



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale
Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Estrazione e quantificazione di cannabinoidi da Canapa light

Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Diego Caccavo

Candidata:

Chiara Senatore

matricola 0612201660

Anno Accademico 2018/2019

Alle mie sorelle, spalle e coscienza

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman

La data prevista per la discussione della tesi è il 22 novembre
Fisciano, 11/11/2019

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	V
Indice delle tabelle	IX
Abstract	XI
Introduzione.....	13
1.1 Botanica _____	14
1.1.1 Canapa Sativa	14
1.1.2 Canapa Indica	15
1.1.3 Canapa Ruderalis	15
1.2 Composizione chimica _____	16
1.2.1 Cannabinoidi	17
1.2.2 Terpenoidi	20
1.2.3 Idrocarburi	20
1.2.4 Composti azotati	20
1.2.5 Carboidrati	21
1.2.6 Flavonoidi	21
1.2.7 Acidi grassi	21
1.2.8 Altri composti	21
1.3 Cenni storici _____	22
1.4 Mercato della Canapa in Italia _____	23
1.5 Vie di assunzione della Canapa e farmacocinetica _____	25

1.6 Applicazioni terapeutiche _____	26
1.7 Obiettivo del lavoro di tesi _____	27
Stato dell'arte	29
2.1 Pretrattamenti delle infiorescenze di Canapa _____	30
2.1.1 Essiccazione	30
2.1.2 Macinazione	30
2.1.3 Decarbossilazione	30
2.2 Estrazione _____	32
2.2.1 Tipologia di solvente	32
2.2.2 Tecnica estrattiva: macerazione dinamica o infusione	33
2.2.3 Tecnica estrattiva: estrazione con solvente assistita da ultrasuoni	37
2.2.3 Tecnica estrattiva: estrazione con solvente assistita da microonde	41
2.3 Processi industriali _____	42
2.3.1 Estrazione con alcoli	42
2.3.2 Estrazione con olio per uso alimentare	42
2.3.3 Estrazione con CO2 supercritica	43
Materiali, apparecchiature e metodi.....	47
3.1 Materiali _____	48
3.1.1 Canapa	48
3.1.2 Soluzioni standard di CBD	48
3.1.3 Soluzione standard di CBDA	48
3.1.4 Etanolo	48
3.1.5 Acetonitrile	48
3.1.6 Acido formico	49
3.2 Apparecchiature _____	49
3.2.1 Sonicatore	49
3.2.2 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)	50
3.3 Metodi _____	51
3.3.1 Macinazione delle infiorescenze	51

Sommario e indici.	Pag. III
3.3.2 Decarbossilazione delle infiorescenze	51
3.3.3 Metodo di quantificazione dei cannabinoidi mediante HPLC	51
3.3.3 Metodi estrattivi _____	60

Risultati e discussione63

4.1 Prove di decarbossilazione delle infiorescenze _____	65
4.1 Quantitativo dei cannabinoidi _____	65
4.1.1 Quantitativo dei cannabinoidi nei campioni decarbossilati	65
4.1.2 Quantitativo di CBD tot nei campioni non decarbossilati	67
4.1.4 Confronti tra i campioni decarbossilati e non decarbossilati	68

