

EXTRACCIÓN HIDROETANÓLICA DE POLIFENOLES DE SEMILLAS DE CÁÑAMO (*CANNABIS SATIVA* L.)

*HYDROETHANOLIC EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM HEMP
SEEDS (CANNABIS SATIVA L.)*

RESUMEN

El cultivo comercial de cannabis (*Cannabis sativa* L.) se reconoce por su gran interés comercial y científico. Entre los compuestos de interés que se pueden encontrar en esta especie sobresalen los polifenoles, los cuales son componentes estructurales de su pared celular y poseen propiedades funcionales y bioactivas como antioxidante, anti-inflamatorio, neuroprotector y hepatoprotector. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar las condiciones de extracción hidroetanólica asistida por calor de polifenoles totales. Se aplicó el diseño experimental de Box-Behnken considerando tres variables influyentes en la extracción de compuestos fenólicos (tiempo de extracción, temperatura y concentración de etanol). Como variable respuesta se consideró el contenido de polifenoles totales determinada por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados del diseño proporcionaron como condiciones óptimas en las variables estudiadas las siguientes: 50 °C, 50 % de EtOH y 5 h de tiempo de extracción, alcanzando rendimiento de polifenoles totales igual a 25.60 mg de equivalente de ácido gálico/g de materia prima. Los resultados de estudio muestran potencial de semilla de cáñamo con fuente de compuestos bioactivos con potencialidades de uso en la industria farmacéutica o nutracéutica.

Palabras clave: *Cannabis sativa* L; extracción; polifenoles totales.

ABSTRACT

HOMERO CHÁVEZ CHAO

DANIA ALONSO ESTRADA

NAYRA OCHOA VIÑALS

ANNA ILINÁ

CRISTÓBAL AGUILAR

GONZÁLEZ

ELDA SEGURA CENICEROS

ELÁN IÑAKI ALCALÁ

MAYELA GOVEA SALAS

CYNTHIA BARRERA

MARTÍNEZ

ROBERTO ARREDONDO

VALDÉS

Facultad de Ciencias
Químicas, Unidad Sureste,
UAdeC.

Universidad La Salle,
Saltillo, Coah.

Correspondencia
r-arredondo@uadec.edu.mx
ORCID 000-0003-4093-0707

The commercial cultivation of cannabis (*Cannabis sativa* L.) is recognized for its great commercial and scientific interest. Among the compounds of interest found in this species, polyphenols stand out, which are structural components of its cell wall and have functional and bioactive properties such as antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, and hepatoprotective. The present study aims to evaluate the conditions of heat-assisted hydroethanolic extraction of total polyphenols. The Box-Behnken experimental design was applied considering three influencing variables in the extraction of phenolic compounds (extraction time, temperature, and ethanol concentration). The total polyphenol content determined by the Folin-Ciocalteu method was considered a response variable. The design results provided the following optimal conditions for the variables studied: 50 °C, 50% EtOH, and 5 h extraction time, achieving a total polyphenol yield equal to 25.60 mg of gallic acid equivalent/g of raw material. The study results show the potential of hemp seed as a source of bioactive compounds with potential use in the pharmaceutical or nutraceutical industry.

Keywords: *Cannabis sativa* L., extraction, total polyphenols

INTRODUCCIÓN

Cannabis sativa L., una planta herbácea anual de la familia *Cannabaceae*, tiene una gran importancia histórica. Originaria de Asia occidental y central, se ha cultivado en todo el mundo durante más de 4500 años. Sus diversos usos, que van desde fibras textiles y aceites hasta biocombustibles, biocompuestos, papel, alimentos funcionales y cosméticos, la convierten en un fascinante tema de estudio (Abdollahi y col., 2020). En los últimos años, las semillas de cáñamo han ganado atención debido a su intrigante composición nutricional derivada de sus componentes bioactivos, ácidos grasos esenciales y tocoferoles. Estos componentes, con sus posibles beneficios para la salud, los convierten en una excelente opción para consideraciones dietéticas humanas (Sundar y col., 2024). Pueden inhibir las reacciones de radicales libres, lo que contribuye a mejorar el perfil nutricional, el atractivo sensorial general y la resistencia a la oxidación. Se ha demostrado que los tocoferoles reducen el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Son

antioxidantes ampliamente reconocidos que ofrecen protección contra la oxidación de ácidos grasos insaturados durante el procesamiento y el almacenamiento (Özdemir y col., 2021).

