

*Viviamo in un mondo che ci disorienta con la sua complessità. Vogliamo comprendere ciò che vediamo attorno a noi e chiederci: Qual è la natura dell'universo? Qual è il nostro posto in esso? Da che cosa ha avuto origine l'universo e da dove veniamo noi? [...] quand'anche ci fosse una sola teoria unificata possibile, essa sarebbe solo un insieme di regole e di equazioni. Che cos'è che infonde vita nelle equazioni e che costruisce un universo che possa essere descritto da esse? L'approccio consueto della scienza, consistente nel costruire un modello matematico, non può rispondere alle domande del perché dovrebbe esserci un universo reale descrivibile da quel modello. Perché l'universo si dà la pena di esistere? [...] Se però perverremo a scoprire una teoria completa, essa dovrebbe essere col tempo comprensibile a tutti nei suoi principi generali, e non solo a pochi scienziati. Noi tutti – filosofi, scienziati e gente comune – dovremmo allora essere in grado di partecipare alla discussione del problema del perché noi e l'universo esistiamo. Se riusciremo a trovare la risposta a questa domanda, decreteremo il trionfo definitivo della ragione umana: giacché allora conosceremo la mente di Dio.“*

*Stephen Hawking*

*Al mio Salento*

# INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
2.1 - Cenni storici	3
2.2 - Canapicoltura in Italia	5
2.3 - Cenni di botanica	8
2.4 - Classificazione tassonomica	12
2.5 - Composizione chimica	20
2.5.1 - Biosintesi	20
2.5.2 - Componenti cannabinoidi	24
2.5.3 - Componenti non cannabinoidi	26
2.5.3.1 - Terpeni	27
2.6 - Aspetti normativi in Italia	32
2.6.1 - Legislazione della <i>Cannabis</i> medica	33
2.6.2 - Legislazione della canapa industriale	34
2.7 - Applicazioni terapeutiche della <i>Cannabis</i> medica	35
2.8 - Utilizzi e scopi della canapa industriale	39
<b>3. SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>43</b>
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	<b>44</b>
4.1 - Prodotti chimici	44
4.2 - Materiale Vegetale	44
4.2.1 - Semina, campionamento ed essiccamento	44
4.2.2 - Preparazione del materiale vegetale	46
4.3 - Estrazione con il Soxhlet	47
4.4 - Estrazione con SC-CO <sub>2</sub>	49
4.5 - Analisi estratti	49
4.5.1 - Analisi qualitativa di terpeni e cannabinoidi mediante GC-MS	49
4.5.2 - Analisi quantitativa di terpeni e cannabinoidi mediante GC-FID	50
4.5.2 - Analisi dei cannabinoidi mediante HPLC-UV/DAD	50
4.6 - Analisi statistiche	51
<b>5. RISULTATI</b>	<b>52</b>
<b>6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>63</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>

## ***1. RIASSUNTO***

La *Cannabis sativa* L. è una specie erbacea originaria dell'Asia centrale usata sin dall'antichità come alimento per l'uomo, foraggio per il bestiame, fonte di fibre tessili e numerose altre applicazioni. Grazie alla presenza di composti bioattivi, anche psicotropi come il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC o THC), alcune varietà sono state tradizionalmente utilizzate come rimedi medicinali, ma anche a scopo sacrale-religioso e ludico-ricreativo come sostanza stupefacente. Dopo un lungo periodo di oblio, dovuto alle leggi contro il commercio illecito e la diffusione delle droghe che hanno pesantemente penalizzato la coltivazione anche delle cultivar a ridotto contenuto di THC, la *Cannabis* industriale è stata di recente rivalutata grazie alla sua versatilità di utilizzo, estrema rusticità e scarse esigenze nutritive e idriche. Inoltre, le recentissime acquisizioni scientifiche sui potenziali effetti positivi sulla salute dell'uomo di alcuni fitocannabinoidi non psicotropi [es. cannabidiolo (CBD) e cannabigerolo (CBG)] e di altri terpeni (es.  $\beta$ -caryophyllene e  $\alpha$ -humulene), hanno acceso grande interesse verso la valorizzazione delle infiorescenze di canapa industriale il cui uso era, fino a pochi anni fa, del tutto marginale. Pertanto, in questo lavoro di tesi, è stata condotta un'indagine sperimentale per identificare e caratterizzare dal punto di vista qualitativo, i composti terpenofenolici (terpenoidi e fitocannabinoidi) presenti nelle infiorescenze essiccate di quattro cultivar di canapa industriale (C.S. Carmagnola, Fedora 17, Futura 75 e Santhica 27) coltivate in Salento nella stagione produttiva 2017. Tali composti sono stati estratti dalle infiorescenze, sia con tecniche convenzionali (Soxhlet), utilizzando una miscela di solventi organici, che mediante l'uso di anidride carbonica allo stato supercritico (SC-CO<sub>2</sub>). Quest'ultima strategia ha permesso di ottenere estratti "solvent free" direttamente utilizzabili per la formulazione di prodotti alimentari, nutraceutici, cosmeceutici e farmaceutici.

Una analisi comparativa dei risultati ottenuti ha inoltre permesso di evidenziare differenze e similitudini nei profili fitochimici degli estratti e delle cultivar esaminate. In particolare, il materiale oleo-resinoso ottenuto mediante il Soxhlet non ha evidenziato la presenza di monoterpeni, identificati invece negli estratti con SC-CO<sub>2</sub>.  $\alpha$ -pinene e terpinolene sono stati riscontrati solo nelle cultivar C.S. Carmagnola e Futura 75, mentre gli isomeri E,E, E,Z del 2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene e il (-)-borneolo, sono risultati comuni a tutte le cultivar. La componente sesquiterpenica rappresenta la classe più complessa, mostrando una variabilità significativa tra le cultivar analizzate.  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene e caryophyllene oxide sono i sesquiterpeni prevalenti negli estratti ottenuti sia con il Soxhlet che con SC-CO<sub>2</sub>. Anche la componente fitocannabinoidica è risultata variabile tra le diverse cultivar

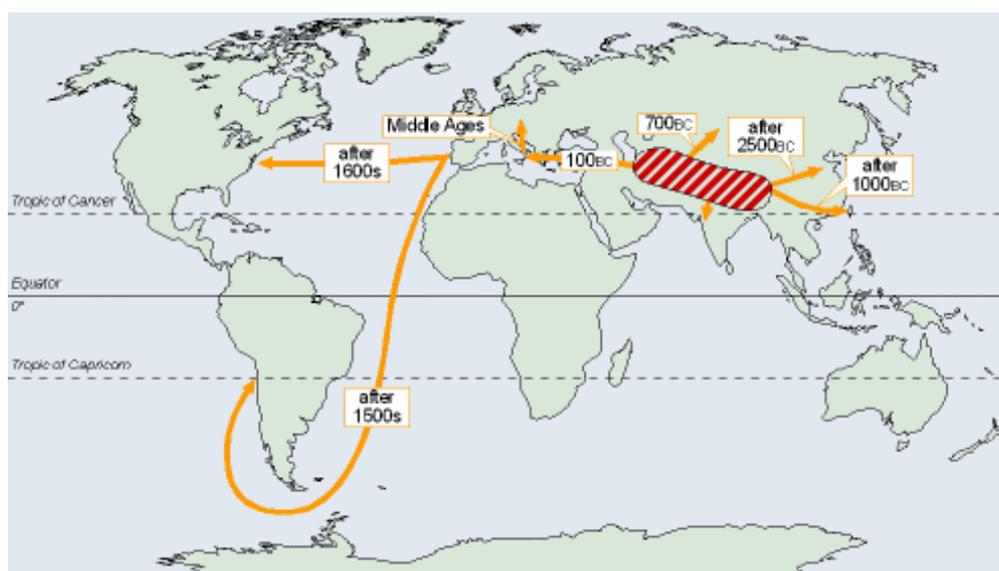
evidenziando la prevalenza delle forme acide e neutre del CBD nelle cultivar C.S. Carmagnola, Fedora 17 e Futura 75 e del CBG nella Santhica 27.

In conclusione, questo studio conferma la complessità del profilo terpenofenolico delle infiorescenze secche di canapa industriale e la variabilità tra le cultivar, che rappresentano pertanto, interessanti fonti di molecole bioattive potenzialmente utili per la salute e il benessere psicofisico dell'uomo.

## **2. *INTRODUZIONE***

## 2.1 - Cenni storici

La canapa (*Cannabis sativa* L.) è una pianta erbacea annuale con fusto ramificato originaria del Sud-est asiatico dove fiorisce spontaneamente nell'immensa area che va dal basso Danubio alla Cina settentrionale. Dal suo areale di origine si è diffusa in tutto il mondo come pianta coltivata dapprima nell'est asiatico ed in Europa per poi raggiungere le Americhe con i primi conquistatori (Fig. 1).



**Fig. 1:** Distribuzione geografica nel mondo della *Cannabis* nell'antichità.

In Cina, al tempo dell'impero di Shen Nung (2007 a.C.), la canapa era una pianta tessile fondamentale per la popolazione come riportato dall'antichissima raccolta di documenti relativi agli eventi della storia della Cina nota come “*Shūjīng* “ o “Libro canonico dei documenti”. Fra il 70 e l'80 a.C., sempre in Cina, la canapa era la materia prima per la fabbricazione della carta. In Europa, fu introdotta dagli Sciti fra il IV e gli inizi del III millennio a.C. e, successivamente, dai Traci che la tessavano per farne vesti. Erodoto narra che nella terra degli Sciti, al di là del Mar Nero, nasceva la canapa, molto simile al lino. Questi popoli usavano gettare “semi di canapa” sulle pietre arroventate al fuoco per poi immergersi nei loro fumi lanciando urla di gioia. Tuttavia, il primo uso documentato della *Cannabis* ad uso sacramentale e religioso è ben più antico e risale a oltre 120 mila anni fa, come testimoniato dal ritrovamento di semi, resina e cenere in un sito paleolitico nella zona montuosa dell'Hindu Kush in Pakistan dove foglie, gemme e resina, venivano bruciate respirandone il fumo per godere delle proprietà psicotrope ed avvicinarsi alla divinità. Al giorno d'oggi questa rappresenta la più antica prova di utilizzo intenzionale di sostanze a

scopo psicotropo da parte dell'uomo. In Europa la *Cannabis* arriva probabilmente 2500 anni fa e viene usata sulla base di ricette derivate dalla tradizione e dalla medicina popolare. È tra il 1840 e il 1900 che vengono pubblicati in Europa e negli USA più di 100 articoli sugli usi medici della *Cannabis* come potente narcotico, analgesico, sonnifero, per il trattamento delle convulsioni, l'isteria, la depressione mentale, la pazzia, la dismenorrea e la menorragia (Reynolds, 1890).

All'inizio del Novecento l'uso della *Cannabis* conosce una sempre maggiore diffusione, compare nelle farmacie europee ed americane e viene inserita nella farmacopea ufficiale. Nel 1937, viene inserita, negli Stati Uniti, nella lista degli stupefacenti, poiché fu approvata una legge che proibiva la coltivazione di qualsiasi tipo di canapa, anche a scopo industriale. Di conseguenza, il suo utilizzo come farmaco subisce un forte crollo anche in Europa con conseguente riduzione delle pubblicazioni scientifiche dedicate all'argomento nei decenni successivi.

L'interesse medico per la *Cannabis* si risveglia all'inizio del 1970, in seguito alla scoperta del  $\Delta^9$ -THC (Gaoni e Mechoulam, 1964), il suo principale componente psicoattivo. Nel 1971 Lester Grinspoon, uno psichiatra di Harvard, pubblica il libro "*Marijuana reconsidered*" (Grinspoon, 1971), in cui porta il risultato delle sue ricerche sull'argomento e sostiene che la posizione ufficiale, e di conseguenza il giudizio popolare, erano viziati alla base di pessime informazioni, se non di vere e proprie bugie e manipolazioni. Più recentemente, Devane et al. (1988) descrivono la presenza nel corpo umano di un recettore di membrana capace di essere attivato dal  $\Delta^9$ -THC aprendo nuove e importanti prospettive per l'uso terapeutico della *C. sativa* L. Infatti sono ormai decenni che le aziende farmaceutiche, estraggono molecole dalla canapa o producono cannabinoidi sintetici, a questi si aggiungono prodotti vegetali a base delle sue infiorescenze tra cui Bedrocan, Bedrobinol, Bediol, per il trattamento di numerose patologie (cancro, morbo di Parkinson, ansia, stress, epilessia, fibromialgia, terapie del dolore e molte altre), oppure il Sativex, un estratto naturale, autorizzato per gli spasmi muscolari in persone affette da sclerosi multipla (Rekand, 2014).

## 2.2 - Canapicoltura in Italia

I primi documenti che testimoniano la presenza della canapa in Italia sono riconducibili al periodo dell'impero romano, ma la vera diffusione di questa coltura, particolarmente nel Nord e Centro, risale al medioevo. Oltre all'importanza economica per i regni presenti sul territorio, questa coltivazione giocava un ruolo fondamentale nell'economia domestica, poiché con essa le famiglie potevano ricavare vestiti, fili, cordami e alimenti ed un esempio che dimostra l'importanza della canapa per il mondo agricolo viene offerto da questa testimonianza: *“Tutti, proprio tutti erano coinvolti nel lavoro, nel periodo della canapa; uomini e donne, grandi e piccoli, vecchi e giovani. Lavori pesanti, lavori semplici, facili e difficili, brevi e lunghi. Dall'alba al tramonto. Questa era la canapa: il nostro tormento, la nostra speranza”* (Burani e Fabbri, 1997). Vera e propria ode a questa coltivazione, viene sottolineata anche nel poemetto *“Il Canapajo”* di Gerolamo Baruffaldi (1741), che ne mostra il profondo rapporto con l'ambiente contadino.

L'Italia è stata per secoli, fino alle prime decadi del Novecento, il secondo produttore mondiale di canapa, dopo la Russia (Tab. 1). Nel 1910, in tutta la penisola si coltivavano a canapa circa 80.000 ettari di terreno. Piemonte ed Emilia erano le aree in cui veniva coltivata la canapa di migliore qualità, oltre a Ferrara, il maggior centro di produzione era a Carmagnola nel torinese, località che diede il nome ad una varietà particolarmente pregiata di canapa tessile per qualità e resistenza delle fibre.

Paesi	Ettari coltivati	Quintali prodotti	Media per ettaro
Russia	686.197	3.440.579	5
Italia	79.477	795.000	10
Russia Asiatica	66.197	297.049	4.5
Ungheria	65.192	587.954	9
Francia	17.214	147.266	8.7
Giappone	13.518	94.893	7.1
Serbia	14.025	67.025	4.8
Romania	5.678	19.035	3.4
Bulgaria	3.015	9.679	3.3

Tab. 1: Produzione della canapa in Eurasia tra il 1903-1913 (Capasso, 1994).

Nonostante l'Italia fosse un'importante produttrice di canapa, fino all'unità del Paese non esistevano impianti di prima trasformazione, molto avanzati, invece, in Inghilterra, Francia e Germania che, tuttavia ne importavano gran parte della materia prima. La preferenza per altri filati naturali (cotone e juta) e l'arretratezza rispetto agli altri paesi europei non fecero mai decollare i canapifici italiani, che, dopo la comparsa delle fibre sintetiche, si avviarono verso

un rapido declino. Dopo la seconda guerra mondiale, anche la superficie coltivata a canapa inizia a contrarsi di anno in anno, arrivando, nel 1970, sotto al migliaio di ettari sull'intero territorio nazionale. Per evitare la scomparsa della canapicoltura, nel 1970, la Comunità Europea eroga un contributo pari a 1,5 milioni delle vecchie lire per ogni ettaro di terreno coltivato a canapa con tasso di  $\Delta^9$ -THC inferiore allo 0,3% (Regolamento CEE n.1308/70 del 29-06-1970).

Due anni dopo, l'Onu approvò la Convenzione sugli stupefacenti decretando la scomparsa definitiva di quella che fino alla metà del 1900 aveva rappresentato una delle colture più importanti della penisola italiana e del Mediterraneo.

L'Italia decide di reintrodurre la coltivazione a fini industriali negli anni '90, in seguito al Ddl (n.2136 del 2 febbraio 1997) in cui si mostrava l'espansione della canapicoltura nel resto d'Europa, con la richiesta sempre maggiore di fibre vegetali nel mercato. Successivamente venne emanata la circolare n.734 del 2 dicembre 1997 (G.U. n.62 del 16 marzo 1998) nella quale si regolamentava la reintroduzione di questa coltura nella penisola italiana. Grazie a questo intervento nacquero due importanti associazioni: il Consorzio Canapa Italia e Assocanapa.

L'assenza di un'intera filiera e di impianti di prima trasformazione che lavorassero la materia prima, non sembravano sufficienti ad attrarre i coltivatori. Nella fine degli anni Novanta, l'Unione Europea decise di apportare delle modifiche al regolamento proposto nel 1970. Ci si accorse che la canapa industriale, non aveva come unica finalità quella di offrire materia prima all'industria tessile come si era pensato con il primo regolamento ed inoltre molte coltivazioni erano sorte a fine speculativo o per nascondere coltivazioni da droga.

Nel 2000 in Europa infatti vennero emanati i regolamenti (CEE) n.1672/2000 e n.1673/2000 e i regolamenti (CEE) n.2860/2000 e n.245/2001, volti a specificare quali seminativi utilizzare e come dovesse avvenire la trasformazione delle paglie in fibra. L'Italia, per adeguarsi a questi nuovi regolamenti dell'Unione Europea, decise di pubblicare la Circolare del MIPAF n.125 prot. 200 (8-5-2002).

Attualmente la diffusione ancora scarsa della coltivazione della canapa, si deve agli effetti del proibizionismo, che nei decenni scorsi ha fortemente limitato lo sviluppo del settore: in Italia esistono ancora pochissimi macchinari adeguati alla trasformazione della materia prima e alla produzione di derivati su larga scala, e solo nell'ultimo periodo ci si sta impegnando a migliorare la situazione (Amaducci et al., 2015).

Tuttavia recentemente con la nuova legge sulla canapa industriale (GU n.304 del 30-12-2016), entrata in vigore il 14 gennaio 2017, è possibile attendersi un cambiamento di rotta,

nonché un periodo propizio per il settore. Nonostante la scarsità di informazioni sull'influenza della gestione della qualità del prodotto e sulle varietà da preferire a seconda della destinazione d'uso finale, questa coltivazione ha un enorme potenziale di applicazione in ogni settore, che verrà innalzato ulteriormente nel momento in cui saranno identificati i geni dai quali dipendono le caratteristiche qualitative della materia prima che si andrà a ricavare, in modo da indirizzare una selezione di varietà specifiche per determinati utilizzi. (Amaducci et al., 2015)

## 2.3 - Cenni di botanica

*Cannabis* è un genere di piante angiosperme annuali dicotiledoni (Fig. 2), appartenente alla famiglia delle *Cannabacee* (di cui fa parte anche il luppolo, *Humulus lupulus*, L.).




---

A	Infiorescenza della pianta maschile	7	Fiore pistillato con ovaie
B	Infiorescenza della pianta femminile	8	Seme con bracteolo
1	Fiore staminato	9	Seme senza bracteolo
2	Organo riproduttivo del fiore staminato	10	Seme (visione laterale)
3	Organo riproduttivo del fiore staminato	11	Seme (sezione trasversale)
4	Grani di polline	12	Seme (sezione longitudinale)
5	Fiore pistillato con bracteolo	13	Seme (senza pericarpo)
6	Fiore pistillato senza bracteolo		

---

**Fig. 2:** Aspetti morfologici della *C. sativa* L.

La *C. sativa* L. è una pianta erbacea a ciclo annuale, l'altezza varia tra 1,5 - 2 m, ma in sottospecie coltivate può arrivare anche a 5 metri. Presenta una lunga radice fittonante e un fusto, eretto o ramificato, con escrescenze resinose, angolate, a volte cave, specialmente al di

sopra del primo paio di foglie. Le foglie sono picciolate e provviste di stipole; ciascuna è palmata, composta da 5-13 foglioline lanceolate allungate, a margine seghettato, con punte acuminate. Le foglie alla base della pianta si presentano opposte, nella parte apicale invece tendono a crescere alternate, semplici o trisegmentate, soprattutto dopo il nono-decimo nodo della pianta, ovvero a maturazione sessuale avvenuta. Con l'avanzare della fioritura, il numero di foglioline per foglia diminuisce, fino ad arrivare a una singola piccola fogliolina che appare prima di ogni coppia di fiori (Clarke, 1981). Anche se attualmente sono state selezionate numerose varietà monoiche, in origine la pianta era dioica e i fiori unisessuali crescono su individui di sesso diverso. I fiori maschili (staminiferi) sono riuniti in racemi ascellari e ciascuno presenta 5 tepali fusi alla base e 5 stami (Fig. 3).



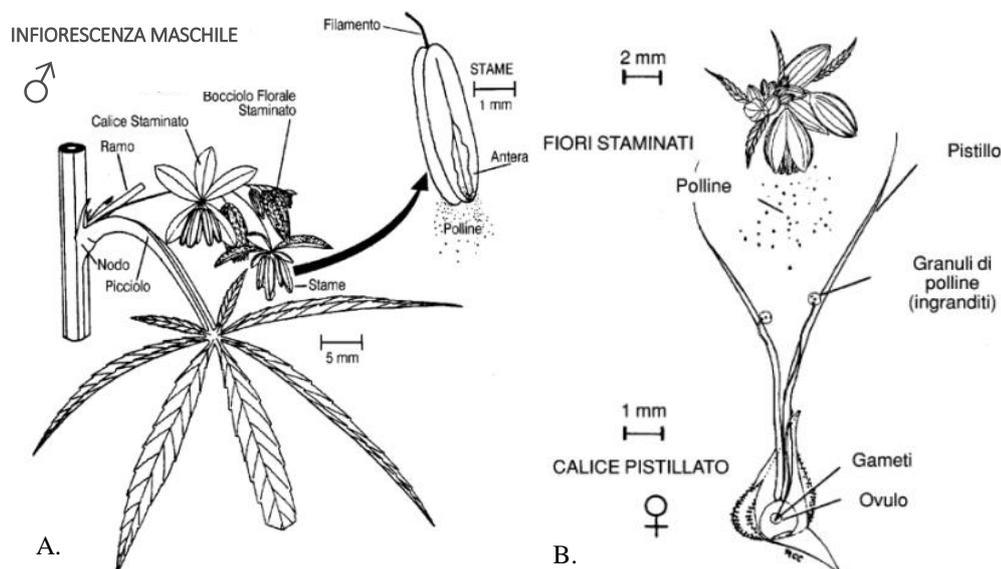
**Fig. 3:** Infiorescenza maschile e femminile a confronto.

I fiori femminili (pistilliferi) sono riuniti in gruppi di 2-6 alla base di brattee formanti spighe glomerulate. Presentano un calice urceolato che circonda l'ovario uniovulato. Il fiore femminile, con la maturazione, si ricopre progressivamente di tricomi ghiandolari, i quali rappresentano i principali siti di bioaccumulo dei principi attivi, cannabinoidi e terpeni, che conferiscono alla pianta uno spiccato odore (Hillig e Mahlberg, 2004).

A causa della variabilità di bioaccumulo, per standardizzare i risultati di due o più coltivazioni successive, occorre considerare lo stesso numero di giorni per ogni ciclo di coltivazione (più o meno 3 mesi), con una stessa varietà clonale e non variare i parametri ambientali che, potenzialmente, influiscono sulla produzione di cannabinoidi.

Le piante maschili, solitamente, muoiono subito dopo aver rilasciato il loro polline, mentre quelle femminili muoiono solo dopo aver completato la produzione dei semi, alcuni mesi dopo la fioritura. Inoltre le piante maschili mostrano un più rapido aumento in altezza e un più

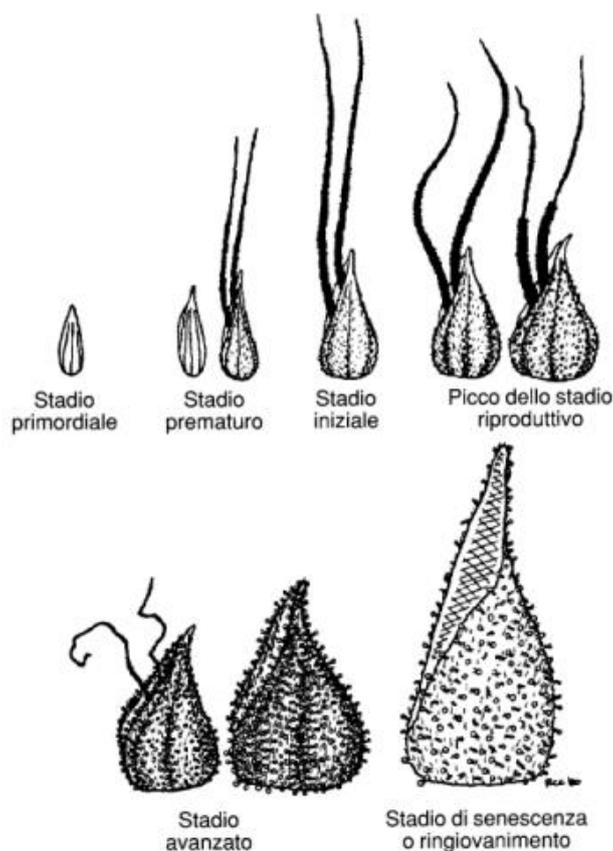
rapido decremento nelle dimensioni della foglia; le foglioline che accompagnano i fiori maschili, risultano di dimensioni assai inferiori rispetto alle foglioline che accompagnano i fiori femminili (Fig. 4).



