



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

**Dipartimento di Ingegneria Industriale**

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

# **Estrazione e nano-incapsulazione di principi attivi di origine naturale**

Tesi in  
**Principi di Ingegneria Chimica**

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Candidato:

Pierpaolo Forlenza

Correlatori:

Ing. Diego Caccavo

Ing. Rosario Cavallo

Matricola 0612202057

**Anno Accademico 2020/2021**





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

La data prevista per la discussione della tesi è il 22/03/2021

Fisciano, 12/03/2021

# Sommario

|                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Sommario .....</b>                                                                 | <b>V</b>   |
| <b>Indice delle figure .....</b>                                                      | <b>VII</b> |
| <b>Indice delle tabelle .....</b>                                                     | <b>IX</b>  |
| <b>Abstract .....</b>                                                                 | <b>XI</b>  |
| <b>Introduzione.....</b>                                                              | <b>1</b>   |
| 1.1 La Canapa .....                                                                   | 2          |
| 1.1.1 La botanica .....                                                               | 2          |
| 1.1.2 Biochimica della canapa: i principi attivi di maggiore<br>interesse .....       | 4          |
| 1.2 La Rucola .....                                                                   | 8          |
| 1.2.1 La botanica .....                                                               | 8          |
| 1.2.1 Biochimica della rucola: i principi attivi di maggiore<br>interesse .....       | 9          |
| 1.3 Estrazione di principi attivi da matrici vegetali:<br>generalità e tecniche ..... | 10         |
| 1.3.1 Spremitura .....                                                                | 15         |
| 1.3.2 Centrifugazione .....                                                           | 16         |
| 1.3.3 Macerazione .....                                                               | 16         |
| 1.3.4 Percolazione .....                                                              | 17         |
| 1.3.5 Apparecchio di Soxhlet .....                                                    | 18         |
| 1.3.6 Fluidi supercritici (o FSE) .....                                               | 19         |
| 1.3.7 Estrazione con microonde (o MAE) .....                                          | 20         |

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3.8 Estrazione con ultrasuoni (o UAE)                                                             | 21        |
| 1.4 Nano-incapsulazione di principi attivi: generalità e tecniche                                   | 23        |
| 1.4.1 Spray drying                                                                                  | 25        |
| 1.4.2 Freeze drying (liofilizzazione)                                                               | 26        |
| 1.4.3 Emulsificazione                                                                               | 26        |
| 1.4.4 Aspettative future sulla nano-incapsulazione                                                  | 27        |
| 1.5 Obiettivo del lavoro di tesi                                                                    | 28        |
| <b>Stato dell'arte</b>                                                                              | <b>29</b> |
| 2.1 Estrazione di principi attivi da matrici vegetali                                               | 30        |
| 2.1.1 Estrazione di principi attivi contenuti nella canapa                                          | 30        |
| 2.1.2 Estrazione di principi attivi contenuti nelle crucifere                                       | 39        |
| 2.2. Nano-incapsulazione di principi attivi da matrici vegetali.                                    | 42        |
| 2.2.1 Nano-incapsulazione del CBD                                                                   | 42        |
| 2.2.2 Nano-incapsulazione di glucosinolati e isotiocianati                                          | 44        |
| <b>Risultati e discussione</b>                                                                      | <b>49</b> |
| 3.1 Confronto tra le varie tecniche di estrazione                                                   | 50        |
| 3.2 Confronto tra le varie tecniche di nano incapsulamento                                          | 55        |
| 3.3 Schema di un possibile processo produttivo di nano-incapsulati                                  | 57        |
| 3.3.1 Processo di produzione di nano-incapsulati contenenti CBD da cannabis                         | 59        |
| 3.3.2 Processo di produzione di nano-incapsulati contenenti glucosinolati e isotiocianati da rucola | 61        |
| <b>Conclusioni</b>                                                                                  | <b>65</b> |
| <b>Bibliografia</b>                                                                                 | <b>69</b> |