La optimización de la extracción de los compuestos polifenólicos de semillas de cáñamo contribuye al desarrollo de procesos más efectivos y eficientes para producir estos componentes beneficiosos de uso medicinal y alimentario (Rao y col., 2021).

El proceso convencional de extracción sólido-líquido asistido solo por calor es un método común en la extracción de los compuestos bioactivos (Tapia-Quirós y col., 2024).

Existe una amplia variedad de diseños de experimentos que son herramientas estadísticas efectivas para la optimización de procesos complejos. Estos métodos de análisis están compuestos por un conjunto de combinaciones entre los niveles de factores que influyen sobre una variable de respuesta a analizar, a través de una estructura de datos óptima para obtener un modelo estadístico con el menor número de pruebas (Souissi y col., 2018). Las herramientas estadísticas son efectivas para realizar y optimizar los factores de ensayos experimentales para identificar las variables que afectan los procesos de extracción (Ngoc y col., 2019).

El presente estudio utiliza la metodología de superficie de respuesta en conjunto con el diseño compuesto central para identificar las condiciones experimentales óptimas para la extracción de compuestos polifenólicos a partir de semilla de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) con el propósito de maximizar la presencia de los compuestos fenólicos en el extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material biológico

La semilla utilizada en este estudio fue *Cannabis sativa* L de la marca BeHemp de la tienda de productos naturales (Saltillo, Coahuila). Para asegurar una mayor superficie de contacto, la semilla fue molida hasta obtener un polvo. La muestra molida se mantuvo alejada de la luz y la

humedad.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Una vez pulverizada, 1 g de semilla molida se suspendió en 40 mL de la solución de extracción (mezcla de agua destilada y etanol). Las condiciones de extracción se definen en la Tabla 1, considerando el porcentaje de etanol en la solución de extracción, el tiempo de extracción, la temperatura como parámetros controlados. Después de la extracción, las soluciones se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y posteriormente se decantó la parte líquida del extracto.

DISEÑO DEL EXPERIMENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio se utilizó el diseño de Box-Behnken para estudiar los principales efectos e interacciones entre los parámetros que influyen en el proceso de extracción de compuestos polifenólicos de la semilla de cáñamo (*Cannabis sativa*). Las variables experimentales y sus niveles para cada ensayo de extracción se determinaron utilizando la metodología de superficie de respuesta combinada con el diseño Box-Behnken aplicado para la extracción sólido-líquido de polifenoles de la semilla de cáñamo *Cannabis sativa* L. con calor.

Tabla 1. Diseño experimental de Box-Behnken con los niveles correspondientes para variables independientes en el proceso de extracción sólido-líquido a diferentes temperaturas (bajo (-1), medio (0) y alto (+1)).

VARIABLE	Unidades	VALORES DE LOS NIVELES CODIFICADOS		
		-1	0	1
Tiempo de extracción	h	12	30	48
Porcentaje de etanol	%	50	75	100
Temperature de extracción	° C	30	50	70

En el diseño las variables se aplicaron en tres niveles (bajo, medio y alto, codificados, respectivamente, como -1, 0 y +1, como se muestra en la Tablas 1.

El número de experimentos en el diseño de Box-Behnken fue igual a 15, incluyendo experimentos centrales triplicados, para optimizar el nivel de variables seleccionadas. Se seleccionaron parámetros que juegan un papel importante en el proceso de extracción: tiempo de extracción (A, h), porcentaje de etanol en la solución extractante (B, %) y temperatura de extracción (C, °C). Como variable de respuesta se consideró total de polifenoles (Y1).

