform metodologiei descrise în literatura de specialitate [2, 3].

Determinarea conținutului total de compuși fenolici (CTP)

Cantitatea totală de compuși fenolici a fost determinată prin metoda Folin–Ciocâlteu. În mediu bazic, compușii fenolici reduc ionii de molibden, formând un complex albastru, cu absorbție maximă în intervalul 750–765 nm. Acidul galic a fost utilizat ca standard de referință, iar rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți acid galic/L de extract (mg EAG/L), pe baza ecuației dreptei $y = 0{,}005x + 0{,}0112$, *(R^2 = 0,9972)* obținute din curba de etalonare [4].

Determinarea conținutului total de flavonoide (CTF)

Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin metoda colorimetrică cu clorură de aluminiu. Reacția dintre flavonoide și ionii de aluminiu conduce la formarea unui complex stabil, detectabil spectrofotometric. Quercetina a fost utilizată ca standard, iar rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți quercetină/L de extract (mg EQ/L), calculându-se pe baza ecuației dreptei *y=0,016x+0,0574; (R^2=0,9912)*, din curba de etalonare [5].

Evaluarea activității antioxidante

Activitatea antioxidantă a fost evaluată utilizând metoda cation radicalului ABTS$^{\bullet+}$. Metoda se bazează pe capacitatea antioxidanților din extract de a reduce radicalii ABTS$^{\bullet+}$, determinând o scădere de absorbție măsurabilă spectrofotometric [6].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Această cercetare are ca obiectiv evaluarea compoziției extractelor obținute din semințele de *Cannabis sativa L.*, investigarea influenței unor parametri operaționali asupra procesului de extracție în vederea optimizării randamentului de compuși fenolici și explorarea potențialului de aplicare a acestora în industria cosmetică.

În etapa preliminară a fost evaluată calitatea semințelor prin analiza caracteristicilor organoleptice, iar conținutul de umiditate a fost determinat prin metoda gravimetrică. Rezultatele au arătat că semințele utilizate prezentau un conținut de umiditate de 5,59%, ceea ce indică o stare corespunzătoare pentru extracție. Conform recomandărilor privind păstrarea, umiditatea semințelor de cânepă trebuie să fie sub 10%, pentru a preveni degradarea și contaminarea microbiologică (bacterii, mucegaiuri). Astfel, semințele analizate au respectat standardele de depozitare.

Procedura de extracție a fost realizată la temperatura de 40 °C, utilizând sonicare cu frecvență controlată, în prezența celor doi solvenți menționați. Pentru determinarea raportului optim solid–lichid (S/L), au fost testate mai multe variante: 1:20, 1:15, 1:10, 1:7,5 și 1:5 (m/v).

Fiecare dintre probele pregătite pentru extracție a fost supusă tratamentului cu ultrasunete pentru durate diferite: 10, 20, 30, 40 și 60 de minute. Temperatura în timpul tratamentului a fost menținută constantă 40 °C, iar frecvența ultrasunetelor utilizate a fost de 30 kHz. După tratamentul cu ultrasunete, toate probele au fost filtrate și utilizate pentru determinările cantitative.

Determinarea conținutului total de compuși fenolici (CTP)

Extractele obținute s-au folosit pentru determinarea CTP prin metoda cu utilizare a reactivului Folin-Ciocâlteau, rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. CTP în extractele din semințe de cânepă, pretratate cu ultrasunet timp de 10-60 min, metoda Folin-Ciocâlteau **[*date proprii*]**

	nr. probei	**Solvent C_2H_5OH**					**Solvent H_2O**
		10 min	20 min	30 min	40 min	60 min	40 min
C_{tot} de polifenoli, mg EAG/g semințe	1	8	7	38	73	73	123
	2	28	19	29	82	44	239
	3	28	26	53	88	39	150
	4	10	57	56	38	50	123
	5	54	44	50	75	73	34

1 – 1:20 S/L; 2 – 1:15 S/L; 3 – 1:10 S/L; 4 – 1:7,5 S/L, 5 – 1:5 S/L.

Rezultatele obținute indică faptul că cea mai eficientă extracție a polifenolilor s-a realizat atunci când raportul solid–lichid (S/L) a fost de 1:10 și a atins valori de până la 88 mg EAG/g, conținut similar cu cele prezentate în literatura de specialitate. Atât creșterea, cât și reducerea acestui raport au condus la scăderea conținutului total de polifenoli în extract. La fel s-a stabilit că timpul optim de pretratare cu ultrasunete este 40 min.