**Fig. 4:** Fiori embrionali maschili con formazione di piccoli boccioli, uniti allo stelo per mezzo di un minuscolo stelo e produzione di polline (A). Fiori femminili riconoscibili dall'ingrossamento dell'embrione, da cui spuntano due pistilli bianchi (o gialli, o rossi). Questi pistilli hanno la funzione di catturare il polline maschile, portato dal vento, per l'impollinazione dell'ovulo femminile che si trova internamente al calice (B).

Sebbene non sia possibile distinguere il sesso della pianta prima della fioritura, le più recenti e moderne applicazioni genetiche, combinate con marcatori molecolari associati al sesso maschile, ne permettono la discriminazione precoce (Mandolino et al., 1999; Törjek et al., 2002).

Biosintesi e bioaccumulo dei cannabinoidi sono localizzati in ghiandole epidermiche specializzate, distribuite su tutta la superficie aerea della pianta. Le ghiandole variano in forma, densità numerica e attività secretoria, a seconda del sito di ubicazione e della fase fenologica raggiunta. La produzione dei cannabinoidi, associata a quella dei terpeni, avviene in maggior misura nelle fioriture femminili (Fig. 5) rispetto a quelle maschili e la pianta dioica femminile è il principale oggetto delle coltivazioni di *Cannabis* terapeutica.



**Fig. 5:** Sviluppo di calici non fertilizzati: dai primordi si sviluppano pistilli che seccano e muoiono, mentre il calice si ingrossa e aumenta la produzione di resina.

Il frutto è un achenio bivalente, liscio, indeiscente, di forma ovoidale o quasi sferica. Il pericarpo ha consistenza cornea, il colore non è uniforme, ma si presenta più o meno macchiettato, grazie ad un reticolo di fasci vascolari situato sotto l'epidermide. Predomina il bruno, talora olivastro o tendente al rossiccio, ma non mancano frutti più chiari, biancastri e verdognoli. Ogni achenio contiene un solo seme di dimensioni variabili (il *range* del peso di 1000 semi è variabile da 3 a 60 g). L'embrione ha due cotiledoni ricchi di sostanze di riserva, una radichetta e un fusticino poco sviluppati.

La pianta germina in primavera e fiorisce in estate inoltrata quando le ore di luce iniziano a diminuire (brevidiurna) (Bocsa e Karus, 1998).

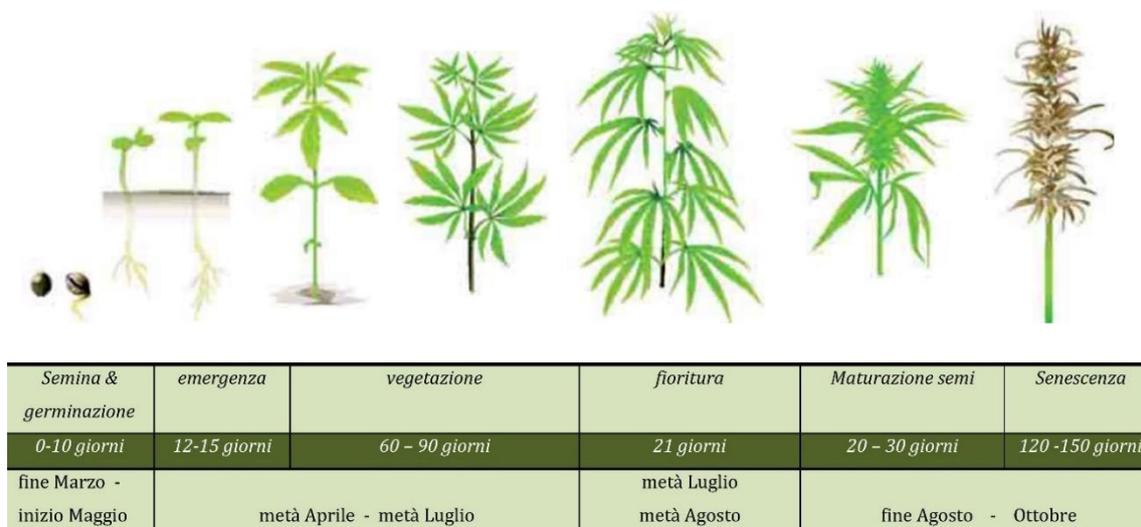
La maggior parte della coltivazione di *Cannabis* al mondo avviene ancora all'aperto e in genere, ma non necessariamente, a partire da seme, perché far crescere la *Cannabis* a partire dai semi significa che metà del raccolto potrebbe essere costituito da piante maschili non desiderate. Nella coltivazione intensiva in serra questo viene, in genere, evitato, attraverso la clonazione e la produzione al coperto, che vanno di pari passo, utilizzando spesso tecniche idroponiche, ossia coltivazione in soluzioni nutrienti invece che nel suolo.

La *Cannabis* industriale viene coltivata e prodotta per ottenere i suoi semi e le sue fibre. Comprende diverse varietà di *Cannabis sativa*, specifiche per usi agricoli e industriali ed è caratterizzata da un basso contenuto di THC e da un elevato contenuto di CBD. Nella maggior parte dei paesi europei, il limite legale massimo di contenuto di THC nelle fibre è pari allo 0,2%.

La raccolta delle fibre avviene alla fine della fioritura delle piante femminili e prima della formazione dei semi.

Il ciclo vitale della *C. sativa* ha una durata di circa 120-150 giorni e si completa con la fioritura (Fig. 6). Il ciclo della fioritura può durare ovunque tra le 4 e le 12 settimane, a seconda della varietà e delle condizioni ambientali.

Un buon segno di maturazione è il colore degli stigmi, struttura simile ad una peluria. Non appena il fiore matura, questi in genere si raggrinzano e diventano marroni. Quando all'incirca il 75% degli stigmi è marrone, le piante sono pronte per la raccolta.



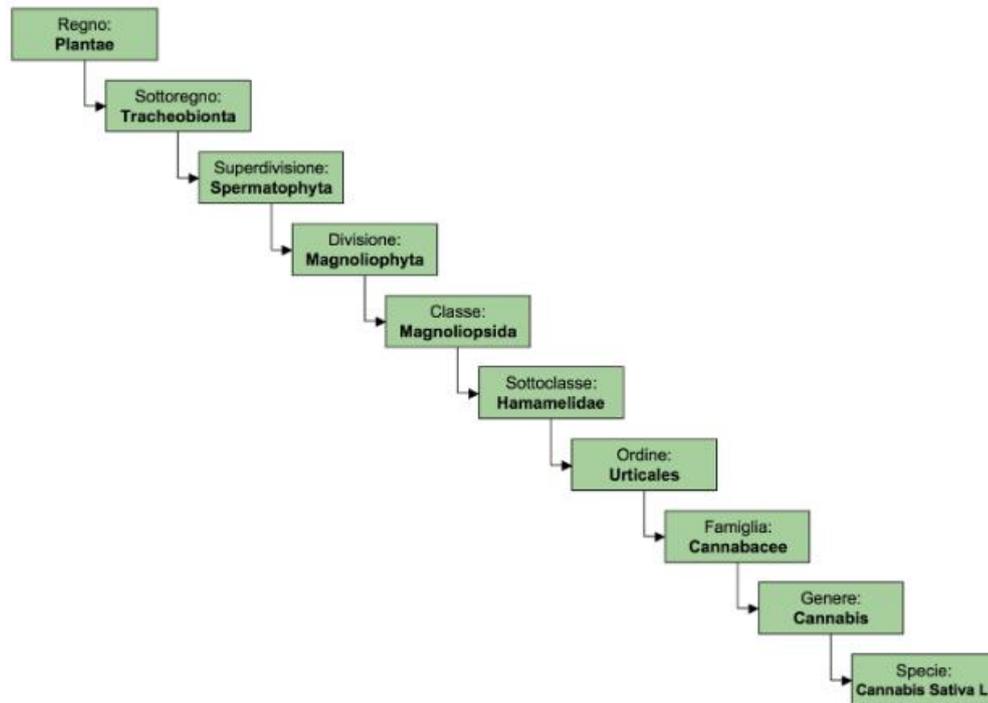
**Fig. 6:** Ciclo vitale e fasi fenologiche della *Cannabis Sativa* L.

## 2.4 - Classificazione tassonomica

Il genere *Cannabis* è oggi distribuito in tutto il mondo, dall'equatore a circa 60° Nord di latitudine e in gran parte dell'emisfero Sud. Le prime classificazioni botaniche del genere *Cannabis* risalgono al XVIII secolo.

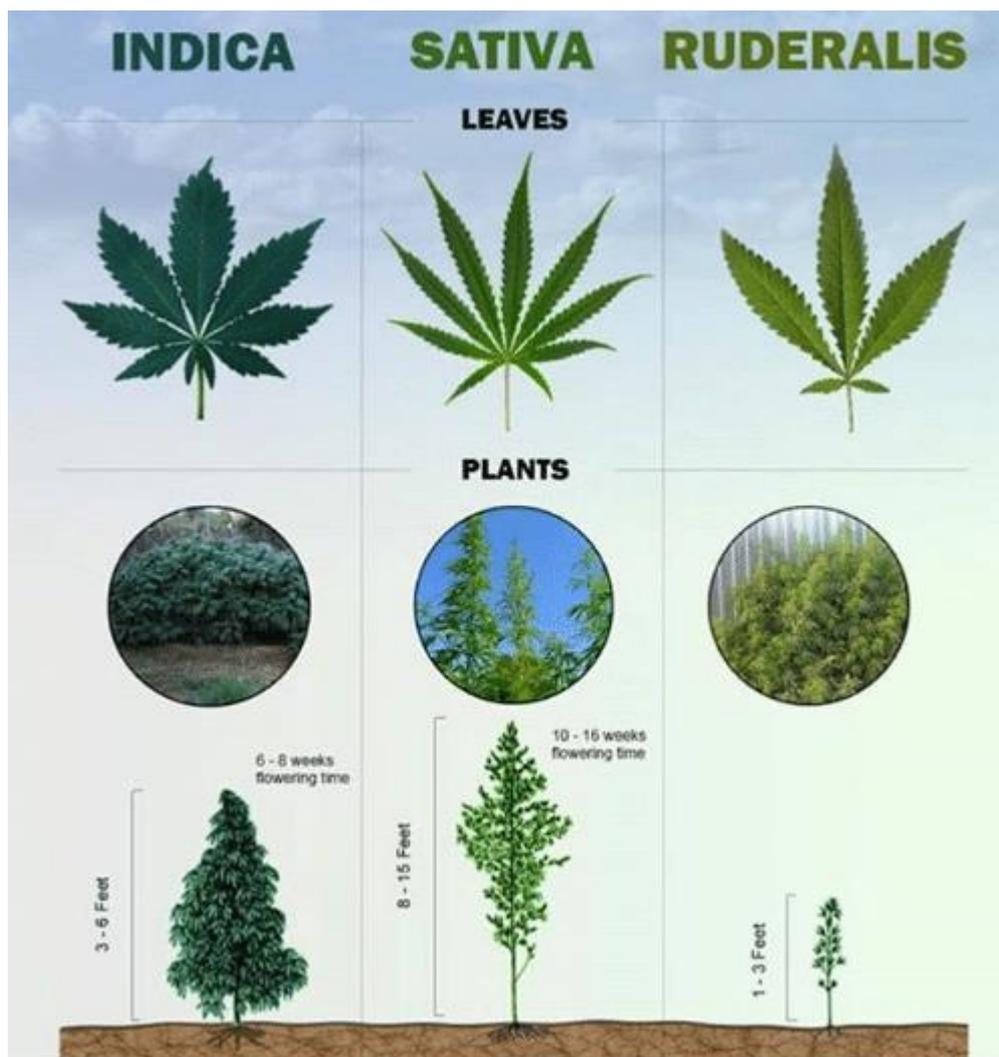
Il primo uso registrato del nome "*Cannabis sativa*" risale al 1623 nel *Pinax Theatri Botanici* attribuito da Caspar Bauhin (Brown, 1998), anche se l'ufficializzazione si ha nel 1723 nello "*Species Plantarum*" di Linneo.

Il sistema di Cronquist, per la classificazione delle Angiosperme (o Magnoliophyta), include la *C. sativa* L., nella famiglia delle *Cannabacee*, appartenente all'ordine delle *Urticales* (Fig. 7) (Cronquist, 1981).



**Fig. 7:** Tassonomia della *Cannabis sativa* L. secondo il sistema di Cronquist (1981).

Negli anni successivi all'ipotesi di Lamarck (1785), prevalse la tendenza ad ascrivere al genere la sola specie *Cannabis sativa* L. come ipotizzato originariamente da Linneo nel 1753, nell'ambito della quale si distinguevano due tipi: uno nordico e uno meridionale che corrispondeva alla *Cannabis indica* Lam. (Schultes, 1970). Nel tipo nordico rientravano le varietà coltivate per la produzione di fibra (oggi raggruppate sotto col nome generico di “canapa”), caratterizzate da taglia alta e ridotta ramificazione. Al tipo meridionale furono assegnate, invece, le piante da droga (oggi raggruppate col nome generico di “cannabis”), caratterizzate da bassa statura e fitta ramificazione. Hillig nel 2005, basandosi sull'analisi genetica, morfologica e chimica di 157 accessioni di *Cannabis* di differente origine geografica, conferma l'esistenza di due specie principali, *C. sativa* e *C. indica*, e riconosce la probabile esistenza di un terzo pool genetico corrispondente a *C. ruderalis* Janisch. (Fig. 8) (Hillig, 2005).



**Fig. 8:** Differenze tra *C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*.

Il pool genico di *C. sativa* include ecotipi di canapa provenienti da Europa, Asia centrale e Asia sud-occidentale, nonché varietà naturalizzate dell'Europa orientale. Il pool genico di *C. indica* è più vario rispetto a come era stato concepito da Lamarck, oltre agli ecotipi da “droga”

dalla lamina fogliare stretta, include ecotipi da “droga” a lamina fogliare ampia dall’Afghanistan e dal Pakistan; ecotipi di canapa dal sud-est asiatico e popolazioni spontanee da India e Nepal.

Un recente studio di Hillig e Mahlberg (2004), impostato sulle analisi chimiche, genetiche e morfologiche di numerose accessioni, ha supportato nuovamente il concetto dell’esistenza di vari taxa presenti nel genere *Cannabis*, due taxa per *Cannabis sativa* e quattro taxa per il genere *Cannabis indica*, di seguito descritti ed esaminati da Hillig.

- *Cannabis ruderalis*

Cresce spontanea in Kazakhstan e in Kirgizstan; è molto diffusa anche nella Siberia nord-occidentale. Molto veloce a fiorire, si tratta di una combinazione degli elementi presenti nella *indica* e nella *sativa*. Viene considerata la “specie primitiva” (o “wild hemp”), non è mai stata domesticata. Solitamente presenta fitocannabinoidi intorno all’1%, con preponderanza del CBD e con un contenuto di terpeni e flavonoidi inferiore rispetto alla *sativa* e alla *indica*.

- *Cannabis sativa ssp. sativa*

Si trova soprattutto nelle zone del mondo più vicine all’equatore, dove i climi in tali aree sono caldi, umidi, e in generale con 12 ore di luce solare al giorno. Coltivate nel terreno sono alte (gli internodi sono molto allungati) e presentano grappoli di fiori radi e soffici, con aromi dolci, come l’ananas, speziati e mentolati, e con effetti cerebrali.

Cresce nelle zone a basso contenuto di nutrienti e solitamente la maggior parte delle varietà *sativa* coltivate in terra che sopravvivono sono resistenti. Comprende le tipiche piante da fibra coltivate per millenni in Europa. Nel corso dei secoli il genere umano è riuscito a massimizzare la qualità e la lunghezza della fibra di canapa, selezionando piante dal portamento eretto e poco ramificate (facilità di raccolta), in grado di produrre fusti alti, cavi e sottili. Oltre a questi caratteri la selezione ha riguardato anche la produzione di seme. Questa specie mostra una maggiore diversità genetica rispetto la *C. indica* (Hillig, 2005). Si espanse nel nuovo mondo dal Chile, nel 1500, fino a divenir naturalizzata in nord-America nell’800, dove era coltivata massicciamente. Nonostante le differenze tra pianta e pianta possono esser notevoli, e la presenza dell’allele *Bt* sia ampia in questo pool, vi è forte influenza dell’allele *Bd*, con produzione di CBD che può arrivare fino al 4-5%. Un rapporto THC:CBD comune in queste piante è di 1:3.

In ambito terapeutico le varietà *C. sativa* pure (Haze, Thai, centro africane) sono indicate per traumi, problemi alle terminazioni nervose, paraplegia, sclerosi multipla, ma sconsigliate per esempio per l’epilessia.

Tutte le varietà di canapa industriale sono considerate *Cannabis sativa*, coltivata per il suo contenuto di fibra. La canapa contiene anche semi (a uso industriale si coltivano sia varietà dioiche che varietà monoiche) e, a differenza di varietà medicinali, presenta un contenuto di THC decisamente scarso.

- *Cannabis sativa ssp. spontanea*

Include piante ruderali originarie dell'Europa orientale e dell'Asia occidentale che presentano caratteristiche genetiche intermedie tra *C. sativa ssp. sativa* e *C. ruderalis*. Secondo Hillig (2005) questa ipotetica sottospecie potrebbe rappresentare il biotipo ancestrale all'interno del quale si sono evoluti i tratti genetici della *C. sativa ssp. sativa*.

- *Cannabis indica ssp. kafiristanica*

Hillig assegna questo presunto taxon alle ruderali piante da droga originarie del Nepal e dell'India settentrionale. In base alle evidenze genetiche raccolte (Hillig, 2005) e ai risultati delle analisi chimiche sul contenuto in cannabinoidi (Hillig e Mahlberg, 2004), questo presunto taxon potrebbe rappresentare l'antenato della *C. indica ssp. indica*. Nonostante la bassa percentuale di principi attivi, si possono comunque trovare apprezzabili quantità di THC e CBD in queste piante e l'allele *Bd* è ancora presente, non è stato escluso dalla selezione umana, trattandosi di un biotipo selvatico.

- *Cannabis indica ssp. indica*

È una pianta coltivata da secoli in India per le sue proprietà psicoattive, non supera i 3 metri, con foglie palmate caratterizzate da lembi lanceolati particolarmente stretti e acuminati, da qui la definizione NLDB ad indicare "*Narrow Leaflet Drug Biotype*". Si tratta di una specie subtropicale con un lungo periodo vegetativo, che si è adattata a climi particolarmente umidi e a precipitazioni abbondanti. In questo biotipo il contenuto di fitocannabinoidi può arrivare fino al 14%. Un rapporto THC:CBD di 100:1 non è inusuale. Il terpene tipico di questo pool è il *trans*- $\beta$ -farnesene. Questo pool genetico presenta una forte frequenza dell'allele *Bt* e piante che portano due copie di questo allele sono presenti con apprezzabile frequenza solo in questo biotipo, ad indicare la forte influenza della selezione umana.

- *Cannabis indica ssp. afghanica*

Originario dell'Afghanistan e del Turkmenistan occidentale, il biotipo si è evoluto adattandosi a climi freddi e a terreni aridi, le condizioni ambientali hanno determinato lo sviluppo di piante caratterizzate da bassa statura e accentuata ramificazione che necessitano di un breve periodo di crescita. Hillig (2005) assegna questo presunto taxon alle piante di *Cannabis* con foglie palmate, composte da lembi oblanceolati (lamina fogliare più ampia in corrispondenza dell'apice), di colore verde scuro anche definita BLDB ossia "*Broad Leaflet*

*Drug Biotype*” è coltivata esclusivamente per la produzione di droga, principalmente “*hashish*” (un concentrato di principi attivi ottenuto dalla resina della pianta). Il contenuto totale di fitocannabinoidi in questa *ssp.* può arrivare al 25%, nell'*hashish* (principale forma di consumo di queste piante) il rapporto THC:CBD varia dal 2:1 al 1:2. I terpeni più frequentemente trovati in questo pool sono: guaiolo, eudesmolo e bulnesolo.

- *Cannabis indica ssp. chinensis*

Raggruppa le varietà di canapa cinese, coltivate principalmente per la produzione di fibra e di seme. La canapa cinese è stata spesso associata alla canapa Europea ed erroneamente indicata col nome di *C. sativa*. I due biotipi mostrano infatti caratteristiche strutturali differenti e un diverso profilo di cannabinoidi (Hillig e Mahlberg, 2004). Recenti studi hanno dimostrato che *C. indica ssp. chinensis* è geneticamente più simile alle varietà da droga (*C. indica ssp. indica*, *C. indica ssp. afghanica*, *C. indica ssp. kafiristanica*) che alla canapa Europea (Hillig, 2005). La canapa cinese produce più cannabinoidi della canapa europea, il rapporto THC:CBD è intorno al 2,5:1, contro l'europea che ha 1:3. Un cannabinoide trovato solo in questa specie è il cannabigerolo monometilere.

Secondo lo stesso Hillig, ciò che realmente distingue una varietà dall'altra è la loro differente composizione chimica riconducibile principalmente alla diversa origine geografica e alle condizioni climatiche di crescita. L'analisi morfologica ed evolutiva delle diverse accessioni di *Cannabis* proposta da Hillig, non consente tuttavia di classificare in maniera certa la *Cannabis* in specie distinte (Tab. 2). Non si tratta di specie diverse dal punto di vista morfologico, ma di varietà chimiche a differente contenuto di cannabinoidi. Nessun carattere morfologico può essere considerato distintivo o associabile ad una particolare accessione o ipotetica specie, solo la larghezza della lamina fogliare e la data di fioritura sembrerebbero mostrare una certa correlazione con il contenuto del cannabinoide psicotropo THC (De Meijer et al., 1992).

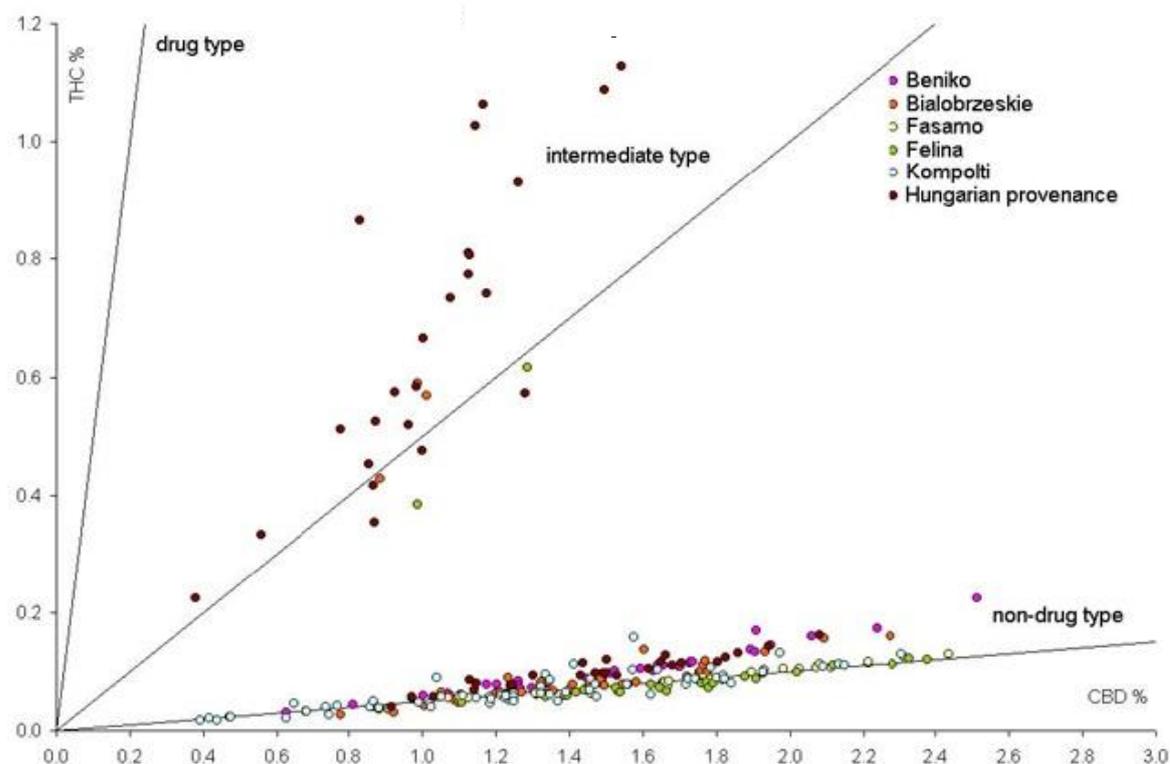
Recentemente per ovviare al problema della classificazione soprattutto tra canapa a scopo tessile o sementiero e canapa da droga, si ricorre ad una semplice classificazione basata sul contenuto qualitativo e quantitativo di cannabinoidi della pianta distinguendo i vari tipi di canapa in tre fenotipi principali. Fondamentalmente, in funzione del contenuto percentuale dei due principali cannabinoidi ( $\Delta^9$ -THC e CBD) una pianta può essere collocata all'interno di un grafico che ne definisce il chemotipo d'appartenenza (Fig. 9) (Small e Beckstead, 1975; De Meijer, 1992).