---

## Indice delle figure

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Varietà di Canapa Sativa, Indica, Ruderalis[2] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 2  |
| Figura 2 Filamenti cristallini (tricomi) prodotti dalle secrezioni epidermiche dei fiori della pianta di sesso femminile[11]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5  |
| Figura 3 Biosintesi enzimatica dei più importanti cannabinoidi a partire dal precursore CBGA (acido cannabigerolico)[14]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 6  |
| Figura 4 foglie di rucola[16]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 8  |
| Figura 5 Sintesi biochimica dell'erucina a partire dalla glucoerucina (contenuta nella rucola) e dalla glucorafanina (contenuta nei broccoli)[18]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 9  |
| Figura 6 schema di un'estrazione semplice dove in un opportuno recipiente vengono miscelate una certa massa di Fd con una certa massa di Sv. Si lascia che il contatto fra la fase solida e la fase liquida sia abbastanza lungo da poter considerare che si è raggiunta l'uguaglianza della concentrazione in soluto fra la soluzione all'intero dei solidi e quella all'esterno (stadio di equilibrio). Infine con un adatto sistema di separazione meccanica, si separa l'estratto Ex dal raffinato Rt[23]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 14 |
| Figura 7 Apparecchio soxhlet è formato da tre componenti fondamentali sovrapposti: in basso un pallone con collo smerigliato e fondo rotondo, a metà l'estrattore vero e proprio e in alto un condensatore. L'estrattore è formato da due camere sovrapposte separate: quella superiore comunica attraverso due connettori (un condotto per il passaggio del solvente, allo stato di vapore, e un sifone per lo scarico dell'estratto) alla camera inferiore, che è in continuità con un pallone che funge da ribollitore per il solvente, mentre il collo della camera centrale è comunicante con un condensatore, in modo da avere un ricircolo continuo di solvente fresco (cioè privo di soluti).<br>[ <a href="https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-Soxhlet-extraction-apparatus-indicating-the-vapor-and-liquid-extractant_fig4_251753895">https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-Soxhlet-extraction-apparatus-indicating-the-vapor-and-liquid-extractant_fig4_251753895</a> ]..... | 18 |
| Figura 8 Diagramma di fase generalizzato P-T .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 20 |
| Figura 9 Funzionalità di micro/nano-incapsulazione [28]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| Figura 10 (GS-MS), cromatogramma ottenuto per (A) 1 mg/L cannabinoidi standard e (B) 0.2 g di gemme di marijuana estratto con macchina del caffè a tappo rigido utilizzando 100 mL di 2-propanolo [29]. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 33 |
| Figura 11 Superficie di risposta dell'area di picco per: (A) sesquiterpeni e (B) cannabinoidi, considerando variabili significative (ampiezza e miscela del                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |

---

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| solvente cicloesano/isopropanolo, il tempo di sonicazione è stato fissato a 5 min) [31].....                                                                                                                    | 35 |
| Figura 12 Superficie di risposta dell'area di picco per: (A) sesquiterpeni e (B) cannabinoidi considerando EtOH e temperatura (pressione e flusso sono fissati a 100 bar e 1 mL/min, rispettivamente)[31] ..... | 37 |
| Figura 13 Profilo schematico della preparazione delle nanoparticelle PLGA caricate con farmaci[45]. .....                                                                                                       | 47 |
| Figura 14 Schema a blocchi di un possibile processo produttivo .....                                                                                                                                            | 57 |
| Figura 15 Schema di processo per la produzione di nano-incapsulati contenenti CBD.....                                                                                                                          | 61 |
| Figura 16 Schema di processo per la produzione di nano-incapsulati contenenti erucina .....                                                                                                                     | 63 |

---

## Indice delle tabelle

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabella 1 Elenco delle specie di cannabis in base alla loro composizione in cannabinoidi. ....                                                                 | 3  |
| Tabella 2 applicazioni estrazione solido-liquido .....                                                                                                         | 11 |
| Tabella 3 Risultati dell'estrazione di cannabinoidi su scala industriale dalla biomassa di cannabis; flusso di biomassa 30kg/h, flusso di solvente 360L/h. ... | 39 |
| Tabella 4 Confronto tra le varie tecniche attualmente disponibili per l'estrazione di CBD da campioni di canapa. ....                                          | 54 |
| Tabella 5 Confronto tra le varie tecniche attualmente disponibili per l'estrazione di glucosinolati (GL) da campioni di rucola. ....                           | 55 |