Comparând extractele hidroalcoolice cu cele apoase, s-a constatat că conținutul de polifenoli a fost de aproximativ două până la trei ori mai mare în extractele apoase și a atins valori de până la 239 mg EAG/g semințe de cânepă, care sunt de 2 – 3 ori mai mare decât cele raportate în literatură. La fel s-a stabilit că raportul optim solid–lichid (S/L) atunci când apa s-a folosit în calitate de solvent, a fost de 1:15. Acest rezultat poate fi explicat prin localizarea polifenolilor predominant în stratul extern al semințelor (coajă), sub formă de compuși solubili în apă, cum ar fi acidul ferulic, acidul cafeic ș.a. Acești compuși prezintă caracter polar, fiind extrași mai eficient în apă, în special dacă sunt prezenți sub formă de glicozide. Aplicarea ultrasunetelor a condus la creșterea eficienței extracției apoase, prin efectul de cavitație care determină schimbarea structurii seminței și favorizează transferul de masă. De asemenea, tratamentul cu ultrasunete facilitează eliberarea polifenolilor localizați în vacuole sau legați de macromolecule celulare.

Conținutul de polifenoli din extractele apoase obținute din semințele de cânepă a fost cuprins în intervalul 34 – 239 mg EAG/g semințe de cânepă. Pe baza rezultatelor experimentale, extracțiile ulterioare au fost realizate utilizând un timp de pretratare cu ultrasunete de 40 de minute.

Determinarea conținutului total de flavonoide (CTF)

Conținutul total de flavonoide (CTF) din extractele obținute a fost determinat utilizând metoda bazată pe reacția cu clorura de aluminiu, care formează complexe stabile cu flavonoidele, cuantificabile spectrofotometric. Această metodă este frecvent utilizată în analiza flavonoidelor datorită specificității și sensibilității înalte. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. CTF în extractele din semințe de cânepă, pretratate cu ultrasunet timp 40 min, metoda cu clorura de aluminiu **[*date proprii*]**

Extractele	**Nr. probei**	**[Flavonoide], mg EQE/g semințe**
Extracte hidroalcoolice	1	24,6
	2	26,3
	3	12,4
	4	26,9
	5	20,9
Extracte apoase	1	82,0
	2	177,9
	3	105,6
	4	103,9
	5	79,1

1 – 1:20 S/L; 2 – 1:15 S/L; 3 – 1:10 S/L; 4 – 1:7,5 S/L, 5 – 1:5 S/L.

Rezultatele obținute indică faptul că conținutul flavonoidelor în extractele etanolice din semințele de cânepă este moderat, variind între 12,84 și 26,9 mg EQ/g semințe de cânepă, dar sunt mai mari decât cele raportate în literatura de specialitate. Această concentrație relativ redusă este justificată prin faptul că semințele conțin flavonoide în cantități mai mici comparativ cu frunzele sau părțile aeriene ale plantei. Deși etanolul favorizează extracția compușilor fenolici mai puțin polari, randamentul global al extracției rămâne scăzut în cazul flavonoidelor din semințe.

În contrast, extractele apoase au prezentat un conținut semnificativ mai ridicat de flavonoide, cu valori cuprinse între 79,1 și 177,9 mg EQ/L. Acest rezultat poate fi atribuit solubilității ridicate a flavonoidelor glicozilate în apă, combinată cu efectul cavitației ultrasunetelor, care facilitează degradarea pereților celulari și eliberarea compușilor activi în mediu lichid.

Pe baza acestor date, s-a stabilit că parametrii optimi pentru obținerea extractelor din semințele de cânepă sunt: raportul solid–lichid (S/L) de 1:15, pretratare cu ultrasunete timp de 40 de min și utilizarea apei distilate ca solvent.

Evaluarea activității antioxidante

Una dintre metodele recunoscute la nivel internațional pentru determinarea activității antioxidante este metoda bazată pe utilizarea cation radicalului ABTS (*2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic acid)*). Această tehnică permite evaluarea activității antioxidante totale (AAT) a probelor analizate. Folosind troloxul ca standard de referință, s-au determinat concentrațiile echivalente de antioxidanți în extractele obținute din semințele de cânepă (mM ET) și procentul de inhibiție (%) a cation radicalului ABTS. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Activitatea antioxidantă totală, concentrația antioxidanților recalculată în mM ET și procentul de inhibiție a extractelor din semințe de cânepă [*date proprii*]

Solventul	Nr. probei	C., mM ET	AAT	Inhibiția, %
Alcool etilic (50%)	1	0,48	0,12	12,99
	2	0,85	0,24	25,09
	3	0,81	0,23	23,82
	4	0,73	0,20	21,14
	5	1,36	0,41	41,65
Apă distilată	1	0,62	0,17	17,57
	2	1,92	0,59	68,78
	3	1,58	0,48	57,32
	4	1,89	0,58	67,51
	5	2,94	0,92	101,91

1 – 1:20 S/L; 2 – 1:15 S/L; 3 – 1:10 S/L; 4 – 1:7,5 S/L, 5 – 1:5 S/L.