Negli ultimi anni, in base alle concentrazioni assolute di THC ( $\Delta^9$ -THC + THCA) e CBD (CBD + CBDA) ottenute mediante analisi GC o HPLC, le piante sono classificate in:

Chemotipo 1: Piante “da droga” (“*intoxicant*”), THC > 2 % e CBD < 0,5 %;

Chemotipo 2: Piante “intermedie” (“*semi-intoxicant*”), THC > 0,5 % e CBD > 0,5 %;

Chemotipo 3: Piante “non psicotrope” (“*non-intoxicant*”) THC < 0,3 % e CBD > 0,5 %.



**Fig. 9:** Differenza chemotipica di *C sativa*. in base al contenuto di THC e CBD; in legenda, vengono elencate alcune cultivar di canapa industriale coltivate in Europa.

I produttori hanno suddiviso una “tassonomia popolare” a ceppi con diverse proprietà medicinali e chimiche, ma la relazione dell'evoluzione tra le specie non è chiara. La *Cannabis* al giorno d'oggi sembra presentarsi in molte forme, in parte a causa dei millenni di coltivazione da parte dell'uomo. La pianta avendo un'impollinazione anemofila, è molto difficile controllarne la riproduzione; inoltre non esistono banche del seme opportunamente organizzate e le restrizioni legali impediscono un'adeguata collezione dei campioni (Grayson, 2015).

Classificazione tassonomica della <i>Cannabis</i> in ordine cronologico		
Anno	Autore	Classificazione proposta
1753	Linneo	Genere monotipico: <i>Cannabis sativa</i> L.
1785	(Lamarck and Poirer, 1785)	Descrizione della specie <i>Cannabis indica</i> (proveniente dall'India) come distinta della specie <i>Cannabis sativa</i> ; indicazione delle differenze nello sviluppo e nei caratteri morfologici della nuova specie, con particolare attenzione alle sue maggiori proprietà narcotiche (ritenute conseguenti a differenze chimiche)
1924	(Janischewsky, 1924)	Descrizione di una terza specie, la <i>Cannabis ruderalis</i> , distinta principalmente per i caratteri morfologici dell'achenio. Questa specie si estendeva dal nord della Russia europea fino all'ovest della Siberia e dell'Asia centrale
1929	Vavilov e Buckinich	Identificazione della <i>Cannabis indica</i> non solo come proveniente da popolazioni originarie dell'India, ma anche da popolazioni selvatiche del Pakistan e dell'Afghanistan e da numerosi ecotipi coltivati in Iran, Turchia, Siria e Nord Africa
1929	Vavilov e Buckinich	Nessun riconoscimento della specie <i>ruderalis</i> , limitando la caratterizzazione a due specie
1940	Serebriakova	Nessun riconoscimento della specie <i>ruderalis</i> , limitando la caratterizzazione a due specie
1950	Zhukovskii	Identificazione della <i>Cannabis indica</i> non solo come proveniente da popolazioni originarie dell'India, ma anche da popolazioni selvatiche del Pakistan e dell'Afghanistan e da numerosi ecotipi coltivati in Iran, Turchia, Siria e Nord Africa
1950	Zhukovskii	Nessun riconoscimento della specie <i>ruderalis</i> , limitando la caratterizzazione a due specie
1970	(Schultes R.E., 1970)	Classificazione della pianta come appartenente alla famiglia delle <i>Urticaceae</i>
1974	(Schultes et al., 1974)	Identificazione della <i>Cannabis indica</i> non solo come proveniente da popolazioni originarie dell'India, ma anche da popolazioni selvatiche del Pakistan e dell'Afghanistan e da numerosi ecotipi coltivati in Iran, Turchia, Siria e Nord Africa
1974	(Schultes et al., 1974)	Identificazione nel genere delle specie <i>C. sativa</i> , <i>C. indica</i> , e <i>C. ruderalis</i> , e individuazione in ogni specie di numerose varietà
1974	(Quimby, 1974)	Identificazione del genere <i>Cannabis</i> con la specie <i>Cannabis sativa</i> L., caratterizzata da un'elevatissima variabilità
1976	(Small et al., 1976)	Identificazione del genere <i>Cannabis</i> con la specie <i>Cannabis sativa</i> L., caratterizzata da un'elevatissima variabilità
1976	(Small and Cronquist, 1976)	Identificazione di quattro forme divise in due sottospecie ( <i>sativa</i> e <i>indica</i> , considerate rispettivamente non psicotropa e psicotropa), ciascuna contenente due livelli subvarietali
1988	(Grudzinskaya, 1988)	<i>Cannabis</i> e <i>Humulus</i> sono i due soli generi che fanno parte della famiglia delle <i>Cannabaceae</i>
1994	(Zohary and Hopf, 1994)	Utilizzano il termine <i>indica</i> per indicare razze psicotrope, relazionando tale caratteristica anche al loro portamento tendenzialmente più basso e con una maggiore attitudine alla ramificazione
1999	(Wilmot-Dear, 1999)	Il genere sembra essere meglio classificato come comprendente una specie e di questa effettua una distinzione in tre gruppi varietali: <i>sativa</i> , <i>indica</i> , spontanea
1999	(De Meijer, 1999)	Ha descritto quattro gruppi genici della specie <i>Cannabis sativa</i> L., a seguito della selezione naturale, artificiale e naturalizzazione, rapportandoli al loro profilo chemiotipico
2004	(Hillig and Mahlberg, 2004)	Analizzando le caratteristiche chimiche, genetiche e morfologiche di numerose accessioni, supportano nuovamente il concetto dell'esistenza di due specie presenti nel genere <i>Cannabis</i> , indicandole <i>Cannabis sativa</i> (2 biotipi) e <i>Cannabis indica</i> (4 biotipi)
2005	(Hillig, 2005)	Conferma l'esistenza di due specie principali, <i>C. sativa</i> e <i>C. indica</i> , e riconosce la probabile esistenza di un terzo pool genetico corrispondente a <i>C. ruderalis</i>

**Tab. 2:** Modificata da 'Cannabis. "Erba" medica' (Firenzuoli et al., 2015).

## 2.5 - Composizione chimica

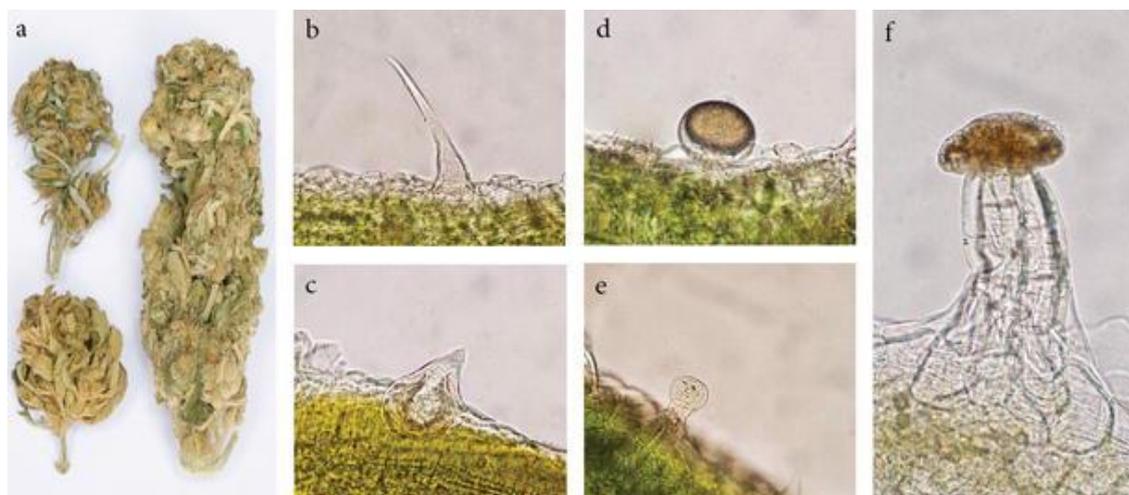
La *Cannabis sativa* contiene una significativa varietà di principi attivi. Sono stati identificati fino ad oggi, almeno 554 composti differenti (Aizpurua-Olaizola et al., 2016), tra questi 112 sono fitocannabinoidi, alcuni dei quali si trovano esclusivamente nella *Cannabis* (Pertwee, 2014; Ahmed et al., 2015), mentre i terpeni, con circa 140 membri, compongono la classe più abbondante. (ElSohly e Slade, 2005).

### 2.5.1 - Biosintesi

I numerosi metaboliti secondari della *Cannabis* (fitocannabinoidi, terpeni e fenoli), sono sintetizzati e accumulati prevalentemente nei tricomi ghiandolari della pianta, in maggior misura nelle fioriture femminili rispetto alle maschili.

Nella *Cannabis* sono evidenziabili due differenti strutture di tricomi ghiandolari: i tricomi ghiandolari pedunculati ed i tricomi ghiandolari sessili (Fig. 10) (Happyana et al., 2013).

La biosintesi e il bioaccumulo di dette sostanze avviene prevalentemente nei tricomi ghiandolari pedunculati, i quali iniziano a generarsi in numero sempre più abbondante sulle brattee del perigonio con l'inizio della fase della fioritura, mentre i tricomi ghiandolari sessili li troviamo in tutte le parti aeree della pianta sin dalle prime fasi di crescita.



**Fig. 10:** *Cannabis sativa* L. – infiorescenze e tricomi secchi di pistilli sulla loro superficie: (a) infiorescenze secche di pistilli (50% della taglia); (b) tricoma non cistolitico; (c) tricoma cistolitico; (d) tricoma capitato sessile; (e) semplice tricoma bulboso; (f) tricoma capitato pedunculato (400x).

Mahlberg e Kim (2004), esaminarono entrambi i tipi di ghiandole nella loro composizione in cannabinoidi, prelevandole singolarmente, ed ottennero che i tricomi peduncolati prelevati sulla venatura di una brattea hanno un contenuto maggiore in  $\Delta^9$ -THC di circa 20 volte dei tricomi sessili prelevati sulla venatura di una foglia; inoltre le concentrazioni dei fitocannabinoidi e dei terpeni, dipendono dal tipo di tessuto, età, varietà, condizioni di crescita e condizioni ambientali durante lo sviluppo, tempo di raccolta e stoccaggio della pianta (Sanchez e Verpoorte, 2008).

La biosintesi avviene mediante la condensazione di un composto terpenico (il geranil pirofosfato) con un composto fenolico (l'acido olivetolico) (Fig. 11), catalizzata dall'enzima geranil pirofosfato-olivetolo geranil-transferasi (GOT) a dare l'acido cannabigerolico (CBGA), che è il precursore di tutti i cannabinoidi (Fellermeier e Zenk, 1998).

Il CBGA è successivamente trasformato da diversi enzimi in oltre 100 differenti fitocannabinoidi (Fig. 12) (Mehmedic et al., 2010).

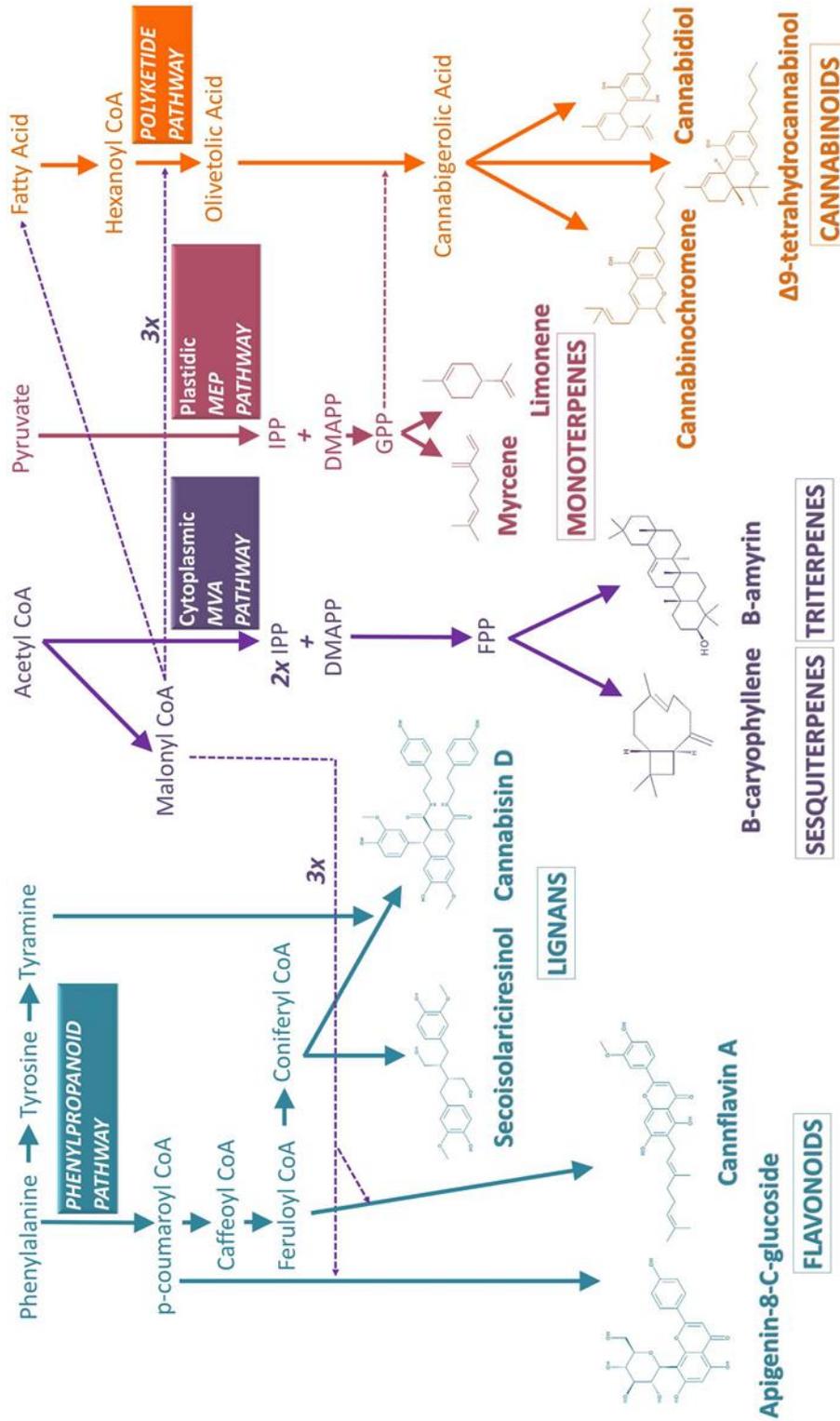
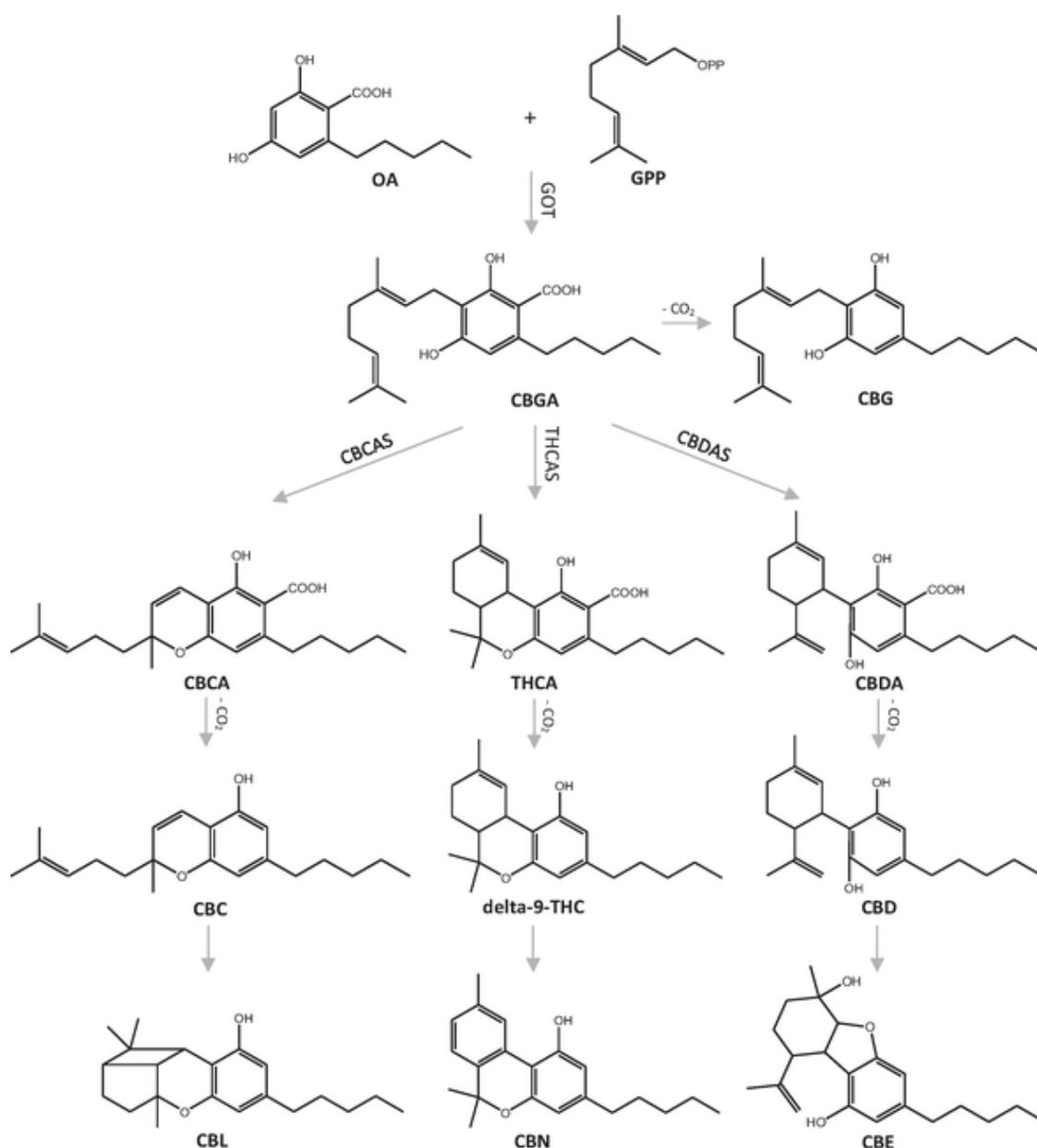


Fig. 11: Schema di biosintesi dei composti nella *Cannabis Sativa L.* (Sirikantaramas et al., 2004).



**Fig. 12:** Biosintesi e degradazione dei maggiori fitocannabinoidi.

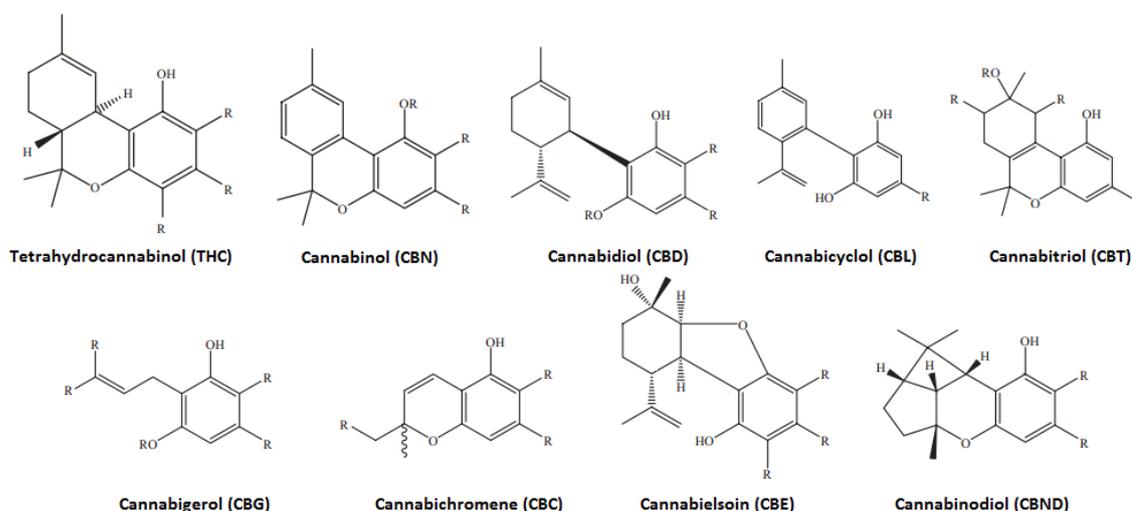
OA—*olivetolic acid*; GPP—*geranyl pyrophosphate*; GOT—*geranyl pyrophosphate—olivetolate geranyl transferase*; CBGA—*cannabigerolic acid*; CBG—*cannabigerol*; CBCAS—*cannabichromenic acid synthase*; THCAS—*tetrahydrocannabinolic acid synthase*; CBDAS—*cannabidiolic acid synthase*; CBCA—*cannabichromenic acid*; THCA—*tetrahydrocannabinolic acid*; CBDA—*cannabidiolic acid*; CBC—*cannabichromene*; delta-9-THC—*delta-9-tetrahydrocannabinol*; CBD—*cannabidiol*; CBL—*cannabicyclol*; CBN—*cannabinol*; CBE—*cannabielsoin*.

## 2.5.2 - Componenti cannabinoidi

I cannabinoidi o fitocannabinoidi sono stati definiti come un gruppo di composti tipici a 21 atomi di carbonio comprendenti anche i loro acidi carbossilici (22 atomi di carbonio), analoghi e prodotti di trasformazione (Gaoni e Mechoulam, 1964). Sono terpenoidi, la loro struttura chimica può essere descritta come quella di un terpene unito ad un resorcinolo a sostituzione alchilica, oppure come quella di un sistema ad anello benzopiranic. Sono apolari, risultano scarsamente solubili in acqua mentre sono altamente solubili nei grassi. Nel materiale vegetale fresco i cannabinoidi sono presenti più abbondantemente sotto forma del relativo acido carbossilico; l'essiccamento, l'invecchiamento e il riscaldamento li convertono in forme neutre.

I due più abbondanti cannabinoidi sono il  $\Delta^9$ -THC, chiamato anche “dronabinol”, principale costituente psicoattivo della *Cannabis* e il CBD (Pertwee, 2006).

Il contenuto di THC può variare in maniera significativa secondo la provenienza e il tipo di preparazione della pianta. Dopo il THC, altri cannabinoidi sono stati scoperti e isolati (Gaoni e Mechoulam, 1964). Composti di tipo cannabinoide interessanti sono il cannabigerolo (CBG), il cannabichromene (CBC) e il cannabinolo (CBN) (Fig. 13).



**Fig. 13:** Principali fitocannabinoidi di particolare interesse.

Fin ora sono stati identificati 112 fitocannabinoidi e sono stati suddivisi in 10 sottoclassi (Tab. 3) e per alcuni di questi sono riportate le principali caratteristiche farmacologiche (Brenneisen, 2007).