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES (CPT)

Para determinar los polifenoles totales, los extractos etanólicos de semilla de cáñamo (*Cannabis sativa*) se sometieron al método de Folin-Ciocalteu descrito por Arredondo-Valdés y col. (2021) con algunas modificaciones. Se mezclaron 10 µL de extracto con 60 µL de Na₂CO₃ (15 % p/v), 15 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 200 µL de agua destilada. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 45 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, USA). El estándar utilizado fue ácido gálico (FagaLab) a concentraciones de 100 a 2000 mg/ml para trazar una curva de calibración. El contenido de polifenoles totales (PTC) se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG)/g de peso húmedo de semilla de cáñamo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de la variable respuesta (concentración de polifenoles totales) se empleó la metodología de superficie de respuesta, haciendo uso del software estadístico Minitab (versión 19) para generar el diseño experimental, los análisis estadísticos de datos y el modelo de regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 muestra resultados de contenido de polifenoles en los extractos obtenidos por el método sólido-líquido bajo el diseño de experimento de Box Behnken .

Tabla 2. Resultados de extracción de polifenoles (equivalente a mg ácido gálico/ por g de materia prima) de acuerdo al diseño de Box Behnken del proceso de extracción etanolica a diferentes temperaturas.

No. de ensayo	Factores			PTC	Abs
	Tiempo (h)	% EtOH (v/v)	Temperatura (°C)	(mg EAG/ g)	($\lambda = 750$ nm)
1	12	50	50	3.65 $\pm$ 0.14	0.16
2	48	50	50	3.48 $\pm$ 0.02	0.15
3	12	100	50	11.62 $\pm$ 1.07	0.58
4	48	100	50	15.94 $\pm$ 0.96	0.81
5	12	75	30	4.54 $\pm$ 1.25	0.2
6	48	75	30	2.92 $\pm$ 0.09	0.12
7	12	75	70	3.89 $\pm$ 0.18	0.17
8	48	75	70	4.45 $\pm$ 1.27	0.2
9	30	50	30	3.39 $\pm$ 0.07	0.14
10	30	100	30	11.74 $\pm$ 0.22	0.59
11	30	50	70	12.53 $\pm$ 0.89	0.63
12	30	100	70	12.22 $\pm$ 0.85	0.62
13	30	75	50	3.26 $\pm$ 0.03	0.13
14	30	75	50	2.86 $\pm$ 0.15	0.11
15	30	75	50	4.01 $\pm$ 0.59	0.17

Cada conjunto de experimentos se realizó por triplicado; los datos que se muestran corresponden al promedio de las tres mediciones. Las medias de desviación estándar relativas obtenidas a partir de concentración de fenoles totales y absorbancias son menores al 5%.

El análisis de los resultados experimentales permitió el cálculo de los coeficientes del modelo de regresión. La Tabla 3 muestra el valor p para cada factor, los términos cuadráticos, su combinación, y el coeficiente de determinación del R cuadrado para el modelo obtenido del estudio experimental.

Tabla 3. Coeficientes de regresión.

Modelo parámetros	p-value ($\alpha \leq 0.05$)
	PTC (mg EAG/ g)
Modelo	0.057
Lineal	0.042
A (tiempo)	0.688
B (% etanol)	0.011

C (temperatura)	0.207
Cuadrado	0.039
A ²	0.797
B ²	0.008
C ²	0.514
Interacción de dos factores	0.380
AB	0.421
AC	0.688
BC	0.152
R-square	0.89

Los valores de p de las variables estadísticamente significativas son aquellos $< 0,05$ y están marcados en negrita. Debido a la importancia del valor p, el modelo sugiere que existe incidencia significativa debido al factor porcentaje de etanol.

Se demuestran efectos combinados entre los factores y cada uno de los factores por separado sobre la concentración de polifenoles totales (PTC) en el extracto. Se observó que B y B² presenta un efecto significativo sobre la variable respuesta por lo que un aumento de estas provoca el mismo efecto en la concentración de polifenoles totales presentes en el extracto, favoreciendo así el proceso de extracción. El efecto de los factores y de las interacciones AB, AC, BC, no resultaron significativas, lo que significa que para obtener mayor contenido de polifenoles totales resulta conveniente operar con valores bajos de dichos parámetros.