Rezultatele obținute indică faptul că, odată cu creșterea concentrației extractelor testate, capacitatea de inhibiție a cation-radicalului ABTS crește corespunzător, înregistrând valori cuprinse între 9,55% și 101,91%. Aceste date se aliniază cu valorile raportate în literatura de specialitate, confirmând faptul că extractele din semințe de cânepă prezintă o activitate antioxidantă totală (AAT) remarcabilă. Similar cu tendințele observate pentru conținutul total de polifenoli (CTP) și flavonoide (CTF), activitatea antioxidantă este semnificativ mai ridicată în cazul extractelor apoase comparativ cu cele hidroalcoolice. Astfel, în timp ce extractele obținute cu etanol 50% au prezentat o inhibiție cuprinsă între 12% și 41%, cele cu apă distilată au înregistrat valori mult mai mari, între 9,55% și 101,91%. Această diferență poate fi explicată prin solubilitatea crescută în apă a polifenolilor cu caracter polar, în special a celor glicozilați, care sunt responsabili în mare măsură de activitatea antioxidantă. De asemenea, aplicarea ultrasunetelor sporește eficiența extracției, contribuind la eliberarea compușilor activi din matricea vegetală.

Astfel, extractele apoase din semințe de *Cannabis sativa L.* se dovedesc a fi surse valoroase de compuși bioactivi cu potențial antioxidant și pot fi utilizate eficient în formulări cosmetice cu efecte protectoare și anti-aging.

CONCLUZII

Ca rezultat al studiului, au fost stabilite condițiile optime de extracție a compușilor fenolici din semințele de *Cannabis sativa L.*, și anume: raport solid–lichid (*S/L*) de 1:15, pretratare cu ultrasunete timp de 40 de minute, utilizând apă distilată ca solvent.

Analiza compozițională a extractelor a evidențiat un conținut total de polifenoli, în condițiile optime de extracție, de aproximativ 239 mg EAG/g semințe, dintre care flavonoidele au reprezentat 178 mg EQE/g de semințe, ceea ce subliniază potențialul fitochimic al acestora.

Activitatea antioxidantă a extractelor din semințe de *Cannabis sativa L.* a fost confirmată prin metoda ABTS, valorile capacității antioxidante totale (AAT) fiind exprimate ca echivalent trolox (ET) și s-au încadrat în intervalul 0,086–0,407 mM ET. Totodată, procentul de inhibiție al cation radicalului ABTS a variat între 9,55% și 101,91%, ceea ce demonstrează o capacitate antioxidantă ridicată, în special în cazul extractelor apoase pretratate cu ultrasunete.

Datele obținute demonstrează că extractele apoase din semințele de *Cannabis sativa L.* constituie surse valoroase de compuși bioactivi cu activitate antioxidantă, ceea ce le recomandă pentru utilizare în produse cosmetice cu efecte protectoare, antiinflamatorii și anti-aging.

REFERINȚE:

1. TĂNASE APETROAEI, V., PRICOP, E. M., ISTRATI, D. I., VIZIREANU, C. Hemp Seeds (Cannabis sativa L.) as a Valuable Source of Natural Ingredi-

ents for Functional Foods—A Review. In: Molecules, 29(9), 2024. https://doi.org/10.3390/molecules29092097.
2. KOBUS, Z., PECYNA, A., BUCZAJ, A., KRZYWICKA, M., PRZYWARA, A., NADULSKI, R. Optimization of the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cannabis sativa L. Leaves and Inflorescences Using Response Surface Methodology. In: *Applied Sciences*, 2022, 12(13), 6747. https://doi.org/10.3390/app12136747.
3. Umar, M., Fikry, M., Phonsatta, N., Panya, A., Alqahtani, N., Jafari, S., Assatarakul, K. Ultrasonic-Assisted extraction of bioactive compounds from hemp seeds: Process optimization, energy efficiency, and antioxidant activity evaluation. In: *Separation and Purification Technology*, 2025, Volume 365. ISSN 1383-5866.
4. KUPINA, S., FIELDS, C., ROMAN, M., BRUNELLE, S. Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. In: *Journal of AOAC International*, 2019, 1(102), pp. 320-321. https://doi.org/10.1093/jaoac/102.1.320.
5. AMJAD, S., TALAAT, A., MIZANUR, R., YOUSEF, H. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. In: *LWT - Food Science and Technology*, 111932(150), 2021, pp. 1-11. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932.
6. BOLIGON, A., MACHADO, M., ATHAYDE, M. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. In: *Medicinal chemistry*, 2014, 7(4), pp. 517-522. http://dx.doi.org/10.4172/2161-0444.1000188.

N.B. *Lucrarea a fost efectuată în cadrul proiectului 010603 „Identificarea Procedeelor Tehnologice de Tratare, Formare a Calităţii şi Cantităţii Apelor şi Cercetări Avansate în Chimia Computațională și Ecologică”, finanțat de ANCD.*