<b>Cannabigeroli</b>	<b><math>\Delta^9</math>-Tetraidrocannabinoli</b>
Acido cannabigerolico ( <b>CBGA</b> ) [antibiotico] Acido cannabigerolico monometilere ( <b>CBGAM</b> ) Cannabigerolo ( <b>CBG</b> ) [antibiotico, antifungino, anti-infiammatorio, analgesico] Cannabigerolo monometilere ( <b>CBGM</b> ) Acido cannabigerovarino ( <b>CBGVA</b> ) Cannabigerovarina ( <b>CBGV</b> )	Acido A $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolico ( <b>THCA-A</b> ) Acido B $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolico ( <b>THCA-B</b> ) $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( <b>THC</b> ) [euforizzante, analgesico, anti-infiammatorio, antiossidante, antiemetico] Acido-C4 $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolico ( <b>THCA-C4</b> ) $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo-C4 ( <b>THC-C4</b> ) Acido $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarino ( <b>THCVA</b> ) $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina ( <b>THCV</b> ) [analgesico, euforizzante] Acido $\Delta^9$ -tetraidrocannabiorcolico ( <b>THCA-C1</b> ) $\Delta^9$ -tetraidrocannabiorcolo ( <b>THC-C1</b> ) $\Delta^7$ -cis-iso-tetraidrocannabivarina
<b>Cannabicromeni</b>	
Acido cannabicromenico ( <b>CBCA</b> ) Cannabicromene ( <b>CBC</b> ) [anti-infiammatorio, antibiotico, antifungino, analgesico] Acido cannabicromevarino ( <b>CBCVA</b> ) Cannabicromevarina ( <b>CBCV</b> )	
<b>Cannabidioli</b>	<b><math>\Delta^8</math>-Tetraidrocannabinoli</b>
Acido cannabidiolico ( <b>CBDA</b> ) [antibiotico] Cannabidiolo ( <b>CBD</b> ) [ansiolitico, analgesico, anti-infiammatorio, antiossidante] Cannabidiolo monoetilere ( <b>CBDM</b> ) Cannabidiolo-C4 ( <b>CBD-C4</b> ) Acido cannabidivarino ( <b>CBDVA</b> ) Cannabidivarina ( <b>CBDV</b> ) Cannabidiorcolo ( <b>CBD-C1</b> )	Acido $\Delta^8$ -tetraidrocannabinolico ( <b>D8-THCA</b> ) $\Delta^8$ -tetraidrocannabinolo ( <b>D8-THC</b> ) [simile al THC, ma meno potente]
	<b>Cannabiciclioli</b>
	Acido cannabiciclico ( <b>CBLA</b> ) Cannabiciclo ( <b>CBL</b> ) Cannabiciclovarina ( <b>CBLV</b> )
	<b>Cannabitrioli</b>
<b>Cannabielsoini</b>	Cannabitriolo ( <b>CBT</b> ) 10-Etossi-9-idrossi- $\Delta$ -6a-tetraidrocannabinolo 8,9-Diidrossi- $\Delta$ -6a-tetraidrocannabinolo Cannabitriolvarina ( <b>CBTV</b> ) Etossi-cannabitriolvarina ( <b>CBTVE</b> )
<b>Cannabinoli e Cannabinodioli</b>	
Acido cannabinolico ( <b>CBNA</b> ) Cannabinolo ( <b>CBN</b> ) [sedativo, antibiotico, anticonvulsante, anti-infiammatorio] Cannabinolo metilere ( <b>CBNM</b> ) Cannabinolo-C4 ( <b>CBN-C4</b> ) Cannabivarina ( <b>CBV</b> ) Cannabinolo-C2 ( <b>CBN-C2</b> ) Cannabiorcolo ( <b>CBN-C1</b> ) Cannabinodiolo ( <b>CBND</b> ) Cannabinodivarina ( <b>CBVD</b> )	<b>Altri Cannabinoidi</b> Deidrocannabifurano ( <b>DCBF</b> ) Cannabifurano ( <b>CBF</b> ) Cannabicromanone ( <b>CBCN</b> ) Cannabicitrano ( <b>CBT</b> ) 10-Oxo- $\Delta$ -6a-tetraidrocannabinolo ( <b>OTHC</b> ) $\Delta^9$ -cis-tetraidrocannabinolo ( <b>cis-THC</b> ) 3,4,5,6-Tetraidro-7-idrossi- $\alpha$ - $\alpha$ -2-trimetil-9-n-propil-2,6-metano-2H-1-benzoxocin-5metanolo ( <b>OH-iso-HHCV</b> ) Cannabiripsolo ( <b>CBR</b> ) Triidrossi- $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( <b>triOH-THC</b> )

Tab. 3: Sottoclassi di cannabinodi contenuti nella *Cannabis sativa* L.

## 2.5.3 - Componenti non cannabinoidi

### Idrocarburi

Nell'olio essenziale di *Cannabis* sono stati identificati circa 50 idrocarburi. Essi appartengono alla serie dei normal-alcani con catene che vanno da C9 a C39, differentemente metilati, tra cui alcuni dimetilalcani (Hendriks et al., 1977). L'alcane maggiormente presente nell'olio essenziale, ottenuto per estrazione e distillazione in corrente di vapore, è il nonacosano (n-C29). Altri alcani abbondanti sono l'eptacosano, il 2,6-dimetiltetradecano, il pentacosano, l'exacosano, e l'entriacontano.

### Composti contenenti azoto

La *C. sativa* L. è una delle rare piante con proprietà psicotrope dove l'attività non è dovuta ad un alcaloide. I cannabinoidi sono infatti molecole che non contengono atomi di azoto come gli alcaloidi. Nella *Cannabis* comunque, esistono più di 70 composti azotati tra cui anche due alcaloidi, come la cannabisativina e anidrocannabisativina, quattro basi quaternarie come la colina, la trigonellina, la muscarina, alcune ammidi, lignanamidi e diverse ammine semplici tra cui la piperidina, la metilamina, l'etilamina e la pirrolidina, poliammine come le sperimidine (Klein FK et al., 1971; Mechoulam, 1989; Brenneisen, 2007).

### Carboidrati

Nella *Cannabis* sono stati identificati numerosi zuccheri comuni, inclusi zuccheri a basso peso molecolare, tra cui 13 monosaccaridi come il fruttosio, il galattosio, il glucosio, il mannitolo, l'inositolo, l'arabinosio, il mannosio, il ramnosio, la gliceraldeide, il diidrossiacetone, lo xilosio, lo xilulosio, il sorbosio, 2 disaccaridi quali saccarosio e il maltosio, 5 polisaccaridi come il raffiniosio, la cellulosa, l'emicellulosa, la pectina e lo xilano. (Brenneisen, 2007; Haustveit et al., 1973).

### Flavonoidi

I flavonoidi sono molecole policicliche e nella *Cannabis* ne sono stati identificati 23, la maggior parte comuni a diverse piante. Alcuni come la cannflavina A e cannflavina B (Barrett, 1985), sono tipici della sola *Cannabis*. Sono presenti nella forma libera come C-/O- e O-glicosidi del flavonolo e dei flavonoli agliconici come: l'apigenina, la luteolina, il kaempferolo, la quercetina, l'orientina, la vitexina (Grotenhermen e Russo, 2002).

### Acidi grassi

Sono stati isolati 33 acidi grassi dall'olio di semi di *Cannabis*. Si tratta principalmente di acidi grassi insaturi, tra cui l'acido linoleico, l' $\alpha$ -linoleico e l'acido oleico come i più comuni. Il rapporto tra acidi grassi saturi ed insaturi, varia in funzione del grado di maturazione del seme: più il seme è maturo, maggiore è la percentuale degli insaturi rispetto ai saturi. Non c'è differenza tra la composizione in acidi grassi nei semi di *Cannabis* psicoattiva e in quello proveniente da semi di *Cannabis* per produrre fibre (Ross et al., 1996).

### Fenoli non cannabinoidi

Sono stati identificati 34 fenoli non-cannabinoidi e tra questi sono noti il cannabispirano, l'isocannabispirano, il cannabistilbene-I, il cannabistilbene-II, il cannitrene-1 e il cannitrene-2.

### Alcoli, aldeidi, chetoni, acidi, esteri e lattoni semplici

Sono stati identificati 7 alcoli come il metanolo, l'etanolo, l'1-ottene-3-olo; 12 aldeidi come l'acetaldeide, l'isobutiraldeide, il pentanale; 13 chetoni come l'acetone, l'eptanone2, il 2-metil-2-eptene-6-one; 21 acidi come l'acido arabinico, l'acido azealico e l'acido gluconico.

### Altro

Nella pianta sono anche presenti 11 fitosteroli della tipologia del stigmasterolo,  $\beta$ -sitosterolo, campesterolo e ergosterolo. La vitamina K è l'unica vitamina identificata nella *Cannabis* (Brenneisen, 2007). Inoltre sono presenti elementi quali sodio, potassio, calcio, magnesio, ferro, rame, manganese, zinco e mercurio.

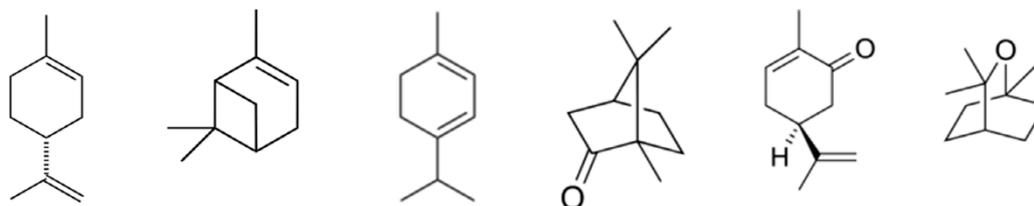
## **2.5.3.1 - Terpeni**

I terpeni sono responsabili dei profumi caratteristici della pianta di *Cannabis* e sono rappresentati da circa 120 differenti composti, i quali interagiscono tra loro in sinergia per creare odori e qualità tipicamente differenti (Rothschild et al., 2005; Brenneisen, 2007). Sono polimeri costituiti da multipli dell'unità isoprenica (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). L'unità di isoprene (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) forma monoterpenoidi (scheletro C<sub>10</sub>), sesquiterpenoidi (C<sub>15</sub>), diterpenoidi (C<sub>20</sub>), e triterpenoidi (C<sub>30</sub>). I terpenoidi possono essere idrocarburi aciclici, monociclici o policiclici, con modelli di sostituzione tra alcoli, eteri, aldeidi, chetoni ed esteri. L'insieme dei terpeni distillati costituisce l'olio essenziale che è il responsabile dell'aroma delle diverse varietà di *Cannabis*,

visto che i fitocannabinoidi sono inodori. Analizzando le maggiori differenze si evidenziano infatti le due principali famiglie di *Cannabis*: il ceppo *indica*, caratterizzato dall' elevata presenza di  $\beta$ -mircene,  $\alpha$ -pinene e limonene, e il ceppo *sativa*, con un profilo terpenico più complesso e variegato. La variabilità della composizione dei terpeni (Tab. 4) nella *Cannabis*, è un valido strumento per caratterizzare i differenti biotipi della pianta, infatti risulta essere oggetto di studi negli ultimi anni (Small, 2015).

Questi composti svolgono importanti funzioni all'interno della pianta essendo i precursori di molecole più complesse e fondamentali per il metabolismo, come ormoni, vitamine, pigmenti, steroidi, resine e soprattutto i cannabinoidi. Inoltre, caratterizzati da un odore forte e pungente, i terpeni svolgono un'azione protettiva contro l'attacco di predatori e patogeni come insetti, funghi e animali erbivori. Nelle infiorescenze predomina la presenza dei monoterpeni come il D-limonene, l' $\alpha$ -pinene, il  $\beta$ -mircene, il terpinolene, in grado di respingere gli attacchi parassitari di funghi e insetti (Hao et al., 2014; Khan et al., 2015). Nelle foglie abbondano invece i sesquiterpeni, che le rendono meno appetibili agli erbivori dato il forte sapore amaro. Inoltre possiedono una serie di proprietà farmacologiche e biologiche salutari per l'uomo essendo in grado di lavorare in sinergia con i cannabinoidi e apportare effetti benefici alla salute (Singh e Sharma, 2015). Sono ritenuti responsabili ad esempio di aumentare il flusso sanguigno, di migliorare l'attività corticale, di uccidere agenti patogeni respiratori, di avere effetti positivi nel trattamento del dolore, delle infiammazioni e delle infezioni fungine e batteriche. In linea generale, i terpeni sono ritenuti capaci di ridurre gli effetti ansiolitici indotti dal THC, rendendo evidenti le limitazioni e i rischi dei farmaci sintetici basati su principi attivi isolati. Di seguito vengono riportati i principali terpeni della *Cannabis* con le loro caratteristiche olfattive, biologiche e mediche (Fig. 14).

Monoterpeni



Limonene

$\alpha$ -pinene

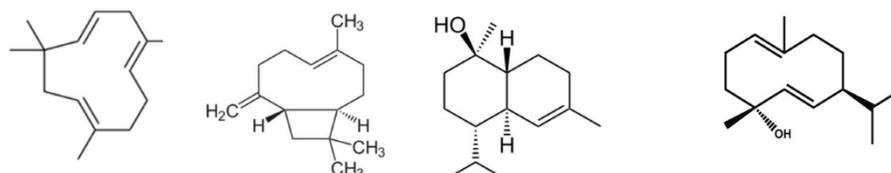
Terpinolene

(S)-Camphor

Carvone

Eucalyptol

Sesquiterpeni



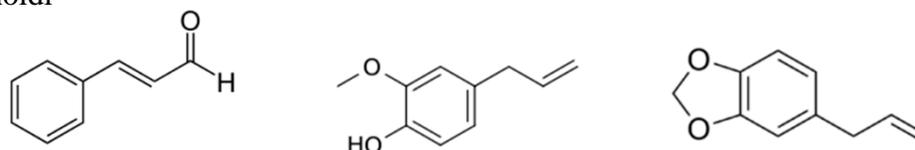
$\alpha$ -humulene

$\beta$ -caryophyllene

$\alpha$ -Cadinol

Germacrene D-4-ol

Fenilpropanoidi



Cinnamaldehyde

Eugenol

Safrole

Fig. 14: Strutture dei principali terpenoidi della *Cannabis*.

**Monoterpeni**

D-limonene

Tipico degli agrumi, è ritenuto essere un anti-cancerogeno, anti-batterico, anti-fungino e anti-depressivo (Komori et al., 1995). Penetrando rapidamente nelle membrane cellulari promuove l'assorbimento di altri terpeni. Può portare ad un aumento della pressione arteriosa e inoltre, essendo ritenuto disgustoso dai predatori, ricopre un effetto protettore per la pianta.

$\beta$ -mircene

Trai più tipici della *Cannabis*, viene trovato anche nei chiodi di garofano, verbana, citronella e mircia, da cui prende il nome. È uno dei più importanti composti chimici utilizzati nell'industria dei profumi e possiede diverse proprietà biologiche tra cui anti-microbico, anti-settico, analgesico, anti-ossidante, anti-cancerogeno, anti-depressivo, anti-infiammatorio e mio-rilassante (Cleemput et al., 2009). Influisce inoltre sulla permeabilità delle membrane cellulari, permettendo al THC di raggiungere più velocemente le cellule cerebrali.

### $\alpha$ -pinene

L'  $\alpha$ -pinene è tipico di aghi di pino e rosmarino, mentre, il  $\beta$ -pinene di prezzemolo, rosmarino e basilico. È il componente principale della trementina e si trova in molti oli essenziali. È ritenuto capace di aumentare la concentrazione e l'energia mentale oltre ad essere un antisettico. Può inoltre contrastare il deficit di memoria indotti dal THC, essendo un inibitore della acetilcolinesterasi, ovvero blocca la distruzione dell'acetilcolina che verrebbe utilizzata dal cervello per memorizzare, aiutando le capacità di memoria (Kennedy et al., 2011).

### Linalolo

Dal tipico odore floreale, possiede proprietà sedative e antiansiolitiche, analgesiche e anticonvulsive (Russo, 2011).

### $\delta$ -3-carene

Costituisce uno dei componenti della trementina, presenta un odore dolce e pungente di bosco. Trovato anche in rosmarino, pino e resina di cedro, viene utilizzato in aromaterapia per asciugare i liquidi in eccesso e contribuisce alla tipica secchezza di occhi e bocca sperimentata dai consumatori di *Cannabis*.

### Eucaliptolo

Trovato anche in rosmarino ed eucalipto, dal sapore piccante e dall'aroma che ricorda la canfora e la menta, viene utilizzato per aumentare la circolazione sanguigna, alleviare il dolore e come repellente per insetti.

## **Senquiterpeni**

### $\beta$ -cariofillene

Trovato anche nell'olio essenziale di pepe nero, chiodi di garofano e origano, è frequentemente il terpenoide predominante negli estratti di *Cannabis*, soprattutto se elaborati a caldo. Presenta un effetto gastro-protettivo consigliabile per il trattamento delle ulcere e sembra avere un ruolo importante nell'effetto terapeutico dell'Alzheimer (Cheng et al., 2014). Data la mancanza di psicoattività attribuita agli agonisti CB2, il  $\beta$ -cariofillene offre una grande promessa come composto terapeutico, sia per via sistemica che nelle applicazioni dermatologiche (Singh e Sharma, 2015).

### Humulene

Generalmente trovato anche nel cardamomo e nel luppolo, presenta caratteristiche speziate ed erbacee. Possiede attività anti-ossidante, anti-ematica, gastro-stimolante, sedativa e soprattutto una potente attività anti-infiammatoria.

### Terpenoidi

#### Terpineolo

Dall' odore floreale e fruttato, è un costituente minore di molti oli essenziali vegetali e viene utilizzato principalmente per profumare.

#### Borneolo

Trovato anche in cannella e assenzio, può essere facilmente convertito in mentolo. È considerato un sedativo calmante dalla medicina cinese ed è consigliato per la stanchezza, il recupero dalla malattia, lo stress e come repellente per insetti.

Elenco dei principali terpenoidi contenuti nella <i>Cannabis sativa</i> L.	
Mircene	<i>cis</i> -Sabinene idrato
Limonene	<i>cis</i> -Ocimene
Linalolo	$\beta$ -Eudesmolo
<i>trans</i> -Ocimene	$\beta$ -Selinene
$\beta$ -Pirene	$\alpha$ - <i>trans</i> -Bergamotene
$\alpha$ -Pirene	$\gamma$ -Eudesmolo
$\beta$ -Cariofillene	Borneolo
$\Delta^3$ -Carene	<i>cis</i> - $\beta$ -Farnesene
<i>trans</i> - $\gamma$ -Bisabolene	$\gamma$ -Curcumene
<i>trans</i> - $\alpha$ -Farnesene	<i>cis</i> - $\gamma$ -Bisabolene
$\beta$ -Fencolo	$\alpha$ -Tujene
$\beta$ -Fellandrene	epi- $\alpha$ -Bisabololo
$\alpha$ -Umulene	Ipsdienolo
Guaiolo	$\alpha$ -Ylangene
$\alpha$ -Guaiene	$\beta$ -Elemene
$\alpha$ -Eudesmolo	$\alpha$ - <i>cis</i> -Bergamotene
Terpineolo	$\gamma$ -Muurolene
$\alpha$ -Selinene	$\alpha$ -Cadinene
$\alpha$ -Terpineolo	$\alpha$ -Longipinene
Fencone	Cariofillene ossido
Camfene	

**Tab. 4:** Principali terpenoidi contenuti nella *Cannabis sativa* L.

## 2.6 - Aspetti normativi in Italia

La *Cannabis* è inserita nella Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana tra le sostanze stupefacenti e psicotrope. Il suo uso è disciplinato dalla legge n.162/1990, la cosiddetta legge Jervolino-Vassalli, poi inserita nel Testo Unico sulle sostanze stupefacenti con Decreto del Presidente della Repubblica n.309/1990.

Nonostante la coltivazione di canapa industriale non sia stata mai espressamente vietata in Italia, la mala interpretazione della legge ha portato le forze dell'ordine ad arrestare e sequestrare le coltivazioni di chi negli anni '70, '80 e '90, aveva provato a riprendere la coltivazione della canapa da fibra o da seme. Questa situazione di incertezza si è protratta fino al dicembre 1997, anno della circolare n.734 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, contenente disposizioni relative alla coltivazione della *Cannabis sativa*, integrata poi dalla circolare n.1 dell'8 maggio 2002. Il regolamento CE n.73/2009, ha stabilito l'obbligo di impiegare esclusivamente sementi certificate inserite nel catalogo comune delle varietà per uso agricolo, con un contenuto massimo di THC certificato dello 0,2%. Le sementi sono certificate a norma della direttiva 2002/57/CE. Inoltre è necessario rispettare alcune condizioni: una volta avvenuta la semina, va comunicato alla più vicina stazione delle Forze dell'Ordine; l'agricoltore deve inserire la coltivazione nella denuncia PAC (politica agricola comune) e deve avere stipulato contratto di coltivazione con un primo trasformatore autorizzato. Un'altra circolare del Ministero della Salute del 22-05-2009 consente la produzione e commercializzazione di prodotti a base di semi di canapa per l'utilizzo nei settori dell'alimentazione umana, anche se non risolve il problema dell'eventuale percentuale di THC contenuto negli alimenti. Per quanto riguarda la *Cannabis* "da droga" nel febbraio 2014, la Corte Costituzionale ha dichiarato la legge Fini-Giovanardi incostituzionale, portando ad una vera e propria incarcerazione di massa, con oltre 200mila ingressi in carcere per la violazione dell'articolo 73 del Dpr 309/90 (Spadaro, 2016).

Con l'abrogazione della Fini-Giovanardi, si è Öornati alla "Jervolino-Vassalli", la legge 162/1990, che pur considerandole entrambe illecite, distingueva tra droghe leggere pesanti e prevedeva sanzioni soprattutto di tipo amministrativo. Inoltre, il Dpr è stato modificato con il "decreto Lorenzin" (36/2014), riorganizzando le sostanze in quattro tabelle. La prima e la terza raggruppano le droghe pesanti (tra cui "i tetraidrocannabinoli, i loro analoghi, le sostanze ottenute per sintesi o semi-sintesi che siano ad essi riconducibili": tabella I); la seconda e la quarta, quelle leggere (tra cui "la *Cannabis indica* e i prodotti da essa ottenuti": tabella II). Con questa nuova legge, la detenzione o l'acquisto per uso personale, non hanno più rilevanza penale.

### 2.6.1 - Legislazione della *Cannabis* medica

Nel “bugiardino” pubblicato dal ministero della Salute sulla “Gazzetta Ufficiale” nel dicembre 2015, alcuni giorni dopo aver emanato il decreto 279/2015 sull'uso terapeutico della pianta, si legge: “*L'uso medico della Cannabis non può essere considerato una terapia propriamente detta, bensì un trattamento sintomatico di supporto ai trattamenti standard, quando questi ultimi non hanno prodotto gli effetti desiderati, o hanno provocato effetti secondari non tollerabili, o necessitano di incrementi posologici che potrebbero determinare la comparsa di effetti collaterali*”. Attualmente vi è un disegno di legge che affronta il discusso tema della legalizzazione della *Cannabis* e dei suoi derivati per gli usi farmaceutici e ludici. È supportato da un intergruppo parlamentare, il disegno di legge è stato approvato alla Camera dei Deputati nell'ottobre 2017, con 371 deputati che hanno votato a favore, 40 contro e 13 si sono astenuti. In questi mesi il disegno di legge, dovrà passare all'esame del Senato.

In Italia, l'impiego della *Cannabis* per finalità terapeutiche è stato ufficialmente legalizzato nel 2013. Ad oggi le regioni che hanno introdotto dei provvedimenti che riguardano l'erogazione di medicinali a base di *Cannabis* sono 12: Puglia, Toscana, Veneto, Liguria, Marche, Friuli Venezia Giulia, Abruzzo, Sicilia, Umbria, Basilicata, Emilia Romagna, Val d'Aosta. Le normative regionali convergono tutte nel disciplinare l'erogazione dei medicinali a carico dei propri Servizi Sanitari Regionali (SSR). Nelle altre regioni i farmaci a base di cannabinoidi sono posti a carico del paziente. La Toscana è stata la prima regione a fare da apripista e ad autorizzare l'utilizzo della *Cannabis* in medicina, con la legge n.18 dell'8 maggio del 2012.

Oltre alla Toscana, anche la regione Puglia è stata tra le prime in Italia ad avviare una fase di regolamentazione dell'uso terapeutico della *Cannabis* con la delibera della Giunta regionale n.308/2010, che stabilisce l'erogazione a carico del Servizio Sanitario Regionale. Secondo tale delibera, i derivati della *Cannabis* sotto forma di specialità medicinali o di preparati galenici magistrali, anche in associazione, possono essere prescritti dal medico specialista in neurologia, oncologia o preposto al trattamento della terapia del dolore cronico e acuto, in strutture sanitarie pubbliche, nei casi in cui altri farmaci disponibili si siano dimostrati inefficaci. Queste condizioni possono verificarsi nella spasticità secondaria in malattie neurologiche, nella nausea e vomito indotto da chemioterapia e radioterapia, nel dolore cronico neuropatico non rispondente alle terapia disponibili.

La prescrizione viene effettuata su Ricetta Non Ripetibile e ha la durata di trenta giorni. La delibera autorizza le farmacie ospedaliere delle Aziende Sanitarie a garantire la dispensazione

dei cannabinoidi a carico del SSR. Nel 2014 la regione Puglia ha approvato la legge regionale sulla *Cannabis terapeutica*, una legge che ha creato un dibattito nazionale seguita da una proposta di legge per permettere la coltivazione di *Cannabis* a scopo terapeutico e di ricerca scientifica. La legge apre anche alla possibilità di utilizzare a titolo sperimentale la *Cannabis* per casi di autismo, epilessia e demenza. Dalla prepotente urgenza delle persone malate, nasce nel 2013 a Racale (Le), l'Associazione LapianTiamo, il primo Cannabis Social Club d'Italia (CSC). L'Associazione LapianTiamo offre la massima attenzione ai malati di varie patologie che potranno trarre beneficio dall'utilizzo della canapa medicinale (Tab. 5).