Se obtuvo la ecuación con los valores de los coeficientes del modelo de regresión, correspondiente a la concentración de polifenoles totales. Por consiguiente el modelo reportado por el programa estadístico para determinar la concentración de polifenoles totales en el extracto fue:

$$\begin{aligned}
 & \text{PTC} \\
 & = 36.2 - 0.174 A - 1.074 B + 0.111 C - 0.00112 A^2 + 0.00905 B^2 \\
 & + 0.00234 C^2 + 0.00249 AB + 0.00151 AC - 0.00433 BC
 \end{aligned}$$

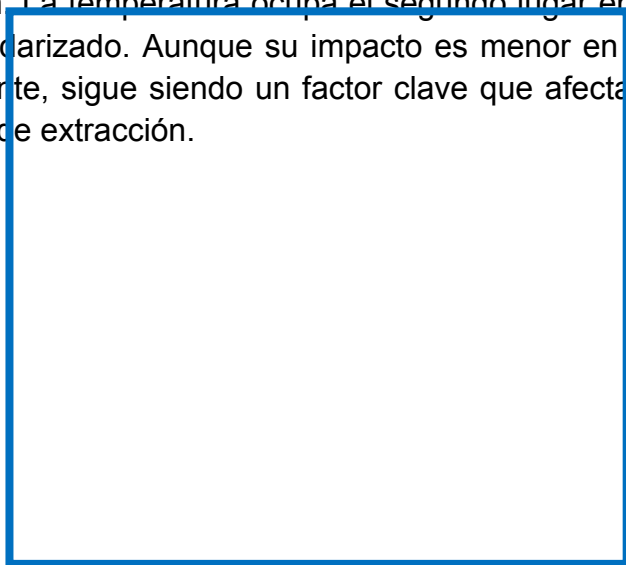
Donde

A - tiempo de extracción (h), B - porcentaje de etanol en la solución extractante (%) y C - temperatura de extracción (°C).

Los resultados de análisis de varianza muestran el coeficiente de determinación (R^2) de 0.89 indicando que el modelo obtenido ofrece un ajuste adecuado en el intervalo evaluado para la variable independiente (Nuñez Moreira y col., 2019).

El análisis realizado permitió obtener el gráfico de análisis de los efectos estandarizados, de efectos principales que muestran los efectos de las variables independientes sobre la variable de respuesta dependiente evaluada. Figura 1 muestra el gráfico de pareto del comportamiento de la concentración de polifenoles totales en función de las tres variables los tiempo, etanol y temperatura, así como sus interacciones.

La Figura 1 muestra que la concentración de etanol (B) es el factor con el mayor efecto estandarizado. Esto sugiere que la concentración de etanol tiene una gran influencia en la extracción de polifenoles totales. Es el factor más importante a considerar y probablemente debe ser optimizado para mejorar los resultados de la extracción. La interacción etanol-etanol (BB) también muestra un efecto significativo, lo que sugiere que no solo la concentración de etanol influye en la extracción, sino también la forma en que se combinan diferentes concentraciones de etanol. Esta interacción debe ser tomada en cuenta para optimizar la extracción. La temperatura ocupa el segundo lugar en términos de efecto estandarizado. Aunque su impacto es menor en comparación con el solvente, sigue siendo un factor clave que afecta la eficiencia del proceso de extracción.



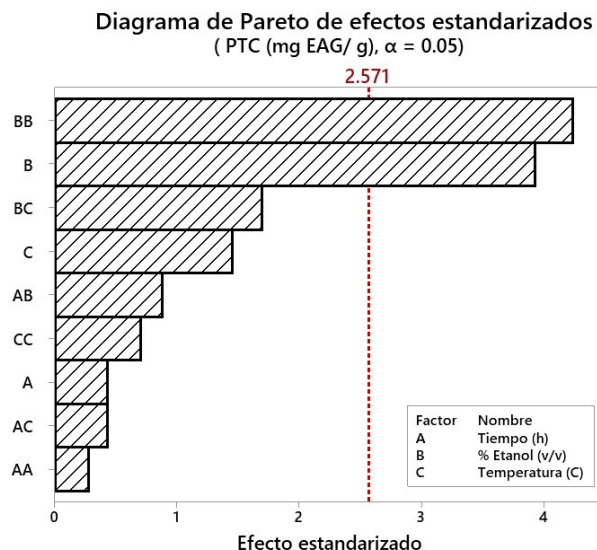


Figura 1. Efecto de las variables independientes tiempo, temperatura, concentración de etanol y sus interacciones en la concentración de polifenoles totales.