Conclusioni.....69

Bibliografia.....73

Indice delle figure

Figura 1 Rappresentazione della pianta di <i>Canapa Sativa</i> [2].....	14
Figura 2 Rappresentazione della pianta di <i>C. Sativa</i> , <i>C. Indica</i> , <i>C. Ruderalis</i> [3]. La <i>C. Sativa</i> si presenta come una pianta molto alta, la <i>C. Indica</i> è caratterizzata da un fusto più basso ed infine la <i>C. Ruderalis</i> risulta essere la specie più piccola con l'altezza massima di un metro e mezzo.	15
Figura 3. Ingrandimento sui tricomi di una pianta femminile di <i>Canapa</i> [4]. I tricomi rappresentano la sede principale dei cannabinoidi e fungono da protezione per la pianta contro condizioni climatiche avversi ed insetti.	17
Figura 4. Reazioni chimiche a cui è soggetto il CBGA [4]. Il CBGA tramite la THCA sintasi si trasforma in THCA, mentre attraverso la CBDA sintasi, diventa CBDA.....	18
Figura 5 Molecola del Cannabidiolo (CBD) [6]. Il CBD è un metabolita non psicoattivo della Cannabis ed ha formula molecolare C ₂₁ H ₃₀ O ₂	19
Figura 6 Molecola del Delta-9-Tetraidrocannabinolo (THC) [9]. Il THC è un metabolita psicoattivo della Cannabis ed ha formula molecolare C ₂₁ H ₃₀ O ₂	19
Figura 7 Vie di assunzione dei cannabinoidi [4] A sinistra è possibile vedere il “cammino” dei cannabinoidi tramite il processo di combustione. A destra, invece, vi è il percorso effettuato tramite assunzione orale.	26
Figura 8 Reazione di decarbossilazione del CBDA [16] la quale vede il CBDA perdere una molecola di CO ₂ e trasformarsi in CBD.	30
Figura 9 Comparazione della area ottenuta tramite HPLC del picco relativo ai cannabinoidi presenti nelle analisi di un campione di controllo con le aree dei picchi degli stessi cannabinoidi in campioni sottoposti a diverse tecniche di decarbossilazione [15].....	31
Figura 10 Comparazione del quantitativo dei cannabinoidi estratti con ACN, ACN:H ₂ O (1:1), MeOH/H ₂ O (4:1) con il quantitativo dei cannabinoidi estratti con la tecnica di estrazione di riferimento ovvero con il solvente MeOH/CHCl ₃ (9:1) [20]	33
Figura 11 Risultati delle analisi della concentrazione [mg/g] dei cannabinoidi su base secca a seconda del solvente utilizzato [1]. Il cannabinoide presente in	

maggior quantità risulta essere il CBDA ed il solvente piú adatto alla sua estrazione risulta essere l'EtOH.....	34
Figura 12 Risultati delle analisi della concentrazione [mg/g] dei cannabinoidi su base secca a seconda della tecnica di estrazione utilizzata tra DM, UAE, MAE, SFE [1].....	35
Figura 13 Comparazione delle aree ottenute tramite HPLC del picco relativo al THCA e al THC date dalle analisi delle estrazioni con diversi solventi [18]	36
Figura 14 Valutazione della concentrazione [mg/g] dei cannabinoidi su base secca a seconda del quantitativo di infiorescenze utilizzate per l'estrazione e della tipologia di solvente (4:1 MeOH/H ₂ O e 9:1 MeOH/CHCl ₃) [21]	38
Figura 15 Valutazione della concentrazione [mg/g] dei cannabinoidi su base secca a seconda della durata dell'estrazione (15, 30, 60 minuti) [21] Il quantitativo di cannabinoidi piú basso dopo 60 minuti di estrazione dimostra che l'estrazione per tempi lunghi causa la degradazione dei cannabinoidi.	39
Figura 16 Valutazione della concentrazione [mg/g] dei cannabinoidi su base secca a seconda della durata dell'estrazione (5, 10, 15 minuti, 15 minuti + vortex) [21]	40
Figura 17 Comparazione del livello dei cannabinoidi dell'estrazione di riferimento ovvero la procedura UNODC con il livello di cannabinoidi trovati nell'analisi a seguito di diverse tipologie di estrazione: sonicazione per 15 minuti + vortex, vortex per 30 secondi, sonicazione di 5 minuti + vortex [20].	41
Figura 18. Rappresentazione di un sonicatore. L'estrazione assistita da ultrasuoni è un metodo che utilizza le onde sonore per accelerare il processo di rottura delle cellule così da migliorare il trasferimento del solvente.	50
Figura 19 Esempio di un cromatogramma. Questo diagramma viene ottenuto grazie all'analisi fatta dall'HPLC. La grandezza di interesse è l'area sottesa al picco relativo al componente target.	52
Figura 20 Cromatogramma ottenuto da S. Zivovinic et al. [20] grazie all'analisi tramite HPLC. Su di esso è possibile vedere il tempo di eluizione dei diversi cannabinoidi, in particolare, il picco del CBDA si trova intorno al minuto 5 mentre quello del CBD intorno al minuto 6.	53
Figura 21 Cromatogramma ottenuto dall'analisi del campione di <i>C. Sativa</i> estratta con acetonitrile-acqua. In particolare, è possibile vedere i picchi relativi ai due cannabinoidi di interesse: il CBDA ed il CBD.....	55
Figura 22 Cromatogramma ottenuto dall'analisi del campione di <i>C. Sativa</i> decarbossilata ed estratta con acetonitrile-acqua. In particolare, è possibile vedere i picchi relativi ai due cannabinoidi di interesse: il CBDA ed il CBD.	56
Figura 23 Retta di taratura del CBDA. L'analisi tramite HPLC di una soluzione incognita mostrerà il picco del CBDA la cui area può essere calcolata tramite un integrale. Conoscendo l'area, tramite la retta di taratura è possibile conoscere la concentrazione di CBDA nella soluzione.	58