CULTIVAR	THC	CBD	SPECIE	PROVENIENZA
Bedrocan	≅ 22 %	< 1 %	Sativa	Olanda
Bedrobinol	≅ 12 %	< 1 %	Sativa	Olanda
Bediol	≅ 6,5 %	≅ 8 %	Sativa	Olanda
Bedica	≅ 14 %	< 1 %	Indica	Olanda
Bedrolite	< 1 %	≅ 9 %	Sativa	Olanda
FM 2	5 – 8 %	7,5 – 12 %	Sativa	Italia
Pedanos	≅ 22 %	< 1 %	Sativa	Canada
Pedanos	≅ 8 %	≅ 8 %	Indica	Canada
Pedanos	< 1 %	≅ 9 %	Ibrido	Canada

**Tab. 5:** Tutte le cultivar di *Cannabis medica* in Italia, a partire dal Bedrocan fino a Pedanos (Gennaio 2018).

## 2.6.2 - Legislazione della canapa industriale

La normativa italiana sulla canapa industriale ha finalmente avuto riconoscimento con l'approvazione della legge sulla canapa del 2 dicembre 2016, n.242, pubblicata sulla GU n.304 del 30-12-2016.

La legge era stata proposta nel 2013 e dopo l'approvazione è passata in Senato dove è stata approvata il 14 Gennaio 2017, introducendo delle novità che sono principalmente 3:

- non è più necessaria alcuna autorizzazione per la semina di varietà di canapa certificate con contenuto di THC al massimo dello 0,2% (non è più necessaria la comunicazione alla più vicina stazione forze dell'ordine). Gli unici obblighi per il coltivatore sono quello di conservare i cartelli della semente a dodici mesi e di conservare le fatture di acquisto della semente per il periodo previsto dalla normativa vigente;

- la percentuale di THC nelle piante analizzate potrà oscillare dallo 0,2% al 0,6%, senza comportare alcun problema per l'agricoltore. Nel caso in cui la percentuale di THC dovesse superare lo 0,6%, l'autorità giudiziaria può disporre il sequestro o la distruzione della coltivazione;

- sono previsti finanziamenti nell'ordine massimo di 700mila euro l'anno "per favorire il miglioramento delle condizioni di produzione e trasformazione nel settore delle canapa".

Si apre così un quadro legislativo che può valorizzare le caratteristiche distintive della canapa in Italia, dove si sta verificando una rapida diffusione della coltivazione dalla Puglia al Piemonte, dando una spinta definitiva ad una moderna filiera della canapa italiana, sfruttando le potenzialità di questa pianta nei più disperati settori di utilizzo.

## 2.7 - Applicazioni terapeutiche della *Cannabis medica*

Nonostante l'uso millenario della pianta e nonostante l'identificazione del  $\Delta^9$ -THC nel 1964, bisogna aspettare gli anni Novanta per comprendere il meccanismo d'azione dei cannabinoidi. Il modo attraverso cui questi composti producono i loro effetti, è stato determinato dalla scoperta dei recettori specifici per i cannabinoidi denominati CB1 (recettore cannabinoide di tipo 1) e CB2 (recettore cannabinoide di tipo 2) (Gaoni e Mechoulam, 1964; Pacher et al., 2006).

Sebbene i CB2 mostrino tipicamente una distribuzione periferica (milza, timo, tonsille e cellule del sistema immunitario, quali linfociti B e NK) e non siano responsabili degli effetti psicomimetici, tipici dei CB1, ne è stata recentemente dimostrata una localizzazione anche a livello del SNC (microglia e tronco cerebrale). I CB1 sono stati identificati nel tessuto vascolare, sistema immunitario, cuore e testicoli (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Van Sickle et al., 2005). Sono numerosi i composti cannabinoidi che interagiscono con i recettori CB. Uno dei cannabinoidi più importanti è il composto non psicoattivo cannabidiolo (CBD). Non è ben chiaro come il CBD eserciti la sua attività ma, poiché diversi studi hanno dimostrato che diminuisce l'attività psicotropa del THC, è stato ipotizzato che possa agire come agonista inverso (Pertwee et al., 2010), assumendo anche un ruolo protettivo (Iseger e Bossong, 2015). I cannabinoidi presentano svariate attività giustificate dalla loro interazione con i recettori dei cannabinoidi: analgesica, mio-rilassante, anti-immunogena, anti-infiammatoria, anti-tumorale, dalla stimolazione dell'appetito fino al miglioramento dell'umore (Grotenhermen, 2005).

La ricerca scientifica nel settore terapeutico della *Cannabis*, ha visto negli anni un significativo potenziamento, soprattutto nel contesto internazionale, in merito ai suoi effetti sullo stato di salute dei pazienti sottoposti a trattamenti terapeutici. Il risultato della combinazione di tutte le sostanze contenute nella *Cannabis* è detto "effetto entourage" ed è oggetto di studio negli ultimissimi anni. Questo meccanismo descrive il processo per il quale i

cannabinoidi lavorano insieme sinergicamente, e influenzano il corpo in un modo simile all'azione del suo sistema endocannabinoide. I ricercatori sostengono che estratti contenenti un ampio spettro di sostanze agiscano meglio come agenti terapeutici, piuttosto che i singoli estratti di cannabinoidi (Liu, 2013). Uno studio ad esempio evidenzia come un estratto di *Cannabis* con il 20% di THC abbia mostrato un'attività più marcata come antispastico rispetto al THC puro (Williamson, 2001).

Di seguito vengono proposti in sintesi, le evidenze più consistenti sull'utilizzo dei cannabinoidi e dei suoi derivati.

#### Attività anti-ossidante

Le specie reattive dell'ossigeno sono molecole altamente reattive in grado di arrecare danno agli organismi viventi: perossido di idrogeno ( $H^2O^2$ ), acido ipocloroso (HClO) e radicali liberi come il radicale idrossile ( $OH\bullet$ ) e l'anione superossido ( $O_2^-$ ) sono in grado di causare danni a DNA, proteine, lipidi etc. Il CBD svolge un'azione anti-ossidante neuroprotettiva, mostrando un'azione più potente dell'ascorbato e dell' $\alpha$ -tocoferolo (Hampson et al., 1998). I peptidi generati dalla digestione di semi di canapa idrolizzati, successivamente purificati e separati, in otto frazioni peptidiche con HPLC in fase inversa, esibiscono elevata capacità di neutralizzare le specie radicaliche dell'ossigeno ed ottime proprietà *scavenger* verso la 2,2-difenil-1picrilidrazile, anione superossido e radicale idrossilico (Girgih et al., 2013).

#### Attività anti-tumorale

Recenti studi hanno riesaminato la possibilità di utilizzare i cannabinoidi come veri e propri farmaci anti-tumorali. Secondo lo studio pubblicato su *Anticancer Research* (Scott et al., 2013), “i cannabinoidi sono in grado di interferire con lo sviluppo delle cellule cancerose rallentandone lo sviluppo”. Sono almeno sei i cannabinoidi non-psicoattivi che hanno mostrato di inibire la crescita delle cellule leucemiche in tutte le fasi del ciclo cellulare [tra i quali il CBD, CBG e la cannabigerovarina (CBGV)]. È interessante notare che il team ha osservato effetti ancora maggiori quando diversi cannabinoidi sono stati somministrati insieme (Scott et al., 2014). I cannabinoidi hanno mostrato anche la capacità di ridurre la crescita dei tumori come il glioma (Solinas et al., 2013), il cancro al seno (Behrend, 2013), alla prostata (Orellana-Serradell et al., 2015), al colon (Borrelli et al., 2014) e alla pelle (Perez-Gómez et al., 2013; Velasco et al., 2016).

### Attività anti-infiammatoria

In contrasto con il  $\Delta^9$ -THC, il CBD si lega in maniera molto più blanda ai recettori CB1 e CB2, possiede una spiccata attività anti-infiammatoria rispetto al  $\Delta^9$ -THC, con un elevato potenziale in ambito terapeutico (Burstein, 2015). È stato studiato un CBD-derivato, HU-444, che non può essere convertito tramite ciclizzazione in  $\Delta^9$ -THC, possiede attività anti-infiammatoria (riduce la presenza degli intermedi reattivi dell'ossigeno e inibisce la produzione di TNF- $\alpha$  da parte dei macrofagi) (Haj et al., 2015). Anche CBN, CBG, CBC e CBDA, sono inibitori delle prostaglandine più potenti del  $\Delta^9$ -THC (Burstein et al., 1973). L'attività anti-infiammatoria dei terpenoidi della canapa è conosciuta da tempo: eugenolo, carvacrolo e *p*-vinilfenolo sorpassano i cannabinoidi nella inibizione delle prostaglandine (Burstein et al., 1975). Il già citato  $\beta$ -mircene, il monoterpene più abbondante nella canapa, possiede attività anti-infiammatoria. Stesso discorso vale per il  $\beta$ -cariofillene, il più comune sesquiterpene nella pianta, che inoltre ha azione citoprotettiva (sulla mucosa gastrica) e anti-malarica (McPartland e Russo, 2001).

### Attività immuno-soppressoria

I cannabinoidi presenti nella *Cannabis* mediano i loro effetti fisiologici attivando i sopracitati CB1 e CB2 (De Petrocellis et al., 2011). I cannabinoidi hanno dimostrato di essere potenti agenti immuno-soppressori e anti-infiammatori (Di Marzo e Piscitelli, 2015). Il meccanismo con il quale essi mediano l'immuno-soppressione sta per essere compreso soltanto ora e può essere caratterizzato in quattro step: apoptosi, inibizione della proliferazione cellulare, soppressione della produzione di citochine e chemiochine ed induzione delle cellule T regolatrici.

### Rilassamento muscolare

I tremori nascono da un ciclo involontario di contrazioni e rilassamenti muscolari: sono un sintomo invalidante molto comune in svariate patologie motorie-associate, come il Parkinson, sclerosi multipla, malattia di Huntington e forme di atassia (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009). È stato osservato un miglioramento dei sintomi nei fumatori di canapa (Wright et al., 2013) e vista l'alta densità di recettori dei cannabinoidi nell'area cerebrale responsabile delle funzioni motorie, molti ricercatori si sono domandati se i composti cannabinoidi-associati potessero essere usati in terapia per alleviare tremori associati a disturbi del sistema nervoso centrale (Arjmand et al., 2015).

### Attività anti-epilettica

Utilizzando modelli di ratto, i ricercatori hanno scoperto che CBDV e CBD potrebbero essere efficaci non solo per le crisi epilettiche, ma anche nel trattare specifici geni correlati (Amada et al., 2013). In un recente studio, il 90% dei bambini affetti da epilessia resistente ai farmaci, ai quali è stata somministrata *Cannabis* ad alto valore di CBD (rapporto CBD:THC 20:1), ha registrato una notevole diminuzione di frequenza ed intensità delle crisi epilettiche (Tzadok et al., 2016).

### Ruolo ansiolitico

In alcune persone porta a liberarsi da ansie, generando fiducia e buon umore, in altre può provocare reazioni di tipo opposto, da lievi preoccupazioni a stati di negatività e agitazione. Molti dei recettori a cui si legano i cannabinoidi si concentrano nell'amigdala, la parte del cervello che gestisce le emozioni ed in particolar modo le nostre reazioni a paura e stress (Katona e Patel, 2014). Quando il THC agisce su questa parte del cervello ne modifica le comunicazioni, e può farlo in modo positivo o negativo. Gli effetti variano sia da persona a persona, che in differenti situazioni e stati d'animo.

Talvolta il THC può sovraccitare i percorsi neurali portando stati ansiogeni, altre può invece influire positivamente, producendo benessere (Ramikie et al., 2014). Più di recente, studi confermano che bassi dosaggi di THC riducono l'ansia, alti dosaggi la incrementano (Mechoulam e Parker, 2013). Resta da ricordare che il cannabinoide più efficiente per l'ansia e patologie associate, come la sindrome da disturbo post-traumatico o il disturbo ossessivo-compulsivo, è il CBD (Bergamaschi et al., 2011; Crippa et al., 2011). Anche i terpeni lasciano molta speranza, ne è un esempio il  $\beta$ -cariofillene, un agonista del recettore CB2 che produce molteplici cambiamenti comportamentali rilevanti per l'ansia e la depressione nei topi (Bahi et al., 2014).

## 2.8 - Utilizzi e scopi della canapa industriale

Come già evidenziato, la canapa, che risponde positivamente alle esigenze ambientali ed agronomiche, potrebbe costituire la base per soluzioni innovative. Dal punto di vista agronomico, è la tipica coltura “rinettante”, poiché risulta maggiormente competitiva rispetto alla maggior parte degli infestanti, grazie alla sua velocità d'accrescimento e alla capacità di selezionare la radiazione luminosa. Viene considerata “multiuso” già per la tradizionale suddivisione della produzione tra stelo, da cui si ricava la fibra e il canapulo, e il seme, da cui poter ricavare l'olio e la farina (Fig. 15).

Negli ultimi anni, invece, va via sempre più crescendo l'utilizzo e la vendita delle infiorescenze, fino al sopraggiunto boom della cosiddetta “*cannabis light*”, che può diventare una nuova risorsa per i coltivatori italiani di canapa, soprattutto in seguito all'entrata in vigore nel gennaio 2017 del Ddl n.242, nel quale le infiorescenze non vengono contemplate dal punto di vista normativo, ma tuttavia possono essere classificate e vendute per uso tecnico.

Le componenti della pianta, inoltre, possono essere destinate per svariati utilizzi: oltre a quelle tradizionali, si vanno ampliando sempre di più destinazioni nuove e innovative per le quali è possibile prevedere una forte espansione di mercato. Al fine di evidenziare l'importanza della canapa ed il forte interesse verso il ritorno di questa coltivazione, verranno di seguito elencati gli utilizzi ed i possibili prodotti che se ne possono ricavare (Guerriero et al., 2014; 2015; 2016).

### Fitorimedia

La sua coltura potrebbe rivelarsi vantaggiosa in quei terreni ritirati dalla produzione, in zone deboli o per la bonifica di terreni contaminati da metalli pesanti attraverso un processo denominato “phytoremediation”. Si considera adatta a questo scopo proprio per la sua capacità chelante nei confronti di contaminanti come arsenico e rame, oltre che di solventi e pesticidi.

### Tessile

La fibra lunga di qualità è destinata all'industria di tipo liniero. Le fibre di canapa sono considerate maggiormente produttive poiché risultano più robuste (Guerriero et al., 2013) e durature rispetto al cotone. Esso, infatti, rappresenta una delle coltivazioni per uso tessile ad elevato impatto ambientale, sia per l'elevato ricorso a pesticidi, che non sono invece necessari nella coltivazione di canapa, sia per quanto concerne l'impiego di risorse idriche. Dalla

canapa si possono ottenere dei filati resistenti utilizzabili in tessuti destinati alla produzione di manufatti tessili (Cassano et al., 2013).

### Cartaceo

L'utilizzo della canapa nella produzione della carta potrebbe risolvere gran parte dei problemi ambientali: molte foreste primarie, nel mondo, sono state distrutte per produrre carta, con notevoli costi ambientali. Oggi il 93% della carta proviene dal legno e solo il 29% viene riciclata. Per la fabbricazione si utilizza sia la parte fibrosa, che produce carta di alta qualità, sottile e resistente, sia quella legnosa (canapulo) (Guerriero et al., 2013), per cartoni e carta da giornali. La carta di canapa presenta caratteristiche quali la forza, l'estendibilità, l'opacità e la resistenza sia a strappi e lacerazioni, sia all'umidità. Inoltre, a differenza della carta da albero, può essere riciclata sette volte, mantenendo sempre lo stesso spessore.

### Alimentare

La canapa può essere coltivata anche per uso alimentare. Si possono ricavare i semi, ricchi di proteine ad elevato valore biologico, ed un olio ricco di grassi insaturi ed ideale per prevenire le malattie del sistema cardiocircolatorio.

### Industriale

L'olio presenta eccezionali proprietà, è possibile produrre saponi, cere, cosmetici, detersivi biodegradabili, inoltre le vernici fabbricate con questa materia prima, risultano di qualità superiore rispetto a quelle prodotte con i derivati del petrolio e non sono inquinanti. Per quanto concerne la produzione di materie plastiche, la canapa può rappresentare un'alternativa concreta al petrolio grazie alla cellulosa contenuta nella pianta, che attraverso un processo di polimerizzazione, permette infatti di ottenere materiali plastici degradabili (Marsh, 2003) utilizzabili nella produzione di imballaggi e di materiali da impiegare con una funzione isolante.

### Risparmio energetico

La canapa, per la sua alta resa vegetale, potrebbe essere una fonte di biomassa da utilizzare in alternativa al carbone e altri combustibili fossili. Alcune aziende sostengono che il pellet di canapa risulta quel combustibile che, grazie all'etanolo di canapa, brucia in modo più pulito. Ciò potrebbe fornire diverse soluzioni energetiche: l'utilizzo di questo biocarburante, al contrario degli idrocarburi fossili, non comporta un incremento di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera poiché,

l'emissione di anidride carbonica durante la combustione, sarebbe controbilanciata da quel quantitativo di CO<sub>2</sub> che la canapa stessa è in grado di assorbire durante la sua crescita.

### Bioarchitettura

Per quanto riguarda la bioedilizia, utilizzando alcune parti della pianta (quali il canapulo, le fibre corte e altri materiali di scarto) si possono produrre feltri, materassi, pannelli isolanti, malte e mattoni presentando proprietà fonoassorbenti e isolanti e, rispetto alla plastica e alla lana di vetro, hanno una maggiore resistenza all'impatto, una maggiore leggerezza e una minore suscettibilità alla deformazione sotto l'effetto del calore. L'unione di canapa e calce, inoltre, rappresenta il mix perfetto per produrre mattoni da impiegare nell'edilizia ecosostenibile attraverso la combinazione del canapulo con un legante a base di calce idraulica e acqua.

# L'IMPIEGO DEL SEMILAVORATO

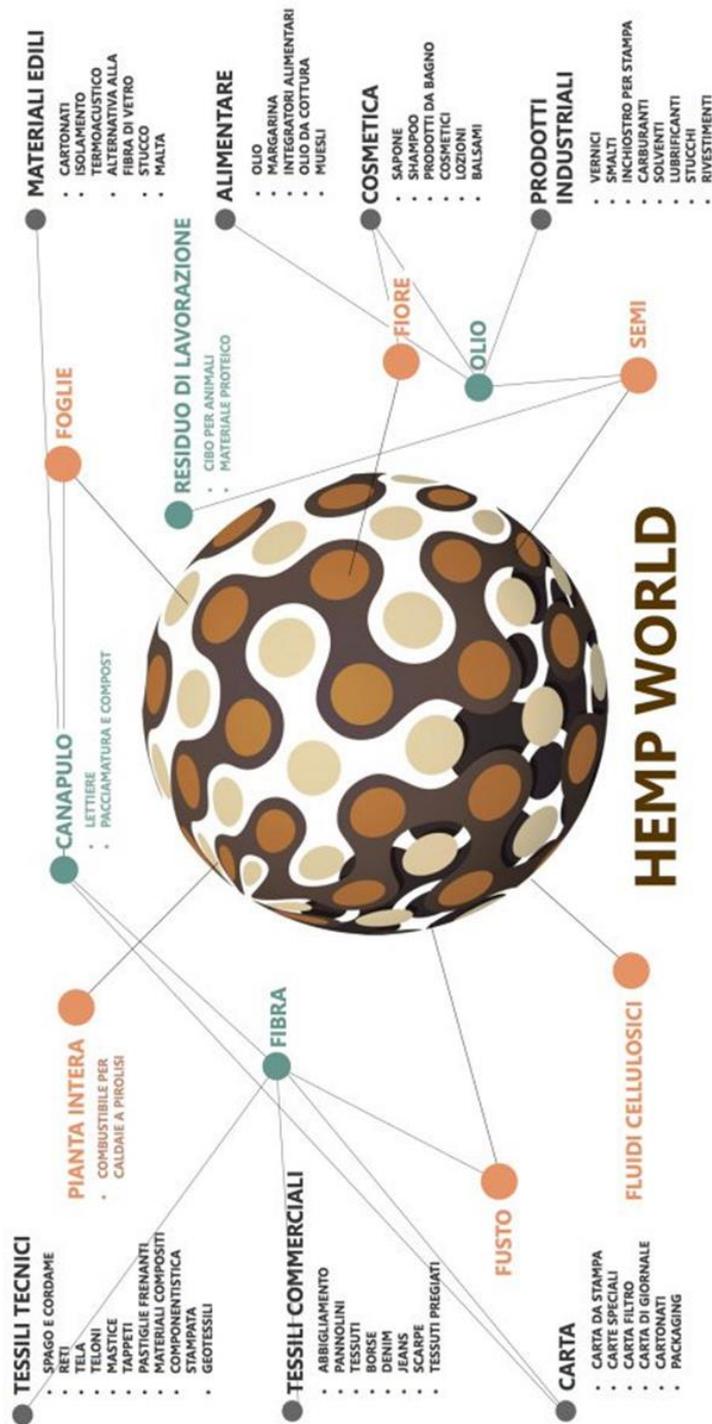


Fig. 15: Schema riassuntivo dell'uso del semilavorato della canapa industriale.

### **3. *SCOPO DEL LAVORO***

Negli ultimi anni, stiamo assistendo a un crescente interesse verso i prodotti a base di canapa e i principi attivi in essa contenuti. Particolarmente attraenti per alcuni mercati sono le infiorescenze da cui è possibile estrarre una vasta gamma di molecole bioattive e aromi con potenziali applicazioni in campo farmaceutico, cosmeceutico e alimentare.

La nuova legge sulla coltivazione della canapa industriale, in vigore già da un anno, pur regolando diversi aspetti della filiera produttiva, non menziona le infiorescenze, dunque non ne vieta esplicitamente la commercializzazione, spalancando di fatto un business rigoglioso. In tale contesto, il lavoro di questa tesi sperimentale, svolto presso i laboratori di Botanica Generale e di Chimica Organica dell'Università del Salento, ha posto come principale obiettivo l'identificazione e caratterizzazione qualitativa dei terpenofenoli, principalmente terpenoidi e fitocannabinoidi, presenti nelle infiorescenze essiccate di quattro cultivar di *C. sativa* L. coltivate in Salento.

In particolare, le infiorescenze sono state sottoposte ad estrazione sia con tecniche convenzionali, utilizzando una miscela di solventi organici in un apparato di Soxhlet, che attraverso l'uso di SC-CO<sub>2</sub>. L'identificazione dei terpenofenoli presenti negli estratti è stata effettuata mediante GC-MS confrontando i profili di frammentazione di ciascun composto con quelli presenti nella libreria *Nist*. Inoltre un confronto tra le diverse cultivar è stato condotto attraverso una valutazione semi-quantitativa delle diverse molecole identificate sulla base delle aree sottese a ciascun picco ottenuto attraverso separazione e analisi GC-FID. Infine, visto il forte interesse per i fitocannabinoidi non psicotropi (CBD e CBG), le forme acide e neutre di tali composti sono state dosate quantitativamente attraverso analisi HPLC-UV/DAD. Tale analisi ha permesso inoltre di valutare quantitativamente l'eventuale presenza di THC il cui limite negli estratti è rigorosamente fissato per legge è di 0,2%.

#### **4. MATERIALI E METODI**

## 4.1 - Prodotti chimici

I solventi utilizzati per le estrazioni e le analisi (etere di petrolio, etere etilico, acetato di etile, metanolo) di grado RPE sono stati acquistati dalla ditta J.T.Baker® Chemicals (Center Valley, PA, USA);

Il gel di silice (230-400 Mesh ASTM) utilizzato per l'allontanamento delle clorofille è stato acquistato dalla ditta Merck® (Darmstadt, Germania);

Le soluzioni di THCA, THC, CBDA, CBD, CBG (1 mg/ml in metanolo) utilizzate come standard analitici sono state acquistate dalla ditta Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germania);

Per le estrazioni con SC-CO<sub>2</sub> è stata utilizzata CO<sub>2</sub> E 250 per alimenti Alipack 200 acquistata dalla ditta SAPIO (Monza, Italia).

## 4.2 - Materiale Vegetale

### 4.2.1 - Semina, campionamento ed essiccamento

Per l'attività sperimentale sono state utilizzate le infiorescenze essiccate di quattro cultivar di *Cannabis sativa* L., C.S. Carmagnola, Fedora 17, Futura 75, Santhica 27, fornite dall'Associazione *Eco Facto* di Paolo Vitali (Gagliano del Capo – Lecce), le cui principali caratteristiche sono schematizzate in tabella 6.