La Figura 2 se muestra la superficie de contorno correspondiente al comportamiento de la concentración de polifenoles totales en función de los niveles de la relación de temperatura y concentración de etanol. Las curvas de los valores iguales de respuesta se grafican en un plano donde los ejes coordenados representan los niveles de los factores. Cada curva representa unos valores específicos de la altura de la superficie, es decir, un valor específico de la concentración de polifenoles totales contenidos en el extracto. Donde se observa la mayor concentración de compuestos fenólicos (verde oscuro) se obtiene a temperaturas altas (cercasas a 70 °C) y concentraciones elevadas de etanol (80 % o más). A condiciones de temperaturas moderadas (40-60 °C) y etanol alrededor del 70 % parecen ser menos efectivas (zonas en azul). Figura 2 muestra en que el sistema debe operar dentro de estos rangos de temperatura y etanol para mantenerse en la zona de máximos valores de la variable de respuesta sin salir de los óptimos.

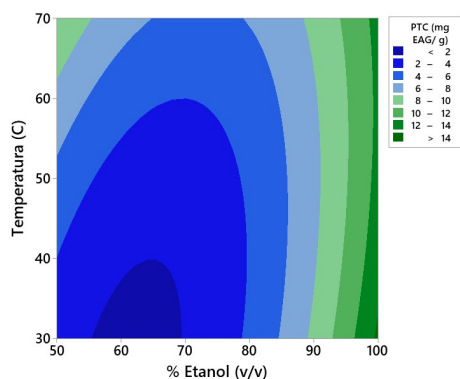


Figura 2. Superficie de contorno para la interacción de variables temperatura y concentración de etanol.

La Figura 3 muestra las respuestas de efectos principales brindada por el modelo, la cual refleja los niveles de concentración de etanol (60 % v/v), tiempo (48 h) y temperatura (30 °C) que conducen a la máxima concentración de polifenoles totales en el extracto. Se aprecia que para obtener máximos valores de la variable de respuesta, se debe emplear un solvente cuya concentración de etanol se encuentre en los niveles medios o máximo estudiados y aplicando valores altos de temperatura y tiempo durante el proceso de extracción.

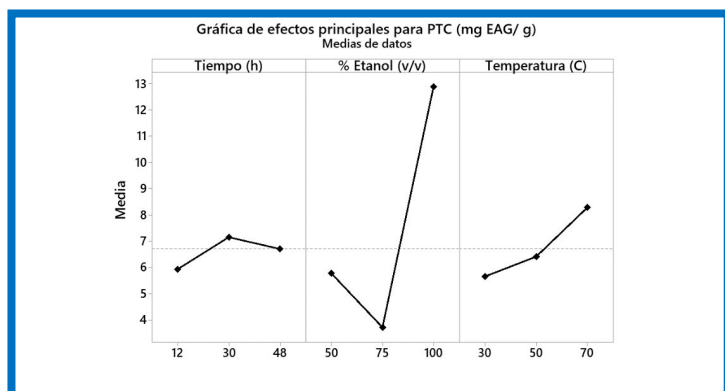


Figura 3. Efectos principales de las variables tiempo, temperatura y concentración de etanol.

La Figura 4 muestra mediante los gráficos de superficie respuesta cómo interactúan las variables independientes (concentración de etanol, temperatura y tiempo) en la concentración de polifenoles totales variable respuesta evaluada.