---



## **Abstract**

Cannabis and rocket salad are taking an increasing role in the pharmaceutical field and in the research world. There are numerous studies on the benefits of compounds present in cannabis (such as CBD) and in rocket salad (such as isothiocyanates and erucin in particular). CBD is indeed an effective anti-inflammatory and painkillers, while isothiocyanates, such as erucin, are important for their anticancer actions. The first objective of this thesis is to realize a preliminary study necessary to the develop a process of production of encapsulated containing isotocyanates (erucin) from the crucifers (rocket) and encapsulated containing cannabidiol (CBD) extracted from leaves of cannabis. To realize this aim it was necessary an analysis of the two main phases of the process: the extraction of the active principles from vegetable matrix and their subsequent encapsulation.

In order to identify the most suitable type of extraction, the first specific objective is to study the various extraction processes and therefore to describe the main features and applications, identifying advantages and disadvantages. In particular, the objective has been on one side to identify the main process parameters (yield of the extraction process and extraction times) and on the other hand to assess the effect of the operating conditions on the compounds to be extracted. On the basis of this study, it was therefore possible to identify ultrasound assisted extraction (UAE) as one of the most suitable extractive techniques both for CBD from cannabis and isothiocyanates (such as the erucin) from the rocket.

Once the extractive process has been realized, the conservation of the functional properties of the extracted active ingredients is required.

---

Encapsulation in this sense is certainly a method that can be used for this scope. The second specific objective was therefore to analyze the differences between the encapsulation techniques (between micro and nano-encapsulation), and in particular how they improve the stability and bioavailability of the extracted bioactive compounds (CBD and isothiocyanates). On the basis of this study it was therefore possible to conclude about the ability of the nanoencapsulation to fulfill this goal compared to the microencapsulation. As a consequence, nanoliposome can be used as possible carriers for transporting CBD and isothiocyanates.

Once the most suitable techniques for the extraction and for the nanoencapsulation has been chosen, it has been possible to realize a flow diagram in which are reported all the phases of a possible productive process for nanoincapsulated containing CBD or isothiocyanates.

## Bibliografia

1. Brighenti, V., et al., *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, 2017. **143**: p. 228-236.
2. *dinafem*. Available from: <https://www.dinafem.org/it/blog/tipi-marijuana/>.
3. Small, E. and A. Cronquist, *A practical and natural taxonomy for Cannabis*. Taxon, 1976: p. 405-435.
4. De Meijer, E., H. Van der Kamp, and F. Van Eeuwijk, *Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters*. Euphytica, 1992. **62**(3): p. 187-200.
5. Hillig, K.W., *Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae)*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2005. **52**(2): p. 161-180.
6. repubblica.it. *L'ONU: "via la cannabis dalla lista delle sostanze dannose"*. 2020.
7. Koltai, H. and D. Namdar, *Cannabis Phytomolecule'Entourage': From Domestication to Medical Use*. Trends in Plant Science, 2020.
8. Mechoulam, R. and Y. Gaoni, *A total synthesis of dl- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish I*. Journal of the American Chemical Society, 1965. **87**(14): p. 3273-3275.
9. Brenneisen, R., *Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents*, in *Marijuana and the Cannabinoids*. 2007, Springer. p. 17-49.

10. Crombie, L. and W.M.L. Crombie, *Cannabinoid formation in Cannabis sativa grafted inter-racially, and with two Humulus species*. Phytochemistry, 1975. **14**(2): p. 409-412.
11. cbdmania. Available from: <https://www.cbdmania.it/blog/tricomi>.
12. Mahlberg, P.G. and E.S. Kim, *Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of Cannabis (Cannabaceae)*. Journal of Industrial Hemp, 2004. **9**(1): p. 15-36.
13. Mandolino, G. and A. Carboni, *Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement*. Euphytica, 2004. **140**(1-2): p. 107-120.
14. Giacoppo, S., et al., *Cannabinoids: new promising agents in the treatment of neurological diseases*. Molecules, 2014. **19**(11): p. 18781-18816.
15. Ternelli, M., et al., *Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content in both cannabinoids and terpenes*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020: p. 113296.
16. retecorradi. Available from: <https://www.retecorradi.it/verdure-e-benessere/rucola.html>.
17. Yaniv, Z. *Traditions, uses and research on rocket in Israel*. in *Rocket: a Mediterranean crop for the world. Report of a workshop*. 1996.
18. Melchini, A. and M.H. Traka, *Biological profile of erucin: a new promising anticancer agent from cruciferous vegetables*. Toxins, 2010. **2**(4): p. 593-612.
19. Pasini, F., et al., *Determination of glucosinolates and phenolic compounds in rocket salad by HPLC-DAD-MS: Evaluation of Eruca sativa Mill. and Diplotaxis tenuifolia L. genetic resources*. Food Chemistry, 2012. **133**(3): p. 1025-1033.
20. Alqasoumi, S., et al., *Rocket "Eruca sativa": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity*. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2009. **15**(16): p. 1958.
21. thesciencelab. Available from: <http://www.thesciencelab.it/fitochimica-come-ottenere-i-principi-attivi-dalle-piante/>.
22. Naviglio, D., et al., *Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A powerful and greener alternative to the latest solid-liquid extraction techniques*. Foods, 2019. **8**(7): p. 245.
23. educhimica. Available from: <https://www.educhimica.it/FERMILAB/>.