Caratteristiche	Cultivar			
	C.S. Carmagnola	Fedora 17	Futura 75	Santhica 27
Tipologia	Dioica	Monoica	Monoica	Monoica
Adattamento climatico	Mediterraneo	Atlantico	Atlantico	Atlantico
Ciclo vegetativo (giorni)	160 - 180	110 - 125	135 -145	125 - 135
Altezza a maturità (cm)	250 - 600	200 - 250	250 - 350	200 - 250
Produzione di semi (t/ha)	0,45	> 1,2	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0
Contenuto di olio nel seme (%)	-	30 - 32	28 - 30	< 26
Dimensione del seme (g)	-	16 -18	16 - 18	16 - 18
Rendimento della biomassa secca (t/ha)	13	8 - 10	10 - 12	8 - 10
Contenuto di fibre (%)	30 - 35	30 - 35	30 - 35	> 35
Contenuto in CBD (%)	1,5 - 2	1,5 - 2	1,5 - 2	1 - 1,5
Contenuto in THC (%)	< 0,2	< 0,06	< 0,12	< 0,02

**Tab. 6:** Principali caratteristiche delle cultivar di canapa industriale studiate.

La semina, direttamente in pieno campo, ha avuto luogo nella prima decade di Marzo 2017 in provincia di Lecce. In particolare la cultivar C.S. Carmagnola è stata coltivata in territorio di Salve (Fig. 16), mentre Fedora 17, Futura 75 e Santhica 27 in territorio di Tricase.



**Fig. 16:** Fase di emergenza (A) e successiva fase di vegetazione in C.S Carmagnola (B).

I semi sono stati distribuiti con una seminatrice meccanica con una densità di 15 kg/ha. Le piante non sono state sottoposte a trattamenti irrigui o anti-parassitari. Non appena giunte a maturità (Fig. 17) tra il 20 Giugno e il 10 Luglio 2017, le infiorescenze sono state raccolte tagliando manualmente la porzione apicale della pianta e successivamente selezionate accuratamente ripulendole da residui del fusto e dalle foglie più grandi.



**Fig. 17:** Fase di fioritura (A) e maturazione semi (B) in Futura 75.

Le infiorescenze sono state essiccate (Fig. 18) disponendole su appositi scaffali reticolati in ambiente buio, ben ventilato e termostato a 25°C per circa una settimana.



**Fig. 18:** Infiorescenze essiccate della cultivar C.S. Carmagnola.

#### 4.2.2 - Preparazione del materiale vegetale

Dalle infiorescenze essiccate delle quattro cultivar, sono stati accuratamente separati semi, tegumenti, rametti ed eventuali residui del fusto (Fig. 19).

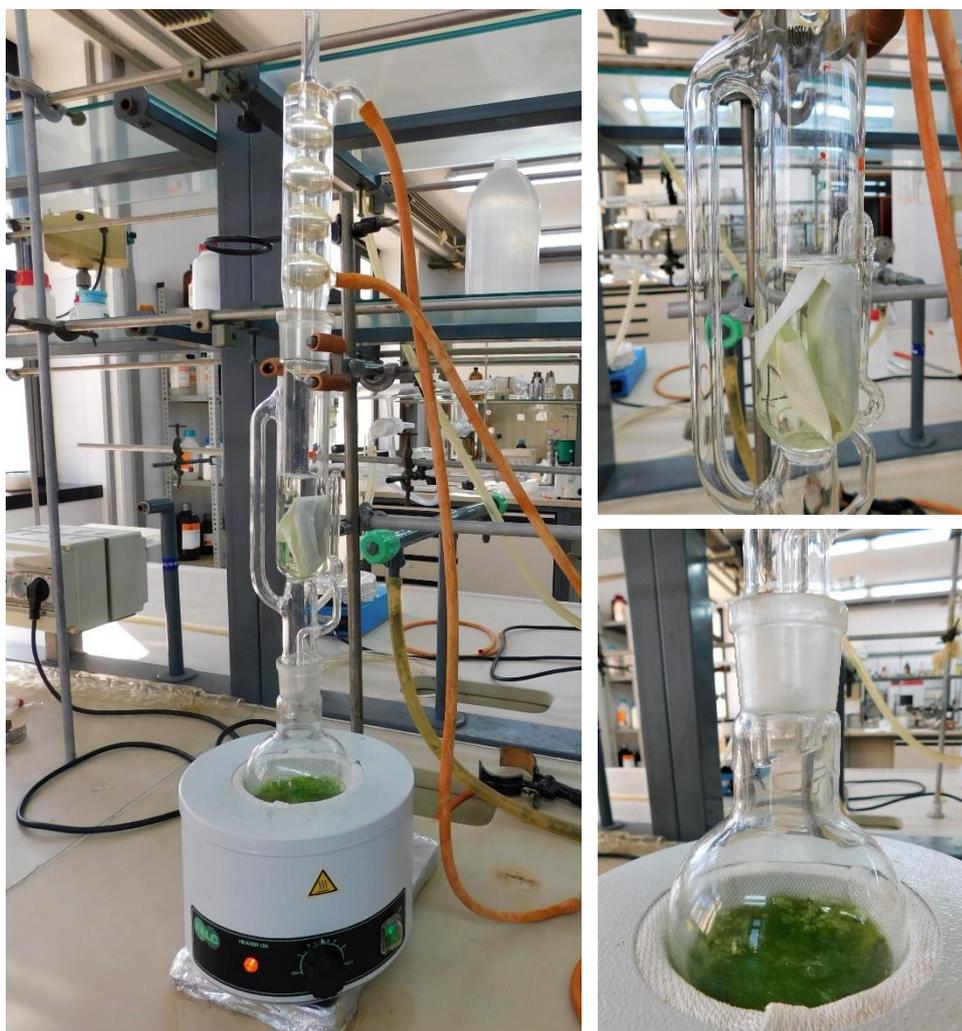


**Fig. 19:** Materiale vegetale di partenza e frazioni ottenute dopo il lavoro di pulitura del campione: si distinguono semi (A), tegumenti (B), rametti (C) e infiorescenze (D).

Le infiorescenze così ripulite sono state macinate in un mulino centrifugo (ZM 200 RETSCH, Haan, Germania) ad una granulometria di 1 mm. Il materiale macinato è stato sottoposto ad estrazione convenzionale attraverso un apparato Soxhlet o a estrazione con SC-CO<sub>2</sub>.

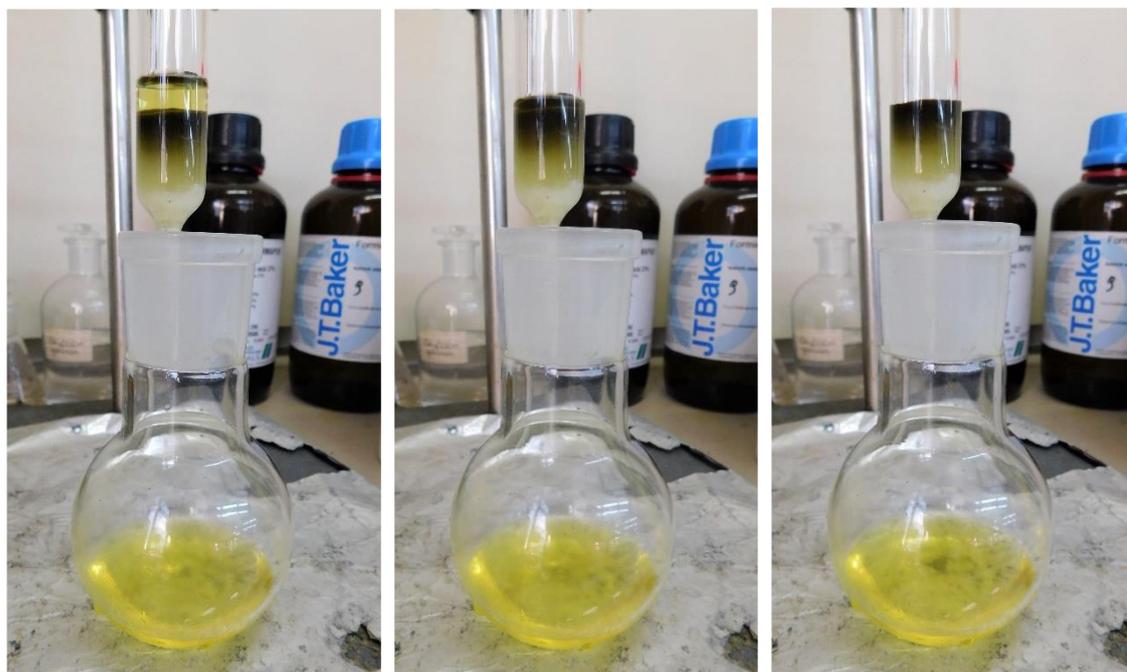
### 4.3 - Estrazione con il Soxhlet

Esattamente 2,5 grammi del materiale vegetale ripulito, sono stati pesati, chiusi in un cartoccio di carta da filtro e sottoposti ad estrazione mediante un apparato Soxhlet, utilizzando come solvente 120 ml di una miscela etere di petrolio/etere etilico (9:1 v/v) (Fig. 20).



**Fig. 20:** Fasi di estrazione delle infiorescenze essiccate di canapa industriale attraverso l'apparato di Soxhlet.

L'estrazione è stata condotta per 2 ore alla temperatura di ebollizione. L'estratto è stato filtrato su un letto di gel di silice (h 1,5 cm, Ø 1 cm) per allontanare le clorofille (Fig. 21).



**Fig. 21:** Fasi di eluizione cromatografica su gel di silice per eliminare la clorofilla dall'estratto ottenuto mediante il Soxhlet.

La silice è stata eluita con ulteriori 2 ml della miscela etere di petrolio/etere etilico (9:1 v/v) utilizzati anche per recuperare eventuali residui dell'estratto dal pallone. Successivamente l'estratto è stato portato a secco mediante evaporatore rotante (Rotavapor R-114, Buchi, Cornaredo, MI, Italia) e pesato.

## 4.4 - Estrazione con SC-CO<sub>2</sub>

Esattamente 2,5 grammi del materiale macinato sono stati impaccati in un vessel da estrazione di acciaio inossidabile da 5ml ( $\varnothing$  1,5 cm, h 6 cm). Lo spazio vuoto del vessel è stato riempito con materiale inerte costituito da ovatta di cellulosa. L'estrazione è stata condotta utilizzando un estrattore da laboratorio (Spe-ed SFE-2, *Applied Separations*, Allentown, PA, USA) ad una pressione di 300 bar e una temperatura di 60°C, in modo stazionario per i primi 15 minuti e successivamente in modo dinamico (flusso di CO<sub>2</sub> 0,218 kg/h<sup>-1</sup>) per ulteriori 60 minuti. Al termine dell'estrazione l'estratto oleo-resinoso e la matrice esausta sono stati pesati (Fig. 22).



**Fig. 22:** Apparenza macroscopica dell'estratto oleo-resinoso ottenuto con SC-CO<sub>2</sub> (A) e della relativa matrice esausta (B).

Prima dell'analisi, l'estratto oleo-resinoso è stato solubilizzato in 3 ml di una miscela etere di petrolio/etere etilico (9:1 v/v) e filtrato su una membrana di cellulosa con porosità di 0,45  $\mu$ m (Cromafil RC-45-25, Macherey-Nagel, Düren, Germania). Il filtrato è stato portato a secco mediante evaporatore rotante e ripesato.

## 4.5 - Analisi estratti

### 4.5.1 - Analisi qualitativa di terpeni e cannabinoidi mediante GC-MS

Aliquote da 50 mg di ciascun estratto secco sono stati solubilizzati in 1 ml della miscela etere di petrolio/etere etilico (9:1 v/v) e sottoposte direttamente ad analisi iniettando 3  $\mu$ l in un gas cromatografo modello 7820A (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CS, USA) munito di colonna cromatografica *Agilent HP-5ms semivolatile* con fase stazionaria in polimetilfenilossano 5% (lunghezza 30m, diametro interno 0,25mm, spessore particelle 0,25  $\mu$ m), con fase mobile ad elio (He) di portata 1 ml/min e da uno spettrometro di massa modello 5977E (*Detector MS*, SIM m/z 272.00, Start Mass 50.00, End Mass 600.00, Threshold 50,

*Tun ED*). Condizioni del GC-MS: temperatura iniettore 270°C; gradiente di temperatura 60°C per 10 minuti; velocità di salita 10°C/min fino a 280°C; 280°C per altri 20 minuti; temperatura del FID 290°C. Ottenuti i profili di frammentazione, sono state analizzate le masse molecolari di ciascun composto e confrontate con quelle presenti in libreria (*Nist MS Search 2.0*) per l'identificazione delle diverse molecole.

Questa procedura è stata ripetuta per ciascuna replica delle quattro cultivar esaminate con Soxhlet ed SC-CO<sub>2</sub>.

#### **4.5.2 - Analisi quantitativa di terpeni e cannabinoidi mediante GC-FID**

Aliquote da 50 mg di ciascun estratto secco sono stati solubilizzati in 0,5 ml della miscela etere di petrolio/etere etilico (9:1 v/v). 3 µl di tale soluzione sono stati iniettati al GC modello 6890 (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, USA), dotato di colonna cromatografica ZB-5 Phenomenex, Zebron (lunghezza 30 m, diametro interno 0,25 mm, spessore particelle 0,25 µm). Condizioni del GC-FID: temperatura iniettore 280°C; *split* di 1:60 e fase mobile ad elio di portata 1,4 ml/min; gradiente di temperatura 60°C per 10 minuti; velocità di salita 10°C/min fino a 280°C; 280°C per altri 30 minuti; temperatura del FID 290°C. L'analisi delle aree dei picchi sono state identificate dal software *Agilent GC Chemstation*.

Questa procedura è stata ripetuta per ciascuna replica delle quattro cultivar esaminate con Soxhlet ed SC-CO<sub>2</sub>.

#### **4.5.2 - Analisi dei cannabinoidi mediante HPLC-UV/DAD**

Dagli estratti ottenuti con Soxhlet ed SC-CO<sub>2</sub>, sono stati prelevati esattamente 4 mg di materiale secco e sono stati solubilizzati in 3 ml di una miscela acetato di etile/metanolo (2:1 v/v). Successivamente sono stati filtrati su membrana di cellulosa con porosità di 0,45 µm e iniettati all'HPLC modello 1260 Infinity (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, USA). La separazione cromatografica è stata realizzata mediante colonna *LiChrospher 100 RP18* (5 µm) *Merck* (lunghezza 250 mm, spessore di 4,6 mm), ad una lunghezza d'onda di 220 nm (Detector UV). L'eluente nella fase mobile è rappresentato da una miscela acetonitrile/soluzione acquosa di acido formico allo 0,1% (8:2 v/v), con pressione di 120 psi ed una temperatura isocratica di 25°C. Il volume di iniezione è stato di 1 µl, con una portata di 1 ml/min. L'analisi delle aree dei picchi dei principali cannabinoidi acidi (CBDA, TCHA) ed i loro analoghi neutri (CBD, THC), sono state identificate tramite soluzioni di standard analitici (THCA, THC, CBDA, CBD, CBG, soluzioni 1 mg/ml in metanolo) e dal software *Agilent Chemstation*.

Questa procedura è stata ripetuta per ciascuna replica delle quattro cultivar esaminate con Soxhlet ed SC-CO<sub>2</sub>.

## **4.6 - Analisi statistiche**

I risultati sono presentati come valore medio  $\pm$  deviazione standard di almeno due repliche indipendenti ( $n \geq 2$  per ogni test). L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test *one-way* ANOVA. Il metodo *Holm-Sidak* è stato applicato per stabilire differenze significative fra le medie. Tutte le comparazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il *software Sigma Stat 11.0* (Systat Software Inc., Chicago, IL).

## **5. *RISULTATI***

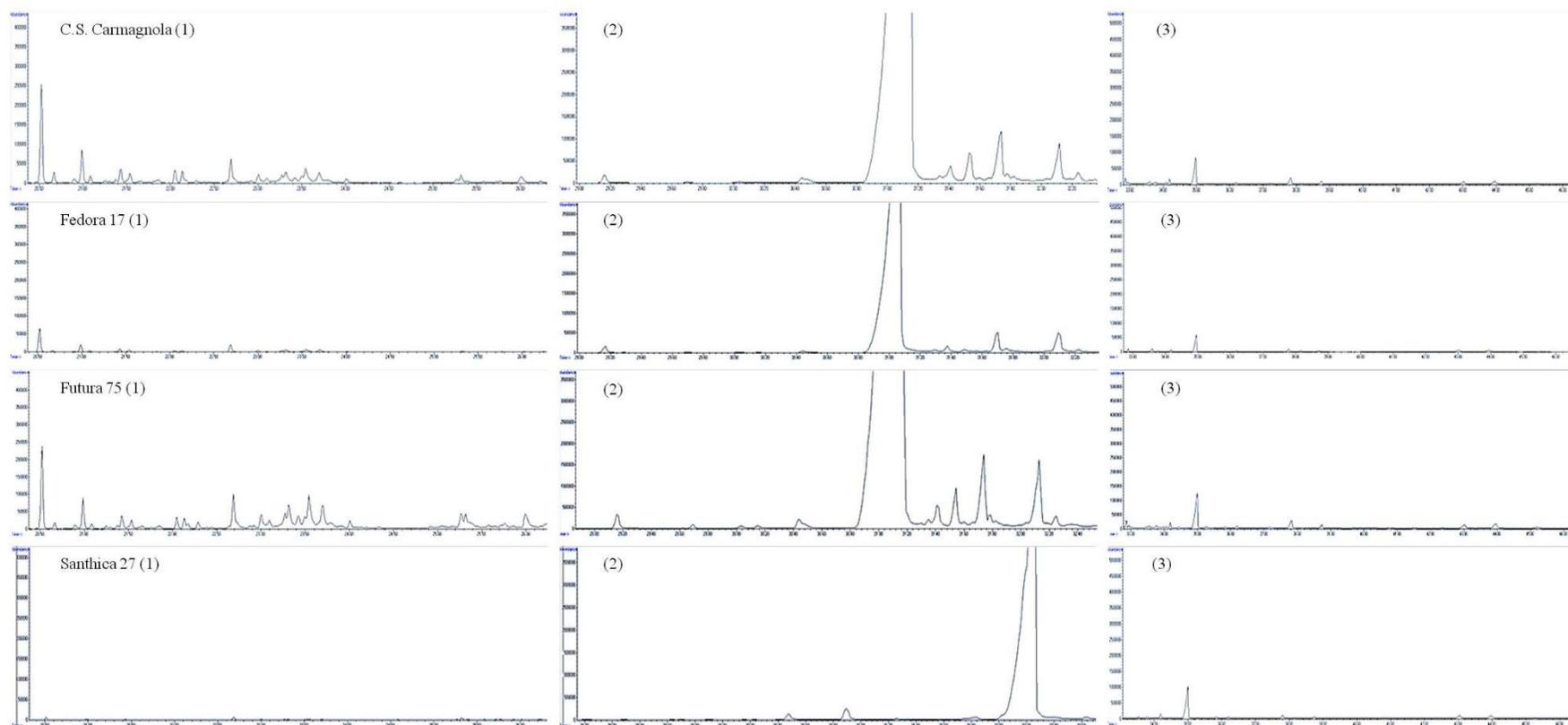
L'estrazione con la miscela etere di petrolio/etere etilico (9:1 v/v) effettuata con il Soxhlet, seguita dall'evaporazione del solvente, ha permesso di ottenere un estratto oleo-resinoso di colore verdastro.

La quantità di estratto ottenuto a partire da 2,5 g di infiorescenze essiccate delle quattro cultivar analizzate è riportato in tabella 7. Le cultivar Futura 75 e C.S. Carmagnola hanno dato la maggiore quantità di estratto (>260 mg), seguite da Fedora 17 e Santhica 27.

	Cultivar			
	C.S. Carmagnola	Fedora 17	Futura 75	Santhica 27
Estratto secco (mg)	264,50 ± 0,71 <sup>a</sup>	193,50 ± 13,44 <sup>b</sup>	276,00 ± 25,46 <sup>a</sup>	147,00 ± 1,41 <sup>c</sup>

**Tab. 7:** Quantità di estratto oleo-resinoso ottenuto da 2,5 g di infiorescenze essiccate delle quattro cultivar studiate mediante estrazione con il Soxhlet. I dati rappresentano la media ± deviazione standard di tre estrazioni indipendenti. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) secondo il test post-hoc di Holm-Sidak.

L'analisi GC-MS degli estratti ha evidenziato un consistente numero di picchi in tutte le cultivar analizzate (Fig. 23). Il confronto degli spettri di frammentazione di massa ottenuti per ciascun composto con quelli della libreria *Nist*, ha permesso di individuare 67 diverse molecole, alcune comuni a tutti i campioni, altre caratteristiche solo di specifiche cultivar (Tab. 8). L'analisi GC-FID degli estratti ha permesso, inoltre, di ottenere una valutazione semi-quantitativa dei composti identificati attraverso la determinazione dell'area sottesa a ciascun picco. I risultati ottenuti, espressi in unità arbitrarie (UA) ed in percentuale relativa al totale delle aree dei picchi identificati per ciascuna classe fitochimica di appartenenza (sesquiterpeni, cannabinoidi, triterpeni ed altri terpenoidi) sono riportati in tabella 8.



**Fig. 23:** Profilo cromatografico di sesquiterpeni (1), fitocannabinoidi (2), triterpeni e altri terpenoidi (3), presenti negli estratti ottenuti con il Soxhlet dalle infiorescenze essiccate delle quattro cultivar analizzate.

Componente	C.S. Carmagnola		Fedora 17		Futura 75		Santhica 27	
	Area picco (UA)	%	Area picco (UA)	%	Area picco (UA)	%	Area picco (UA)	%
<b>Sesquiterpene</b>								
β-Caryophyllene	5,02 ± 1,44	5,62	3,30 ± 1,52	16,58	5,16 ± 3,1	14,59	0,46 ± 0,10	17,54
trans-α-Bergamotene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,78 ± 0,55	2,22	n.d.	n.d.
(Z)-trans-α-Bergamotol	2,75 ± 2,00	3,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
trans-β-Bergamotene	n.d.	n.d.	0,45 ± 0,00	2,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(Z,Z)-α-Farnesene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,66 ± 0,18	1,86	0,37 ± 0,01	13,88
(Z,E)-α-Farnesene	2,09 ± 0,95	2,34	0,18 ± 0,05	0,92	n.d.	n.d.	0,33 ± 0,06	12,65
cis-β-Farnesene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63 ± 0,16	1,78	n.d.	n.d.
1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylen-	0,56 ± 0,31	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Humulene	1,52 ± 0,20	1,70	1,11 ± 0,51	5,59	1,48 ± 0,62	4,18	n.d.	n.d.
Aromadendrene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,37 ± 0,03	1,04	n.d.	n.d.
Alloaromadendrene	1,12 ± 0,58	1,25	0,28 ± 0,03	1,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Gurjunene	0,24 ± 0,11	0,27	0,35 ± 0,09	1,74	0,13 ± 0,02	0,36	n.d.	n.d.
Germacrene D	0,32 ± 0,23	0,36	n.d.	n.d.	0,25 ± 0,08	0,70	n.d.	n.d.
Cyperene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,29 ± 0,13	0,81	n.d.	n.d.
α-Selinene	n.d.	n.d.	0,67 ± 0,00	3,39	0,97 ± 0,35	2,75	n.d.	n.d.
δ-Selinene	0,25 ± 0,21	0,28	0,39 ± 0,05	1,97	0,57 ± 0,28	1,62	n.d.	n.d.
7-Epi-α-Selinene	0,53 ± 0,29	0,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+)-Valencene	1,85 ± 1,11	2,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cis-muurolo-4(14),5-diene (isomero)	n.d.	n.d.	0,11 ± 0,03	0,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-Gurjunene	2,02 ± 1,43	2,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Vatirenene (isomero)	1,08 ± 0,63	1,21	n.d.	n.d.	0,22 ± 0,11	0,62	n.d.	n.d.
(+)-Cadinene	0,91 ± 0,36	1,02	n.d.	n.d.	0,66 ± 0,18	1,86	n.d.	n.d.
Selina-3,7 (11) diene	2,02 ± 1,03	2,27	0,73 ± 0,13	3,68	1,39 ± 0,50	3,94	0,22 ± 0,03	8,46
Caryophyllene oxide	16,61 ± 8,45	18,60	5,80 ± 3,49	29,09	6,56 ± 1,43	18,56	0,94 ± 0,06	35,61
Alloaromadendrene (isomero)	1,84 ± 0,68	2,06	n.d.	n.d.	0,97 ± 0,03	2,74	n.d.	n.d.
Ledene oxide-(II)	10,44 ± 3,19	11,68	n.d.	n.d.	3,51 ± 0,53	9,92	n.d.	n.d.
(-)-Humulene epoxide II	n.d.	n.d.	2,20 ± 1,19	11,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Guaiene	1,42 ± 0,61	1,60	n.d.	n.d.	0,84 ± 0,13	2,39	n.d.	n.d.
cis-muurolo-4(14),5-diene	n.d.	n.d.	0,27 ± 0,02	1,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Vatirenene	5,34 ± 1,96	5,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Nootkatol	6,80 ± 3,34	7,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenbicyclo[7.2.0]undecan-5β-ol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31 ± 0,05	11,68
1,8-Cyclopentadecadiene (isomero)	n.d.	n.d.	1,64 ± 0,01	8,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)2-methylenbicyclo[4.1.0]heptane	3,09 ± 1,98	3,46	n.d.	n.d.	1,19 ± 0,38	3,36	n.d.	n.d.
4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)2-methylenbicyclo[4.1.0]heptane	10,81 ± 4,91	12,10	n.d.	n.d.	3,02 ± 1,70	8,53	n.d.	n.d.
4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)2-methylenbicyclo[4.1.0]heptane	7,65 ± 4,24	8,56	n.d.	n.d.	2,39 ± 0,96	6,75	n.d.	n.d.
1,8-Cyclopentadecadiene	n.d.	n.d.	1,98 ± 0,46	9,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Guaiene (isomero)	0,53 ± 0,10	0,60	n.d.	n.d.	0,46 ± 0,21	1,29	n.d.	n.d.
10-epi-γ-Eudesmol	n.d.	n.d.	0,46 ± 0,21	2,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ledene oxide (II) (isomero)	0,65 ± 0,38	0,73	n.d.	n.d.	1,19 ± 0,19	3,37	n.d.	n.d.
6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphtalen-2-ol	1,84 ± 1,10	2,06	n.d.	n.d.	1,68 ± 0,33	4,76	n.d.	n.d.
<b>Totale Sesquiterpeni</b>	89,32 ± 41,80 <sup>a</sup>		19,93 ± 7,79 <sup>b</sup>		35,37 ± 12,16 <sup>b</sup>		2,63 ± 0,31 <sup>b</sup>	