La Figura 4 (A) muestra cómo interactúa la variable tiempo y el % de

etanol, obteniendo como respuesta que PTC aumenta gradualmente con el tiempo y el % de etanol, a tiempos cortos (~10 h) y bajos niveles de etanol, el PTC es bajo, y se observa un incremento significativo a medida que ambos factores aumentan, alcanzando valores máximos cuando el tiempo está en el rango de 40-50 h y el etanol se aproxima al 100 %. Por lo anterior el tiempo y el % de etanol tienen un efecto positivo sobre la extracción de polifenoles. Una combinación de tiempo prolongado y alta concentración de etanol favorece la extracción.

La Figura 4 (B) muestra cómo interactúa la variable tiempo y temperatura en la obtención de PTC. Se observa una tendencia de incremento del PTC al aumentar el tiempo y la temperatura. El efecto del tiempo es más marcado que el de la temperatura, aunque temperaturas más altas también contribuyen al aumento del PTC. Los valores máximos de PTC se observan a altas temperaturas (~75 °C) y tiempos prolongados (~50 h). Tanto el tiempo como la temperatura son factores cruciales para la extracción de polifenoles. El proceso parece beneficiarse de condiciones térmicas elevadas combinadas con tiempos prolongados.

En la Figura 4 (C) se observa cómo interactúa la variable % de etanol y temperatura en la obtención de PTC. A bajas concentraciones de etanol, el PTC es bajo, independientemente de la temperatura. El contenido de polifenoles aumenta a medida que el % de etanol se incrementa, especialmente a temperaturas intermedias (~45-60 °C). La extracción máxima se alcanza en combinaciones de etanol elevadas (75-100 %) y temperaturas medias-altas. Por lo que el % de etanol y la temperatura tienen un efecto sinérgico sobre la extracción. Altas concentraciones de etanol combinadas con temperaturas entre 45-60 °C maximizan el PTC.

Se concluye que las variables tiempo, temperatura y % de etanol son variables clave en la extracción de polifenoles. Las condiciones óptimas para obtener el mayor contenido de polifenoles totales presentes en el extracto de semillas de cáñamo (25.60 mg EAG/g de materia prima), se obtiene empleando 60 % de etanol, 48 h de tiempo de extracción y la temperatura de 30 °C. Se destaca que el efecto del tiempo es más consistente en todos los gráficos, mientras que el efecto del etanol y la temperatura depende más de la combinación entre ellos.

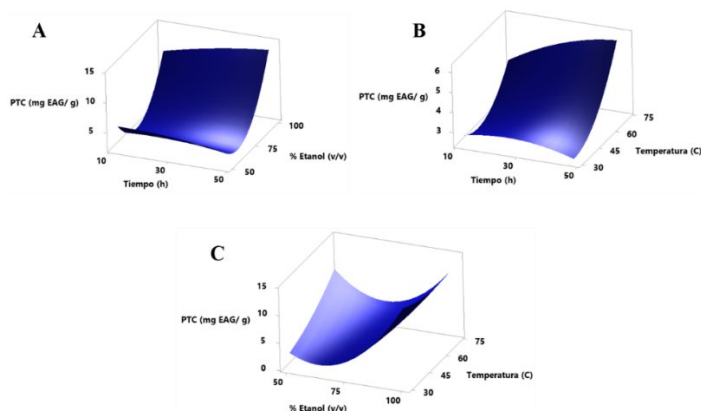


Figura 4. Gráficos de superficie de respuesta que muestran lo siguiente: A,- efecto de la concentración de etanol (%) y tiempo (s); B,- efecto del tiempo y la temperatura; C,- efecto de la concentración de etanol (%) y temperatura sobre los polifenoles totales (mg EAG/100 g de peso fresco) del extracto de semilla de cáñamo.