Figura 24 Retta di taratura del CBD. L'analisi tramite HPLC di una soluzione incognita mostrerà il picco del CBD la cui area può essere calcolata tramite un integrale. Conoscendo l'area, tramite la retta di taratura è possibile conoscere la concentrazione di CBD nella soluzione..... 60

Indice delle tabelle

Tabella 1 Confronto delle rese estrattive delle tecniche analizzate nello stato dell'arte con una tecnica di estrazione di riferimento. Per ogni tipo di estrazione è indicata la durata del processo e la temperatura a cui è avvenuta l'estrazione.	44
Tabella 2. Parametri operativi del modello HPLC per la quantificazione dei cannabinoidi [20].....	54
Tabella 3 Soluzioni preparate per costruire la retta di taratura del CBDA, la quale serve per calcolare la concentrazione del CBDA in soluzioni incognite.	57
Tabella 4. Soluzioni preparate per costruire la retta di taratura del CBD, la quale serve per calcolare la concentrazione del CBD in soluzioni incognite.	59
Tabella 5 Elenco dei campioni di infiorescenze coinvolti nella fase sperimentale e relativa descrizione	64
Tabella 6 Elenco dei campioni decarbossilati per la fase sperimentale. La decarbossilazione è avvenuta ponendo le infiorescenze in forno a 140°C per 30 minuti.	65
Tabella 7 Quantitativo % (w/w) dei cannabinoidi su base secca di infiorescenza prima della decarbossilazione nei campioni C1 decarbossilati ed estratti in EtOH e ACNH ₂ O	66
Tabella 8 Quantitativo % (w/w) dei cannabinoidi su base secca di infiorescenza prima della decarbossilazione nei campioni C2 decarbossilati ed estratti in EtOH e ACNH ₂ O	66
Tabella 9. Quantitativo % (w/w) dei cannabinoidi su base secca di infiorescenza nei campioni C1 non decarbossilati ed estratti in EtOH e ACNH ₂ O	67
Tabella 10. Quantitativo % (w/w) dei cannabinoidi su base secca di infiorescenza nei campioni C2 non decarbossilati ed estratti in EtOH e ACNH ₂ O ..	67

Abstract

Cannabis sativa is one of the most studied plant in the world by pharmaceutical industry with the aim of production of supplements and drugs. Indeed, thanks to its chemical composition, which is rich of cannabinoids, therapeutic products obtained by *Cannabis sativa* possess a high anti-inflammatory and analgesic activity.

The first aim of this work was the review of some scientific articles present in literature concerning laboratory extractive techniques of cannabinoids in order to acquire the proper knowledge to develop analytical and laboratory extractive techniques and, potentially to expand this knowledge to industrial process. This research shows that alcohols are the best solvents to extract cannabinoids because of their polarity. Moreover the traditional and polluting mix methanol–chloroform can be replaced by more sustainable solvent such as mix of alcohols–water or mix of acetonitrile–water. Oils showed to be good solvents, but the cannabinoids' yield depends strongly by the extraction technique used. Dynamic maceration (DM), which is a traditional, long-lasting and high temperature process, seems to give the higher yield of cannabinoids. Recently, because of the interest in faster and low temperature processes, alternative extraction techniques such as microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) have been developed. This research shows that MAE has lower cannabinoids' yield respect to DM, probably because of the too short extraction time. The UAE processes, carried out for the same amount of time of DM, showed slightly lower cannabinoids' yields.