(continua)

<b>Cannabinoidi</b>								
δ9-Tetrahydrocannabivarina (THCV)	27,09 ± 8,69	0,78	33,73 ± 5,51	1,75	25,23 ± 1,65	0,88	n.d.	n.d.
δ8-Tetrahydrocannabinolo (D8-THC)	6,02 ± 2,33	0,17	n.d.	n.d.	5,52 ± 0,08	0,19	n.d.	n.d.
3-t-Butyl-6,6,9-trimethyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol (isomero THC-C4)	7,89 ± 2,95	0,23	4,75 ± 0,22	0,25	6,15 ± 1,01	0,21	n.d.	n.d.
Cannabidiolo (isomero)	5,97 ± 2,71	0,17	n.d.	n.d.	5,40 ± 0,04	0,19	1,72 ± 0,28	0,19
Cannabichromene (CBC)	19,19 ± 1,86	0,55	3,14 ± 0,55	0,16	26,34 ± 0,82	0,92	1,54 ± 0,33	0,17
Cannabinolo (CBN)	10,40 ± 1,44	0,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cannabichromene (isomero)	n.d.	n.d.	13,13 ± 2,36	0,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cannabidiolo (CBD)	2906,07 ± 297,82	83,86	1626,29 ± 154,78	84,55	2450,65 ± 34,43	85,39	n.d.	n.d.
1,3-Benzenediolo, 5-pentil-2-(4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-yl)-, (1α,2α,5α)-	21,59 ± 10,62	0,62	8,82 ± 0,31	0,46	13,95 ± 0,82	0,49	n.d.	n.d.
Dronabinolo (isomero THC)	57,81 ± 9,93	1,67	30,44 ± 0,47	1,58	44,04 ± 3,35	1,53	n.d.	n.d.
6H-Dibenzo[b,d]pyran-1,8-diol, 6a,7,8,9,10,10a-hexahidro-6,6-dimetil-9-metilene-3-pentil-	95,95 ± 18,30	2,77	26,54 ± 18,23	1,38	33,78 ± 15,21	1,18	13,45 ± 0,85	1,51
Dronabinolo (THC)	167,95 ± 14,71	4,85	82,91 ± 9,82	4,31	126,26 ± 3,60	4,40	n.d.	n.d.
Hydroxy-δ9-tetrahydrocannabinolo, 8-α (11-OH-THC)	11,19 ± 2,39	0,32	4,30 ± 0,08	0,22	5,85 ± 0,08	0,20	n.d.	n.d.
Hydroxy-δ9-tetrahydrocannabinolo, 8-α (isomero)	11,30 ± 2,81	0,33	n.d.	n.d.	4,40 ± 0,21	0,15	n.d.	n.d.
Acetic acid, 4-acetoxi-3-(3,7,11-trimethyl,dodeca-2,6,10-trienil)-phenil ester	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,98 ± 1,42	1,91
Cannabichromene (isomero)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29,05 ± 1,36	3,26
Cannabigerolo (CBG)	94,03 ± 14,87	2,71	83,28 ± 10,16	4,33	108,72 ± 7,91	3,79	827,93 ± 92,44	92,96
Cannabinolo (CBN)	15,71 ± 1,79	0,45	6,15 ± 0,50	0,32	11,02 ± 0,64	0,38	n.d.	n.d.
Dronabinolo (isomero)	3,03 ± 0,58	0,09	n.d.	n.d.	2,67 ± 0,11	0,09	n.d.	n.d.
Dronabinolo (isomero)	4,23 ± 2,10	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Totale Cannabinoidi</b>	<b>3465,42 ± 395,90<sup>a</sup></b>		<b>1923,47 ± 202,97<sup>c</sup></b>		<b>2869,99 ± 69,96<sup>b</sup></b>		<b>890,67 ± 96,67<sup>d</sup></b>	
<b>Triterpene</b>								
Squalene	19,38 ± 2,00	43,86	10,72 ± 0,85	43,74	14,60 ± 0,14	41,28	10,74 ± 1,13	41,78
β-Amirina	8,09 ± 1,93	18,31	11,16 ± 1,22	45,54	16,65 ± 4,15	47,07	11,30 ± 0,66	43,98
α-Amirina	16,71 ± 5,37	37,82	2,62 ± 0,21	10,70	4,12 ± 0,14	11,66	3,66 ± 0,42	14,23
<b>Totale Triterpeni</b>	<b>44,18 ± 9,30<sup>a</sup></b>		<b>24,50 ± 2,28<sup>b</sup></b>		<b>35,37 ± 4,42<sup>ab</sup></b>		<b>25,70 ± 2,20<sup>b</sup></b>	
<b>Altro</b>								
Obacunone	11,11 ± 1,61	29,71	5,25 ± 0,50	20,31	2,19 ± 0,34	8,53	n.d. ± n.d.	n.d.
Vit. E	18,90 ± 2,96	50,52	12,36 ± 2,18	47,80	13,12 ± 1,00	51,05	6,88 ± 0,68	50,75
β-Sitosterolo	7,39 ± 1,31	19,76	8,24 ± 2,42	31,88	10,39 ± 0,25	40,42	6,67 ± 0,52	49,25
<b>Totale altri</b>	<b>37,40 ± 5,88<sup>a</sup></b>		<b>25,86 ± 5,10<sup>b</sup></b>		<b>25,71 ± 1,59<sup>b</sup></b>		<b>13,55 ± 1,20<sup>c</sup></b>	

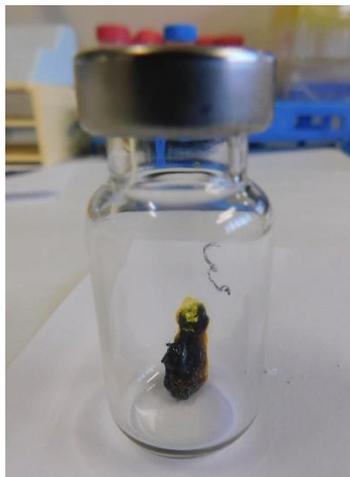
**Tab. 8:** Analisi e comparazione fitochimica di sesquiterpeni, cannabinoidi, triterpeni e altri terpenoidi, estratti con il Soxhlet dalle infiorescenze essiccate delle quattro cultivar di *C. sativa* L. analizzate. I valori sono espressi in unità arbitrarie. I valori sono espressi in unità arbitrarie (UA) come area sottesa a ciascun picco e in percentuale relativa (%) al totale delle aree dei picchi identificati per ciascuna classe fitochimica di appartenenza. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) nelle medie dei totali di ciascuna classe fitochimica tra le diverse cultivar secondo il test post-hoc di Holm-Sidak. n.d. = not detected.

La classe dei sesquiterpeni è risultata essere quella più rappresentata; sono stati, infatti, identificati 41 composti differenti. Tra questi, i più abbondanti in termini percentuali sono risultati il caryophyllene oxide (18-35%) e il  $\beta$ -caryophyllene (5-17%) presenti in tutte le cultivar, seguiti da diversi isomeri del 4,4-dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane (3-12%) identificati, però, solo nelle due cultivar C.S. Carmagnola e Futura 75. Santhica 27 è risultata la cultivar con il contenuto più basso di sesquiterpeni. Per quanto riguarda la classe dei cannabinoidi è stato possibile identificare 20 composti differenti che comprendono sia le forme acide che neutre. In tutte le cultivar analizzate, con l'eccezione di Santhica 27, il CBD (83-85%) risulta essere il cannabinoide prevalente, seguito dal THC (4%) la cui percentuale risulta, come atteso nelle cultivar industriali, piuttosto bassa. In Santhica 27, CBD e THC dono entrambi presenti in tracce, mentre il CBG (92%) risulta il fitocannabinoide più rappresentativo. Nella classe dei triterpeni sono stati identificati solo tre molecole (squalene e amirina nelle forme isomeriche  $\alpha$  e  $\beta$ ). Negli estratti ottenuti con il soxhlet dalle infiorescenze essiccate delle tre cultivar Fedora 17, Futura 75 e Santhica 27, squalene e  $\beta$ -amirina risultano entrambi ben rappresentati con percentuali che superano il 40% rispetto al totale dei triterpeni identificati, l'estratto ottenuto da C.S. Carmagnola invece presenta una bassa percentuale di  $\beta$ -amirina (18%) a favore dell'isomero  $\alpha$ . Relativamente agli altri terpenoidi, anche in questo caso sono stati identificati solo 3 molecole (obacunone, vitamina E e  $\beta$ -sitosterolo). La vitamina E (47-51%), rispetto a obacunone (8-29%) e al  $\beta$ -sitosterolo (19-49%) è risultata la molecola percentualmente più abbondante in tutte le cultivar.

L'analisi di varianza (ANOVA) condotta sui totali di sesquiterpeni, fitocannabinoidi, triterpeni e altri terpenoidi ha evidenziato differenze altamente significative ( $p < 0,01$ ) tra le quattro cultivar analizzate. C.S. Carmagnola è risultata la cultivar con il maggior contenuto di sesquiterpeni totali ( $89,32 \pm 41,80$  UA), seguita da Futura 75 ( $35,37 \pm 12,16$ UA), Fedora 17 ( $19,93 \pm 7,79$ UA) e Santhica 27 ( $2,63 \pm 0,31$ UA). Anche per quanto riguarda i cannabinoidi totali le quattro cultivar seguono lo stesso ordine con C.S. Carmagnola che si conferma prima ( $3465,42 \pm 395,90$ UA), seguita da Futura 75 ( $2869,99 \pm 69,96$ UA), Fedora 17 ( $1923,47 \pm 202,97$ UA) e Santhica 27 ( $890,67 \pm 96,67$ UA). Il ranking varietale si consolida anche per la quantità totale di triterpeni con C.S. Carmagnola che presenta quantità quasi doppie rispetto a Santhica 27 e per quella degli altri terpenoidi dove C.S. Carmagnola ( $37,40 \pm 5,88$  UA) risulta avere un contenuto 2,7 volte maggiore rispetto a Santhica 27 ( $13,55 \pm 1,20$  UA).

Rispetto al Soxhlet, la quantità di estratto oleo-resinoso ottenuto con SC-CO<sub>2</sub> da 2,5 g di infiorescenze essiccate, di colore più verdastro rispetto all'estrazione precedente (Fig. 24), è

risultata inferiore in tutte le cultivar. C.S. Carmagnola e Futura 75 si confermano quelle con la migliore resa estrattiva (Tab. 9).



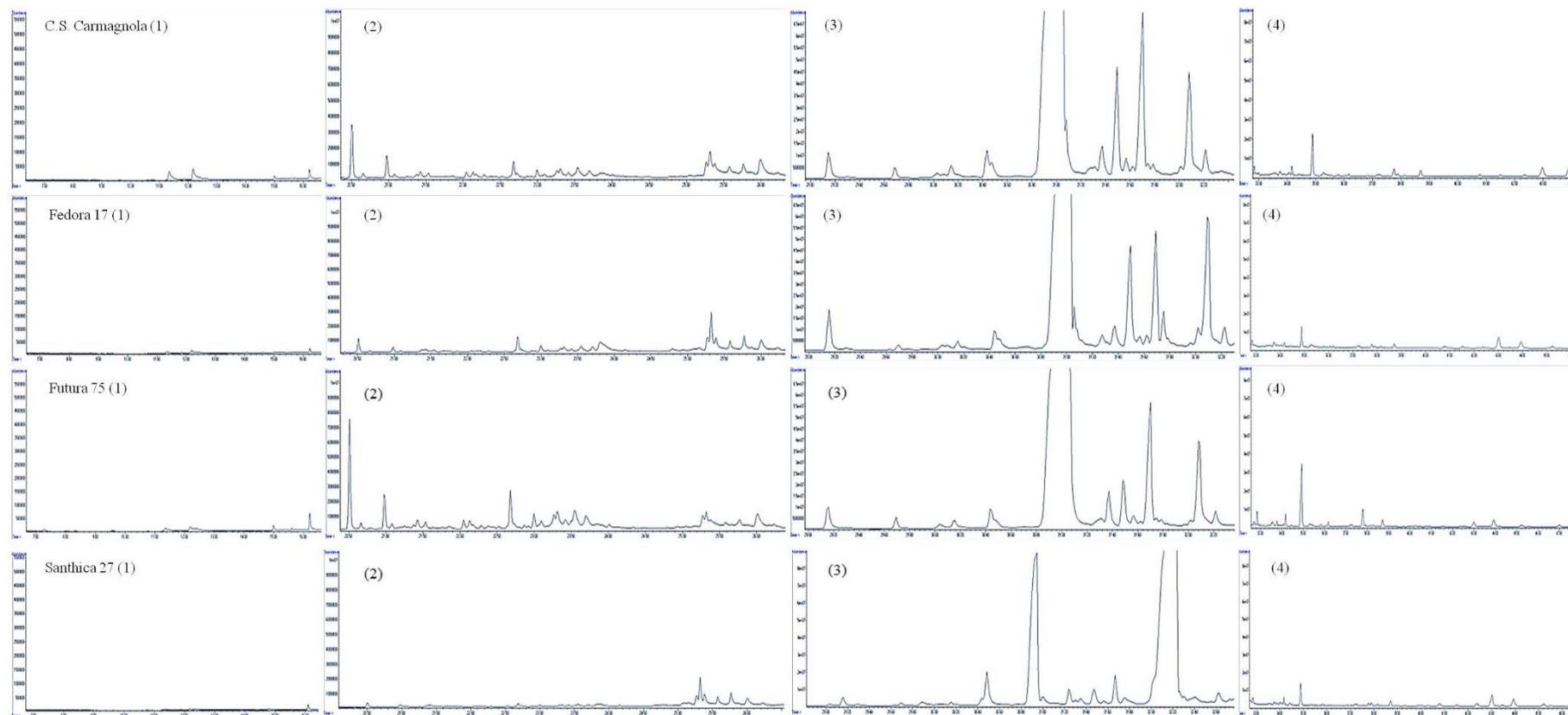
**Fig. 24:** Aspetto dell'estratto oleo-resinoso ottenuto dalle infiorescenze essiccate della cultivar Futura 75 mediante estrazione con SC-CO<sub>2</sub>.

	Cultivar			
	C.S. Carmagnola	Fedora 17	Futura 75	Santhica 27
Estratto secco (mg)	116,50 ± 19,09 <sup>a</sup>	40,00 ± 14,14 <sup>b</sup>	191,00 ± 83,44 <sup>a</sup>	72,50 ± 34,65 <sup>b</sup>

**Tab. 9:** Quantità di estratto oleo-resinoso ottenuto da 2,5 g di infiorescenze essiccate delle quattro cultivar studiate mediante estrazione con SC-CO<sub>2</sub>. I dati rappresentano la media ± deviazione standard di due estrazioni indipendenti. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) secondo il test post-hoc di Holm-Sidak.

Anche per questi estratti, l'analisi GC-MS ha evidenziato un consistente numero di picchi (Fig. 25) ed ha permesso di individuare 57 diverse molecole (Tab. 10), evidenziando sostanziali differenze tra le quattro cultivar analizzate. Inoltre, negli estratti ottenuti con SC-CO<sub>2</sub> è stato possibile identificare la presenza anche di 8 molecole appartenenti alla classe dei monoterpeni che risultavano invece assenti negli estratti ottenuti con il Soxhlet.

L'analisi dell'area sottesa a ciascun picco ottenuto attraverso GC-FID ha permesso una valutazione comparativa semi-quantitativa dei composti presenti negli estratti ottenuti con SC-CO<sub>2</sub> dalle quattro cultivar, suddivise in base alla loro classe fitochimica di appartenenza in monoterpeni, sesquiterpeni, cannabinoidi, triterpeni ed altro (Tab. 10). Come descritto in precedenza, i risultati ottenuti, sono espressi in unità arbitrarie come area sottesa a ciascun picco ed in percentuale relativa al totale delle aree dei picchi identificati per ciascuna classe fitochimica e rappresentano la media ± deviazione standard di due estrazioni indipendenti.



**Fig. 25:** Profilo cromatografico di monoterpeni (1), sesquiterpeni (2), fitocannabinoidi (3), triterpeni e altri terpenoidi (4), presenti negli estratti ottenuti con SC-CO<sub>2</sub> dalle infiorescenze essiccate delle quattro cultivar analizzate.

Componente	C.S. Carmagnola		Fedora 17		Futura 75		Santhica 27	
	Area picco (UA)	%	Area picco (UA)	%	Area picco (UA)	%	Area picco (UA)	%
<b>Monoterpeni</b>								
<i>Monoterpeni</i>								
$\alpha$ -Pinene	<0,01	<0,01	n.d.	n.d.	<0,01	<0,01	n.d.	n.d.
2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene E,E	1,08 $\pm$ 0,93	30,59	0,28 $\pm$ 0,10	26,58	2,53 $\pm$ 2,25	26,96	0,43 $\pm$ 0,30	34,20
Terpinolene	<0,01	<0,01	n.d.	n.d.	<0,01	<0,01	n.d.	n.d.
2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene E,Z	1,26 $\pm$ 0,99	35,69	0,33 $\pm$ 0,13	31,54	2,76 $\pm$ 2,42	29,48	0,47 $\pm$ 0,33	37,69
Fenchol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09 $\pm$ 0,86	11,59	n.d.	n.d.
Fenchol (isomero)	0,41 $\pm$ 0,50	11,49	n.d.	n.d.	0,29 $\pm$ 0,27	3,07	n.d.	n.d.
Farnesene epoxide, E- (-)-Borneol	n.d.	n.d.	0,23 $\pm$ 0,16	21,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,79 $\pm$ 0,29	22,20	0,21 $\pm$ 0,13	19,79	2,71 $\pm$ 0,24	28,87	0,35 $\pm$ 0,10	28,02
<b>Totale Monoterpeni</b>	3,54 $\pm$ 2,72 <sup>ab</sup>		1,05 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>		9,37 $\pm$ 6,04 <sup>a</sup>		1,25 $\pm$ 0,72 <sup>ab</sup>	
<b>Sesquiterpeni</b>								
<i>Sesquiterpeni</i>								
$\beta$ -Caryophyllene	7,01 $\pm$ 9,07	22,45	0,19 $\pm$ 0,09	22,60	1,68 $\pm$ 0,78	16,77	0,15 $\pm$ 0,07	30,59
trans- $\alpha$ -Bergamotene	0,98 $\pm$ 1,24	3,15	n.d.	n.d.	0,16 $\pm$ 0,02	1,55	n.d.	n.d.
trans- $\alpha$ -Bergamotene (isomero)	n.d.	n.d.	0,03 $\pm$ 0,01	3,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\alpha$ -acorenol	0,30 $\pm$ 0,16	0,97	0,09 $\pm$ 0,06	10,40	0,28 $\pm$ 0,19	2,83	0,03 $\pm$ 0,02	6,89
$\alpha$ -Humulene	2,97 $\pm$ 3,82	9,19	0,16 $\pm$ 0,06	19,44	0,55 $\pm$ 0,18	5,49	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Humulene (isomero)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09 $\pm$ 0,01	17,01
Alloaromadendrene	0,68 $\pm$ 0,86	2,17	n.d.	n.d.	0,14 $\pm$ 0,06	1,36	n.d.	n.d.
$\beta$ -Guaiene	0,31 $\pm$ 0,34	0,98	0,05 $\pm$ 0,03	6,49	0,11 $\pm$ 0,02	1,07	0,07 $\pm$ 0,00	14,08
$\alpha$ -Selinene	1,11 $\pm$ 1,35	3,55	n.d.	n.d.	0,28 $\pm$ 0,03	2,77	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Selinene (isomero)	0,86 $\pm$ 1,08	2,76	n.d.	n.d.	0,12 $\pm$ 0,05	1,24	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Gurjunene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14 $\pm$ 0,02	1,44	n.d.	n.d.
$\beta$ -Guaiene (isomero)	0,74 $\pm$ 0,93	2,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eudesma-4(14),7(11)-diene	n.d.	n.d.	0,03 $\pm$ 0,02	3,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Selina-3,7 (11) diene	1,05 $\pm$ 1,24	3,38	n.d.	n.d.	0,38 $\pm$ 0,15	3,80	n.d.	n.d.
$\gamma$ -Himacalene	0,72 $\pm$ 0,61	2,32	n.d.	n.d.	0,41 $\pm$ 0,12	4,14	n.d.	n.d.
7-epi-cis-sesquisabinene hydrate (isomero)	n.d.	n.d.	0,03 $\pm$ 0,02	3,09	n.d. $\pm$ n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Caryophyllene oxide	3,01 $\pm$ 3,92	9,65	0,15 $\pm$ 0,11	18,29	0,27 $\pm$ 0,14	2,68	0,16 $\pm$ 0,09	31,52
7-epi-cis-sesquisabinene hydrate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,19 $\pm$ 0,05	1,93	n.d.	n.d.
$\beta$ -Guaiene (isomero)	0,29 $\pm$ 0,31	0,92	0,05 $\pm$ 0,02	6,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Humulene epoxide 2	1,64 $\pm$ 1,97	5,26	n.d.	n.d.	0,28 $\pm$ 0,10	2,77	n.d.	n.d.
Caryophyllene oxide (isomero)	1,21 $\pm$ 1,45	3,89	n.d.	n.d.	0,35 $\pm$ 0,02	3,55	n.d.	n.d.
Longipinocarveol, trans-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,38 $\pm$ 0,00	3,81	n.d.	n.d.
Longipinocarveol, trans- (isomero)	0,70 $\pm$ 0,66	2,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isoaromadendrene epoxide	1,40 $\pm$ 1,58	4,49	0,05 $\pm$ 0,03	5,99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Caryophyllene oxide (isomero)	1,61 $\pm$ 2,00	5,15	n.d.	n.d.	0,41 $\pm$ 0,14	4,14	n.d.	n.d.
Caryophyllene oxide (isomero)	1,24 $\pm$ 1,22	3,97	n.d.	n.d.	0,44 $\pm$ 0,00	4,42	n.d.	n.d.
Epiglobulol	0,42 $\pm$ 0,23	1,35	n.d.	n.d.	0,34 $\pm$ 0,17	3,40	n.d.	n.d.
2-Naphtalenol, 2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-1, 4a-dimethyl-7-(2-hydroxy-1-methylethyl)	0,94 $\pm$ 0,12	3,02	n.d.	n.d.	1,03 $\pm$ 0,22	10,34	n.d.	n.d.
4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	2,11 $\pm$ 0,82	6,77	n.d.	n.d.	2,05 $\pm$ 0,14	20,52	n.d.	n.d.
<b>Totale Sesquiterpeni</b>	31,21 $\pm$ 34,97 <sup>a</sup>		0,82 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>		10,00 $\pm$ 2,61 <sup>b</sup>		0,50 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	

(continua)