Frassinetti y colaboradores (2018) demostraron que el extracto de semillas de cáñamo, obtenido con etanol al 80 % bajo condiciones de extracción de 10 mL/g, a 4 °C durante 3 horas, presentó un contenido de PTC de 2.33 mg EAG/ g. Drinić y colaboradores (2018) reportaron que el extracto de semillas de cáñamo obtenido mediante extracción con agua y etanol al 30, 50, 70 y 90 % (20 mL/g, a temperatura ambiente durante 24 horas), mostró que el mejor solvente fue el etanol al 50 %. Bajo estas condiciones, se obtuvo un contenido de PTC de hasta 17.05 mg EAG/ g . Estos resultados destacan el etanol al 50 % como el solvente óptimo para maximizar el rendimiento de compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes. Un estudio realizado evaluó la influencia de diferentes solventes (metanol al 80 % y 100 %, acetona al 80 % y 100 %, etanol al 100 % y una mezcla de metanol: acetona: agua (MAW 35:35:30 % v/v/v)) sobre el rendimiento final de compuestos fenólicos en harina de semillas de cáñamo (Teh y col., 2014). La extracción se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora, y los resultados mostraron que la mezcla MAW ofreció los mejores resultados, seguida por acetona al 80 %, metanol al 80 %, y finalmente acetona y metanol puros. Estos hallazgos son consistentes con los reportados por Mkpenie y col. (2012), quienes compararon la eficacia de metanol puro, acetona pura y sus mezclas acuosas al 50 % utilizando hojas de cáñamo como material vegetal. En este caso, la acetona demostró ser más adecuada que el metanol en tiempos de extracción de 2 horas. Sin embargo, al extender el tiempo de

extracción a 8 y 18 horas, el metanol puro ofreció mayores rendimientos de compuestos fenólicos (0.89 mg EAG/g), duplicando el contenido obtenido con acetona pura (0.416 mg EAG/g). Este estudio concluyó que el metanol es más eficiente como solvente puro durante maceraciones prolongadas de hojas de *Cannabis sativa*.

La variabilidad en la composición química del cannabis, depende tanto del método de cultivo como de las condiciones ambientales de cultivo. Lesma y colaboradores (2014) demostraron esto al analizar el contenido de fenoles de semillas de cáñamo de dos zonas diferentes. Utilizando una mezcla de metanol y agua (80:20 v/v) como método de extracción reportaron contenidos de fenoles totales que variaron entre 67.0 y 80.4 mg EAG/g de extracto, dependiendo del tipo de cultivo

Las semillas de *Cannabis* han sido exploradas de manera limitada, identificándose un 0.01 % de N-trans-cumaroiltiramina en peso seco a partir de un extracto etanólico. Asimismo, se han extraído estilbenoides utilizando solventes polares (Pagani y col., 2011) aunque sin una optimización específica del proceso. Investigaciones sobre las condiciones de extracción podría mejorar significativamente el rendimiento de estos compuestos.

La extracción sólido-líquido con solventes orgánicos y calor es un método que no aplica los equipos sofisticados que permite altos rendimientos de compuestos fenólicos y fácil escalamiento a nivel industrial. Sin embargo, pocos trabajos refieren el uso de esta metodología en los procesos de extracción de fenoles a semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.). Los resultados obtenidos muestran que esta materia prima muestra un gran potencial para la producción de estos metabolitos secundarios. Los polifenoles son antioxidantes con propiedades que generan beneficios para nuestra salud debido a la actividad secuestradora de los radicales libres (Nuñez Moreira y col., 2019).

En cuanto al proceso de obtención de compuestos fenólicos, se observó que la concentración de etanol mostró el efecto significativo en el contenido de polifenoles totales extraídos, de tal manera que con niveles medios de la concentración de etanol se mejora el contenido de compuestos fenólicos extraídos.

El desarrollo de esta técnica ofrece beneficios para su uso en la

industria, ya que se emplean reactivos de bajo costo (como es etanol) y el equipamiento que se utiliza contribuye al cuidado del medio ambiente (equipo libre de esparcimiento de gases contaminantes). Además de poder suministrar a la industria una materia prima rica en compuestos fenólicos con diversa bioactividad que contribuya a la sustitución de importaciones.

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió mejorar la extracción hidroetanólica de compuestos fenólicos a partir de un de semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.), además de generación de conocimiento para aprovechamiento de un recurso natural producido en grandes cantidades en función de la obtención de compuestos bioactivos de interés farmacéutico, médico y alimenticio.