Thanks to the knowledge acquired during the first part of this thesis, it has been possible to develop an analytical technique able to quantify

the target compounds (cannabinoids CBD and CBDA) through an HPLC method. Moreover, it has been possible to develop an extractive technique of cannabinoids from Cannabis plants with solvents such as ethanol and mix of acetonitrile-water. Three repeated extractions have been done on decarboxylated and non decarboxylated samples. Results shows that at least two extraction are indispensable to extract all the cannabinoids. Moreover, results shows that the main cannabinoid present in Cannabis plants is the acid ones CBDA, followed by its decarboxylated form CBD. Eventually, results shows that the cannabinoids' content is in the range of 6-10% for one type of Cannabis and in the range of 1.5-2.9% for the other one, showing an intrinsic heterogeneity of the plant sources.

Bibliografia

1. V. Brighenti, F. Pellati, M. Steinbach, D. Maran, S. Benvenuti, “Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp)”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 143, Pages 228-236 (2017)
2. F. E. Köhler, “Köhlers Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte”
3. <https://azarius.it/encyclopedia/85/tipi-di-canapa-sativa-indica-ruderalis/>, consultato il 28/10/2019
4. E. Small, Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization, *The Botanical Review*, Volume 81, Issue 3, pp 189–294 (2015)
5. R. Brenneisen, Chapter “Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents” in “*Marijuana and the Cannabinoids*”, pp 17-49 (2007)
6. <https://www.medcanapa.com/cbd/>, consultato il 28/10/2019
7. R. Adams, M. Hunt, J. H. Clark, “Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I”, *Journal of the American Chemical Society*, Volume 62, Pages 196-200 (1940)
8. R. Mechoulam, Y. Shvo, “Hashish—I : The structure of Cannabidiol”, *Tetrahedron*, Volume 19, Issue 12, 1963, Pages 2073-2078 (1963)
9. <https://it.wikipedia.org/wiki/Delta-9-tetraidrocannabinolo>, consultato il 29/10/2019
10. H. J. Wollner, J. R. Matchett, J. Levine, S. Loewe, “Isolation of a Physiologically Active Tetrahydrocannabinol from *Cannabis Sativa* Resin”, *Journal of the American Chemical Society*, Volume 64, Pages 26-29 (1942)

11. Y. Gaoni, R. Mechoulam, "Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish" *Journal of the American chemical society*, Volume 86, Pages 1646-1647 (1964)
 12. S. Amaducci, "Hemp Production in Italy", *Journal of Industrial hemp* Pages 109-115 (2005)
 13. T. Madia, C. Tofani, "La coltivazione della Canapa" Una semplice guida per i coltivatori che desiderano coltivare canapa (1998)
 14. A. Cuoco, "Mercato della Canapa in Italia" (2019) <http://www.eng4life.it/progetto-microexativa/>, consultato il 29/10/2019
 15. J. Maroon, Chapter 10 "Nutritional & Medical Applications for Cannabidiol: Hemp Health Benefits without THC" in "Anti-Aging Therapeutics" Volume XVII (2015)
 16. <https://gruene-besserung.de/Ueber-cbd/cbda>, consultato il 29/10/2019
 17. D. De Vita, V. M. Madia, V. Tudino, F. Saccoliti, A. De Leo, A. Messoro, P. Roscilli, A. Botto, I. Pindinello, G. Santilli, L. Scipione, R. Costi, R. Di Santo "Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis", *Natural product research* (2019)
 18. L. L. Romano, A. Hazekamp, "Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine", *Cannabinoids* (2013)
 19. F. Fathordoobady, A. Singh, D. D. Kitts, A. P. Singh, "Hemp (Cannabis Sativa L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery", *Food Reviews International*, Pages 664-684 (2019)
 20. S. Zivovinic, R. Alder, M. D. Allenspach, C. Steuer, "Determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection", *Journal of Analytical Science and Technology* (2018)
 21. E. M. Mudge, S. J. Murch, P. N. Brown, "Leaner and greener analysis of cannabinoids", *Analytical and bioanalytical chemistry*, Volume 409, Issue 12, Pages 3153–3163 (2017)
 22. <https://www.consumerhealthdigest.com/cbd-hemp-center/cbd-hemp-oil-review.html> consultato il 30/10/2019
 23. <http://hemphacker.com/cbd-recrystallization/> consultato il 31/10/2019
-