24. Wang, L. and C.L. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(6): p. 300-312.
  25. Gallo, M., L. Ferrara, and D. Naviglio, *Application of ultrasound in food science and technology: A perspective*. Foods, 2018. **7**(10): p. 164.
  26. Alupului, A., I. Calinescu, and V. Lavric, *Microwave extraction of active principles from medicinal plants*. UPB Science Bulletin, Series B, 2012. **74**(2): p. 129-142.
  27. Katouzian, I. and S.M. Jafari, *Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **53**: p. 34-48.
  28. Shishir, M.R.I., et al., *Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters*. Trends in Food Science & Technology, 2018. **78**: p. 34-60.
  29. Leiman, K., et al., *Fast extraction of cannabinoids in marijuana samples by using hard-cap espresso machines*. Talanta, 2018. **190**: p. 321-326.
  30. Martinez-Sena, M.T., et al., *Hard cap espresso extraction and liquid chromatography determination of bioactive compounds in vegetables and spices*. Food chemistry, 2017. **237**: p. 75-82.
  31. Omar, J., et al., *Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS*. Journal of separation science, 2013. **36**(8): p. 1397-1404.
  32. Senatore, t.i.a.g.T.d.C.
  33. Radoiu, M., et al., *Microwave Extraction vs. Other Techniques for Industrial Scale Cannabis Extraction*. 2020.
  34. De Vita, D., et al., *Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis*. Natural product research, 2020. **34**(20): p. 2952-2958.
  35. Deng, Q., et al., *The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications*. Food Engineering Reviews, 2015. **7**(3): p. 357-381.
-

36. Fahey, J., *Method of extraction of isothiocyanates into oil from glucosinolate-containing plants and method of producing products with oil containing isothiocyanates extracted from glucosinolate-containing plants*. 2006, Google Patents.
37. Omirou, M., et al., *Microwave-assisted extraction of glucosinolates from Eruca sativa seeds and soil: comparison with existing methods*. *Phytochemical analysis*, 2009. **20**(3): p. 214-220.
38. Sun, M., et al., *Comparison of canola meals obtained with conventional methods and supercritical CO<sub>2</sub> with and without ethanol*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008. **85**(7): p. 667-675.
39. Volmajer Valh, J., et al., *Microencapsulation of Cannabidiol in Liposomes as Coating for Cellulose for Potential Advanced Sanitary Material*. *Coatings*, 2021. **11**(1): p. 3.
40. Lai, H.N., *Process for producing a nano-cbd microemulsion system*. 2019, Google Patents.
41. Rhodes, T. and D. Duffey, *Method of Encapsulating Cannabinoids in Phospholipid Carriers*. 2020, Google Patents.
42. Lai, H.N., *Process for producing a nano-CBD liposome system*. 2020, Google Patents.
43. Radünz, M., et al., *Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020. **192**: p. 111020.
44. GÓMEZ, J.S., L.O. GARCÍA, and M.C.V. VELASCO, *Formulation of glucosinolates and myrosinase*. 2018, Google Patents.
45. Yang, H., et al., *Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles encapsulated fluorescent isothiocyanate and paclitaxol: preparation, release kinetics and anticancer effect*. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2009. **9**(1): p. 282-287.