REFERENCIAS

- Abdollahi, M., Sefidkon, F., Calagari, M., Mousavi, A., & Fawzi Mahomoodally, M. (2020). A comparative study of seed yield and oil composition of four cultivars of Hemp (*Cannabis sativa* L.) grown from three regions in northern Iran. *Industrial Crops and Products*, 152:112397. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112397>
- Arredondo-Valdés, R., Hernández-Castillo, F. D., Rocandio-Rodríguez, M., Anguiano-Cabello, J. C., Rosas-Mejía, M., Vanoye-Eligio, V., Ordaz-Silva, S., López-Sánchez, I. V., Carrasco-Peña, L. D., & Chacón-Hernández, J. C. (2021). In vitro antibacterial activity of moringa oleifera ethanolic extract against tomato phytopathogenic bacteria. *Phyton*, 90(3): 895-906. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.014301>
- Drinić, Z., Vidović, S., Vladić, J., Koren, A., Kiproviski, B., & Sikora, V. (2018). Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Lekovite Sirovine*, 17–21.
- Frassinetti, S.; Moccia, E.; Caltavuturo, L.; Gabriele, M.; Longo, V.; Bellani, L.; Giorgi, G.; Giorgetti, L. (2018). Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 262, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.078>
- Lesma, G., Consonni, R., Gambaro, V., Remuzzi, C., Roda, G., Silvani, A., ...

- Visconti, G. L. (2014). Cannabinoid-free *Cannabis sativa* L. grown in the Po valley: evaluation of fatty acid profile, antioxidant capacity and metabolic content. *Natural Product Research*, 28(21), 1801–1807. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.926354>
- Mkpenie, V.N.; Essien, E.E.; Udoh, I.I. (2012). Effect of Extraction Conditions on Total Polyphenol Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Cannabis sativa* L. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry*, 11, 300–307.
- Ngoc, Y. N. T., Tri, D. L., Khanh, Q. N. H., Nguyen, D. C. D. D. C., & Bach, L. G. (2019). Extraction conditions of Polyphenol, Flavonoid compounds with Antioxidant activity from *Veronia amygdalina* Del. Leaves: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. *Materials Today: Proceedings*, 18: 4004–4010. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.342>
- Núñez Moreira, R., Quintana Ricardo, L., Gutiérrez-Cuesta, R., Valdés Iglesias, O., González García, K.I., Hernandez Rivera, Y., Acosta Suarez, Y., Ortiz Guillarte, E. (2019). Optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XXI (2): 109-117.
- Özdemir, H., Bakkalbaşı, E., & Javidipour, I. (2021). Effect of seed roasting on hemp seed oil's oxidative stability and antioxidant content. *Journal of Food Science and Technology*, 58(7): 2606–2616. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04767-x>
- Pagani, A., Scala, F., Chianese, G., Grassi, G., Appendino, G., & Tagliatela-Scafati, O. (2011). Cannabioxepane, a novel tetracyclic cannabinoid from hemp, *Cannabis sativa* L. *Tetrahedron*, 67(19), 3369–3373. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.03.062>
- Rao, M. V., Sengar, A. S., C K, S., & Rawson, A. (2021). Ultrasonication - A green technology extraction technique for spices: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 116: 975–991. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.006>
- Souissi, M., Guesmi, A., & Moussa, A. (2018). Valorization of natural dye extracted from date palm pits (*Phoenix dactylifera*) for dyeing of cotton fabric. Part 1: Optimization of extraction process using Taguchi design. *Journal of Cleaner Production*, 202: 1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.115>
- Sundar, S., Singh, B., & Kaur, A. (2023). Microwave roasting effects on phenolic, tocopherol, fatty acid, and phytosterol profiles, physiochemical, oxidative, and antioxidant properties of hemp seed oil. *Food Chemistry Advances*, 4: 100596. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100596>
- Tapia-Quirós, P., Granados, M., Sentellas, S., & Saurina, J. (2023). Microwave-assisted extraction with natural deep eutectic solvents for polyphenol

recovery from agrifood waste: Mature for scaling-up? *Science of the Total Environment*, 912: 168716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168716>

Teh, S. -S., Bekhit, A. E. -D., & Birch, J. (2014). Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants*, 3(1), 67-80. <https://doi.org/10.3390/antiox3010067>.