<b>Cannabinoidi</b>								
δ9-Tetrahydrocannabivarina (THCV)	6,23 ± 4,76	0,60	5,43 ± 3,51	1,05	10,17 ± 6,59	0,63	n.d.	n.d.
δ8-Tetrahydrocannabinolo (D8-THC)	3,38 ± 2,78	0,32	1,39 ± 0,32	0,27	5,42 ± 4,21	0,33	1,58 ± 0,52	0,21
3-t-Butyl-6,69-trimethyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol (isomero THC-C4)	2,58 ± 1,94	0,25	1,42 ± 0,91	0,27	3,95 ± 1,02	0,24	n.d.	n.d.
Cannabidiolo (isomero)	6,69 ± 5,43	0,64	4,12 ± 1,64	0,79	10,24 ± 4,52	0,63	2,15 ± 1,21	0,29
Cannabichromene (CBC)	12,18 ± 8,40	1,16	6,01 ± 3,66	1,16	15,67 ± 5,87	0,96	n.d.	n.d.
Acetic acid, 4-acetoxy-3-(3,7,11-trimethyl,dodeca-2,6,10-trienyl)-phenyl ester	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,24 ± 5,53	2,15
Cannabidiolo (CBD)	782,95 ± 583,09	74,87	370,43 ± 249,59	71,46	1268,15 ± 528,41	77,96	121,02 ± 56,38	16,01
1,3-Benzenediol, 5-pentyl-2-(4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-yl..	10,55 ± 8,65	1,01	5,26 ± 4,05	1,01	15,55 ± 3,15	0,96	11,15 ± 5,63	1,48
Dronabinolo (THC)	16,02 ± 11,68	1,53	6,85 ± 4,70	1,32	29,33 ± 11,95	1,80	2,20 ± 0,87	0,29
6H-Dibenzo[b,d]pyran-1,8-diol, 6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6,6-dimethyl-9..	50,08 ± 30,00	4,79	28,31 ± 18,55	5,46	45,49 ± 12,49	2,80	9,37 ± 3,74	1,24
Dronabinolo (isomero)	87,86 ± 54,67	8,40	33,75 ± 15,20	6,51	117,60 ± 23,41	7,23	n.d.	n.d.
Cannabigerolo (CBG)	56,84 ± 40,15	5,43	49,32 ± 31,64	9,51	93,81 ± 22,80	5,77	578,11 ± 206,39	76,47
Cannabinolo (CBN)	8,88 ± 4,19	0,85	4,63 ± 2,45	0,89	9,50 ± 1,85	0,58	n.d.	n.d.
Dronabinolo (isomero)	1,55 ± 0,76	0,15	1,49 ± 0,85	0,29	1,70 ± 0,19	0,10	14,13 ± 5,39	1,87
<b>Totale Cannabinoidi</b>	<b>1045,78 ± 756,51<sup>ab</sup></b>		<b>518,40 ± 337,06<sup>b</sup></b>		<b>1626,59 ± 626,45<sup>a</sup></b>		<b>755,97 ± 285,67<sup>b</sup></b>	
<b>Triterpene</b>								
Squalene	4,96 ± 1,28	25,15	2,16 ± 0,92	25,54	12,11 ± 1,30	18,93	3,00 ± 0,59	23,86
β-Amirina	7,43 ± 2,28	37,72	2,75 ± 1,28	32,48	40,83 ± 13,38	63,82	6,55 ± 2,90	51,99
α-Amirina	7,32 ± 1,95	37,14	3,55 ± 1,71	41,96	11,04 ± 3,34	17,25	3,04 ± 1,18	24,19
<b>Totale Triterpeni</b>	<b>19,71 ± 5,51<sup>b</sup></b>		<b>8,47 ± 3,90<sup>b</sup></b>		<b>63,98 ± 18,02<sup>a</sup></b>		<b>12,59 ± 4,66<sup>b</sup></b>	
<b>Altro</b>								
Obacunone	0,95 ± 0,16	9,50	0,50 ± 0,39	10,34	3,24 ± 1,91	16,49	n.d.	n.d.
Vit. E	4,18 ± 0,99	41,98	2,77 ± 1,52	57,22	10,31 ± 4,20	52,51	3,26 ± 1,49	49,33
β-Sitosterolo	4,84 ± 0,65	48,56	1,57 ± 0,54	32,45	6,08 ± 1,40	30,97	3,34 ± 0,31	50,60
<b>Totale altri</b>	<b>9,97 ± 1,81<sup>ab</sup></b>		<b>4,84 ± 2,46<sup>b</sup></b>		<b>19,64 ± 7,51<sup>a</sup></b>		<b>6,60 ± 1,80<sup>b</sup></b>	

**Tab. 10:** Analisi e comparazione fitochimica di monoterpene, sesquiterpeni, cannabinoidi, triterpeni e altri terpenoidi estratti con SC-CO<sub>2</sub> dalle infiorescenze essiccate delle quattro cultivar di *C. sativa* L. analizzate. I valori sono espressi in unità arbitrarie (UA) come area sottesa a ciascun picco e in percentuale relativa (%) al totale delle aree dei picchi identificati per ciascuna classe fitochimica di appartenenza. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative (p<0,05) nelle medie dei totali di ciascuna classe fitochimica tra le diverse cultivar secondo il test post-hoc di Holm-Sidak. n.d. = not detected.

In tutte le cultivar, ad eccezione di Santhica 27, sono stati identificati 8 monoterpeni. In termini percentuali rispetto ai monoterpeni totali, i più abbondanti risultano essere il 2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene E,E (26-34%) e il suo stereoisomero il 2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene E,Z (29-37%), seguiti dal (-)-borneolo (20-29%). Solo nella cultivar Fedora 17 è stato riscontrato il farnesene epoxide in percentuale sostanziale (22%).

I sesquiterpeni, con 29 molecole identificate, risultano la classe più numerosa. Il  $\beta$ -caryophyllene (16-30%) e il caryophyllene oxide (2-31%) risultano i due composti più abbondanti in tutte le cultivar, mentre l' $\alpha$ -humulene, anch'esso ben rappresentato (5-19%), non è stato ritrovato in Santhica 27.

Tra i fitocannabinoidi sono state identificate 14 molecole tra forme acide e neutre. Anche l'estrazione con SC-CO<sub>2</sub> ha confermato che CBD (71-74%) e THC (6-8%) sono i cannabinoidi più abbondanti in C.S. Carmagnola, Fedora 17 e Futura 75, mentre sono presenti solo in tracce in Santhica 27 dove, invece, il CBG è il cannabinoide principale.

La classe dei triterpeni presenta la  $\beta$ -amirina come il composto in generale più rappresentato (32-63%) rispetto a squalene (18-25%) e  $\alpha$ -amirina (17-41%) in quasi tutte le cultivar ad eccezione di C.S. Carmagnola e Fedora 17 dove le percentuali di  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina si equivalgono.

Infine vitamina E (41-57%) e  $\beta$ -sitosterolo (30-50%) sono prevalenti in tutte le cultivar, rispetto all'obacunone (9-16%), che risulta presente in Santhica 27 solo in tracce.

L'analisi statistica condotta sui totali di monoterpeni ha evidenziato differenze significative tra le quattro cultivar ( $P=0,021$ ), mentre le differenze sui totali di sesquiterpeni, fitocannabinoidi, triterpeni e altri terpenoidi è risultata altamente significativa ( $P < 0,01$ ).

Dall'analisi ANOVA, Futura 75 ( $9,37 \pm 6,04$  UA) risulta la cultivar più ricca in monoterpeni totali, seguita da C.S. Carmagnola ( $3,54 \pm 2,72$ UA) e Santhica 27 ( $1,25 \pm 0,72$  UA), mentre Fedora 17 ( $1,05 \pm 0,53$  UA) risulta quella con il contenuto più basso.

C.S. Carmagnola è la varietà che presenta il più alto contenuto di sesquiterpeni totali ( $31,21 \pm 34,97$  UA), seguita da Futura 75 ( $10,00 \pm 2,61$  UA), Fedora 17 ( $0,82 \pm 0,45$  UA) e Santhica 27 ( $0,50 \pm 0,19$  UA).

Futura 75 ( $1626,59 \pm 626,45$  UA) rappresenta la cultivar con la maggiore quantità totale di fitocannabinoidi, seguita da C.S. Carmagnola ( $1045,78 \pm 756,51$  UA), Fedora 17 ( $518,40 \pm 337,06$  UA) e Santhica 27 ( $755,97 \pm 285,67$  UA) che risultano avere quantità significativamente inferiori.

Futura 75 ( $63,98 \pm 18,02$  UA) risulta avere il contenuto più alto di triterpeni totali, seguita da C.S. Carmagnola ( $19,71 \pm 5,51$  UA), Santhica 27 ( $12,59 \pm 4,66$  UA) e Fedora 17 ( $8,47 \pm 3,90$  UA).

Vitamina E, obacunone e  $\beta$ -sitosterolo, risultano essere più abbondanti in Futura 75 ( $19,64 \pm 7,51$  UA), seguita da C.S. Carmagnola ( $9,97 \pm 1,81$  UA), Santhica 27 ( $6,60 \pm 1,80$  UA) e Fedora 17 ( $4,84 \pm 2,46$  UA).

Dato il forte interesse per i fitocannabinoidi come molecole potenzialmente utili nella terapia di alcune patologie, tutti gli estratti sono stati analizzati quali-quantitativamente attraverso HPLC-UV/DAD per quanto riguarda questa classe di composti (Tab. 11).

Componente	Cultivar							
	C.S. Carmagnola		Fedora 17		Futura 75		Santhica 27	
	Soxhlet	SC-CO <sub>2</sub>						
CBDA(g/100g)	3,51 $\pm$ 0,36	2,17 $\pm$ 0,69	1,71 $\pm$ 0,19	0,41 $\pm$ 0,25	2,44 $\pm$ 1,79	1,93 $\pm$ 0,73	<0,01	<0,01
CBD(g/100g)	0,82 $\pm$ 0,20	0,36 $\pm$ 0,23	0,80 $\pm$ 0,22	0,09 $\pm$ 0,04	1,26 $\pm$ 0,84	0,90 $\pm$ 0,28	<0,01	<0,01
CBG(g/100g)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	2,31 $\pm$ 1,26	1,68 $\pm$ 0,94
THCA(g/100g)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
THC(g/100g)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

**Tab. 11:** Analisi comparativa delle quantità dei principali fitocannabinoidi estratti mediante Soxhlet e SC-CO<sub>2</sub> dalle infiorescenze essiccate delle quattro cultivar di *C. sativa* L. analizzate. I risultati sono espressi in g/100 g di infiorescenze secche e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di almeno 2 estrazioni indipendenti.

Dai risultati ottenuti, C.S. Carmagnola è la cultivar più ricca in CBDA sia negli estratti con Soxhlet (3,51 g/100 g) che con SC-CO<sub>2</sub> (2,17 g/100 g) rispetto a tutte le cultivar, seguita da Futura 75 (Soxhlet, 2,44 g/100 g; SC-CO<sub>2</sub>, 1,93 g/100 g) e Fedora 17 (Soxhlet, 1,71 g/100 g; SC-CO<sub>2</sub>, 0,41 g/100 g), Santhica 27 presenta il CBDA solo in tracce.

Futura 75 invece è la cultivar che presenta il CBD più abbondante, sia negli estratti con Soxhlet (1,26 g/100 g) che con SC-CO<sub>2</sub> (0,90 g/100 g), seguita da C.S. Carmagnola (Soxhlet, 0,82 g/100 g; SC-CO<sub>2</sub>, 0,36 g/100 g) e Fedora 17 (Soxhlet, 0,80 g/100 g; SC-CO<sub>2</sub>, 0,09 g/100 g), Santhica 27 presenta il CBD solo in tracce.

In Santhica 27, invece, il CBG risulta il fitocannabinoide maggiormente presente sia negli estratti con Soxhlet (2,31 g/100 g) che SC-CO<sub>2</sub> (1,68 g/100 g) rispetto a tutte le altre cultivar, dove è presente solo in tracce.

Comparando l'analisi quantitativa dei principali fitocannabinoidi in tutte le cultivar, l'estrazione con Soxhlet sembra essere più efficiente rispetto alla SC-CO<sub>2</sub>. Tuttavia l'analisi statistica non evidenzia differenze significative tra i due metodi estrattivi.

## ***6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI***

Dopo un lungo periodo di oblio, negli ultimi anni la coltivazione della canapa industriale sta riscuotendo grande interesse con previsioni di forte crescita sul mercato globale degli oltre 25.000 prodotti attualmente in commercio. Contrariamente alla *Cannabis* medica, il cui contenuto di THC varia dall'1 al 22%, le cultivar industriali sono prive di proprietà psicotrope (THC<0,02%) pur rappresentando una fonte estremamente variegata di molteplici molecole bioattive fitocannabinoidi e terpeniche (Schlutenhofer e Yuan, 2017). Grazie al potenziale utilizzo di tutti gli organi della pianta in diversi ambiti applicativi (Andre et al., 2016), alle modeste esigenze idriche, alla forte adattabilità anche a terreni marginali, la canapa industriale rappresenta un modello di risorsa multiuso, eco-compatibile e altamente sostenibile che tuttavia necessita di una ulteriore valorizzazione soprattutto per quanto riguarda il profilo fitochimico delle diverse varietà liberamente coltivabili. Infatti, la recente rivalutazione degli effetti positivi sulla salute dell'uomo di altri fitocannabinoidi non psicotropi, soprattutto CBDA (fitocannabinoide più diffuso nelle infiorescenze di canapa industriale) e CBD (derivato dalla decarbossilazione del CBDA), ha fatto sì che le infiorescenze delle cultivar industriali, scarsamente utilizzate fino a pochissimi anni fa, venissero considerate con particolare attenzione come fonti di tali molecole e fossero al centro di un inaspettato e consistente business.

Di fatto il CBD presenta una vasta gamma di proprietà farmacologiche (Burstein, 2015) ed determina un importante effetto entourage in quanto è in grado di ridurre gli effetti collaterali del THC (Englund et al., 2012) aumentando la sicurezza degli estratti a base di *Cannabis*. Altro fitocannabinoide non psicotropo di grande interesse presente nelle infiorescenze di canapa industriale è il CBG. Questa molecola si è dimostrata efficace nel determinare effetti benefici in modelli murini di colite e potrebbe passare alla sperimentazione clinica su pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali (Borrelli et al., 2013). Studi in vitro hanno, inoltre, dimostrato una potente attività anti-tumorale (De Petrocellis et al., 2013) e proprietà neuroprotettive (Valdeolivas et al., 2015) del CBG.

Sebbene siano stati condotti diversi studi sul contenuto di cannabinoidi in quelle cultivar di *Cannabis* ad alto contenuto di THC, solo pochi studi hanno posto l'attenzione sulla composizione chimica e farmacologica degli estratti oleo-resinosi di infiorescenze fresche di canapa industriale (Russo, 2011; Gulluni et al., 2018) e ancor meno sulle infiorescenze essiccate che rappresentano, al momento, un prodotto largamente utilizzato per l'estrazione di oli essenziali destinati al mercato delle sigarette elettroniche, per il consumo ludico (marijuana light) e altre applicazioni.

In tale contesto, questo lavoro di ricerca ha permesso di caratterizzare e comparare, tramite un'analisi quali-quantitativa, i profili fitochimici di numerosi composti terpenofenolici in estratti ottenuti da infiorescenze essiccate di quattro cultivar di canapa industriale coltivate in Salento.

Gli estratti sono stati ottenuti con due differenti metodi, uno convenzionale tramite apparato di Soxhlet utilizzando solventi organici e uno mediante un estrattore a fluidi supercritici utilizzando l'anidride carbonica come unico solvente.

Nell'estrazione con il Soxhlet, dopo un'accurata valutazione di diversi solventi apolari (pentano, esano, etere etilico, etere di petrolio, nafta) raccomandati per l'isolamento contemporaneo sia della componente volatile (monoterpeni e sesquiterpeni) che di quella non volatile (cannabinoidi, triterpeni, terpenoidi) (Romano e Hazekamp, 2013), è stato ritenuto opportuno utilizzare una miscela etere di petrolio/etere elico (9:1 v/v) che è risultata essere la più efficace per ottenere le molecole d'interesse in forma altamente concentrata.

A differenza delle estrazioni convenzionali, la SC-CO<sub>2</sub> è una tecnologia *green* che permette di ottenere estratti "*solvent-free*" in forma concentrata (Attard et al., 2015). Questa tecnologia, che risponde ai requisiti imposti dalla normativa per gli usi alimentari, cosmetici e farmaceutici degli estratti, rappresenta una valida alternativa all'uso di solventi organici, potenzialmente tossici per l'uomo e nocivi per l'ambiente, per l'estrazione selettiva del fitocomplesso lipofilo, consentendo una maggiore purezza dell'estratto ottenuto e, in ultima analisi, una riduzione dei costi e dei tempi di lavorazione, evitando di dover procedere a ulteriori fasi di purificazione dell'estratto grezzo. La SC-CO<sub>2</sub>, inoltre presenta il vantaggio, rispetto alla maggior parte dei solventi organici, di non essere infiammabile, di avere scarsa tossicità e di essere facilmente riciclabile e relativamente poco costosa (Machado et al., 2015).

In linea generale, le analisi degli estratti ottenuti sia con il Soxhlet sia con SC-CO<sub>2</sub>, hanno evidenziato una certa similitudine dei profili fitochimici delle cultivar C.S. Carmagnola e Futura 75. La cultivar Fedora 17 ha evidenziato un profilo leggermente differente sia per numero di composti fitochimici che per la loro quantità. Santhica 27 ha evidenziato difformità, mostrando una minore quantità di terpenoidi, monoterpeni e sesquiterpeni, mentre il CBG costituisce il componente maggioritario della cultivar nella classe dei fitocannabinoidi, come confermato anche da Fournier et al. (2011) analizzando infiorescenze di Santhica 27 coltivata in Francia.

Nella classe dei terpeni, in questo lavoro, sono stati riscontrati alcuni dei più comuni composti quali  $\alpha$ -pinene, terpinolene, fenchol,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene, caryophyllene

oxide, generalmente presenti in molte cultivar di *C. sativa* coltivate in California, come riportano Giese et al. (2015).

La componente monoterpica è risultata assente in tutti gli estratti ottenuti con il Soxhlet mentre piccole quantità sono state rilevate solo negli estratti ottenuti con SC-CO<sub>2</sub>, sottolineando l'importanza della tecnica estrattiva nel determinare la composizione chimica del prodotto finale. Ciò è confermato anche da altri studi. Per esempio, Da Porto et al. (2014) hanno evidenziato differenze, particolarmente evidenti nella componente volatile monoterpica, nella composizione degli estratti ottenuti per idrodistillazione o estrazione con SC-CO<sub>2</sub> (10 e 14 MPa) da infiorescenze fresche di canapa industriale della cultivar Felina coltivate in Friuli-Venezia Giulia. L'analisi degli estratti ha rivelato la presenza di  $\alpha$ - e  $\beta$ -pinene, camphene, myrcene, limonene, ocimene ed altri monoterpeni in quantità differenti a seconda del metodo estrattivo utilizzato.

Gli stessi monoterpeni sono stati riscontrati anche in estratti ottenuti per idrodistillazione a partire da infiorescenze fresche di canapa industriale di diverse cultivar monoiche e dioiche coltivate in Centro Italia (Bertoli et al., 2010). Negli estratti ottenuti con SC-CO<sub>2</sub> dalle quattro cultivar studiate, tracce di  $\alpha$ -pinene e terpinolene sono stati riscontrate solo in C.S. Carmagnola e Futura 75, mentre gli isomeri E,E ed E,Z del 2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene e il (-)-borneolo sono presenti in tutte le cultivar analizzate sempre in quantità ridotta. Queste differenze con i dati riportati in letteratura potrebbero essere dovute, almeno in parte, al processo di essiccazione delle infiorescenze che può determinare una considerevole riduzione della componente monoterpica volatile, oltre che al metodo estrattivo (Ross e ElSohly, 1996; Mediavilla e Steinemann, 1997). L'assenza di monoterpeni negli estratti ottenuti con il Soxhlet potrebbe, inoltre, essere dovuta ad un ulteriore impoverimento di tali composti durante la fase di evaporazione del solvente necessaria per purificare l'estratto. L'estrazione con SC-CO<sub>2</sub>, invece, non necessita di fasi di purificazione dell'estratto e permette di controllare rigorosamente tutti i parametri estrattivi migliorando il recupero del fitocomplesso e riducendo il rischio di degradazione anche di quei composti termicamente instabili (Da Porto et al., 2012; Aladić et al., 2014).

$\beta$ -Cariophyllene,  $\alpha$ -humulene e caryophyllene oxide sono i sesquiterpeni maggioritari negli estratti ottenuti con il Soxhlet e con SC-CO<sub>2</sub> dalle infiorescenze essiccate delle cultivar C.S. Carmagnola, Futura 75 e Fedora 17. Simili risultati sono stati ottenuti anche da Da Porto et al. (2014) in estratti ottenuti mediante HS-SPME (micro-estrazione in fase solida, spazio-testa statico) da infiorescenze fresche della cultivar Felina. In questi estratti,  $\beta$ -cariophyllene e  $\alpha$ -humulene si confermavano i sesquiterpeni prevalenti, mentre il caryophyllene oxide risultava

molto meno rappresentato. Queste differenze potrebbero dipendere sia dalle differenti cultivar analizzate, sia dalle diverse modalità di estrazione e di analisi che potrebbero alterare la componente terpenica, anche attraverso processi ossidativi indesiderati.

Tuttavia, come confermato anche da Benelli et al. (2017) utilizzando infiorescenze secche di Futura 75, la frazione dei sesquiterpeni è maggiormente presente rispetto ai monoterpeni.

Nelle tre varietà C.S. Carmagnola, Fedora 17 e Futura 75, il CBD analizzato mediante GC-FID, risulta notevolmente superiore rispetto al THC. Il rapporto CBD:THC, calcolato sulle aree dei rispettivi picchi, risulta infatti compreso tra 17 e 20. Un maggiore contenuto di CBD, rispetto al THC è stato riportato in altre cultivar di canapa industriale (Beniko, Fedora 19, Futura 77) coltivate in Serbia da Sikora et al., (2011). In queste cultivar il rapporto CBD:THC variava in un range compreso tra 2,4 e 10,8, notevolmente più basso da quello riscontrato in questo studio.

Molte delle differenze nella composizione fitochimica riscontrate tra le cultivar analizzate in questo studio e i dati di letteratura, potrebbero dipendere oltre che da differenze genetiche anche da altri fattori come il periodo di raccolta, lo stato del materiale vegetale, condizioni di estrazione, ecc. come sottolineato da molteplici studi (Malingré et al., 1975; Malingré et al., 1973; Novak et al., 2001; Calzolari et al., 2017). Inoltre, le condizioni pedoclimatiche e situazioni di stress possono influenzare in modo significativo il profilo fitochimico degli estratti di canapa (Pavela e Benelli, 2016).

L'analisi GC-FID, tuttavia, non permette una accurata caratterizzazione quali-quantitativa delle forme acide e neutre dei principali fitocannabinoidi senza derivatizzazione del campione. Pertanto gli estratti sono stati sottoposti ad analisi mediante HPLC-UV/DAD. Dalle analisi, negli estratti ottenuti mediante Soxhlet e SC-CO<sub>2</sub>, Fedora 17 ha presentato quantità di CBDA e CBD pari a  $1,1 \pm 0,2$  g/100 g e  $0,4 \pm 0,1$  g/100 g, rispettivamente. Tali valori sono poco inferiori rispetto a quelli riscontrati in C.S. Carmagnola [CBDA ( $2,8 \pm 0,5$  g/100 g) e CBD ( $0,6 \pm 0,2$  g/100 g)] e in Futura 75 [CBDA ( $2,2 \pm 1,3$  g/100 g) e CBD ( $1,1 \pm 0,6$  g/100 g)]. Santhica 27 ha evidenziato solo tracce di CBDA e CBD (entrambi  $<0,01$  g/100 g) confermando, invece, la presenza piuttosto elevata di CBG ( $2,0 \pm 1,1$  g/100 g).

Questi risultati concordano con quanto riportato da Welling et al. (2016), su cultivar industriali, quali Futura 75, Futura 77, Kompoliti, Fedrina 74, coltivate in Europa, in cui CBDA, CBD e CBG, prevalevano rispetto al THC.

Inoltre in questo lavoro sono stati identificati steroli, triterpeni liberi ed esterificati, tra cui  $\beta$ -sitosterolo,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, come riportano anche Gutiérrez e del Río (2005). Questi composti possiedono proprietà anti-batteriche (Ibrahim, 2012) o altre proprietà

farmacologiche, per esempio il  $\beta$ -sitosterolo sembra coinvolto nella soppressione dell'infiammazione cronica legata all'obesità (Kurano et al., 2018).

In conclusione questo lavoro di ricerca conferma che:

- le infiorescenze essiccate di canapa industriale rappresentano una interessante fonte di terpeni e fitocannabinoidi non psicotropi con potenziali usi nel trattamento sintomatico di alcune patologie;
- le quattro cultivar analizzate, presentano differenze nei profili fitochimici di terpeni, fitocannabinoidi e altri terpenoidi;
- C.S. Carmagnola, Fedora 17 e Futura 75, contengono CBD come principale fitocannabinoidi;
- Santhica 27, a differenza, presenta il CBG come fitocomposto maggioritario;
- l'estrazione con solventi sembra dare rese migliori rispetto all'estrazione con SC-CO<sub>2</sub>, che tuttavia permette di ottenere un prodotto di altissima qualità che preserva, almeno in parte, la componente terpenica volatile;

L'ottimizzazione dei metodi di estrazione per l'ottenimento di prodotti sicuri e stabili è un problema sottovalutato ma interessante. Ulteriori indagini sperimentali devono essere perseguite per definire chiaramente le migliori tecniche estrattive di tutti i fitocomposti nelle varie cultivar di *Cannabis sativa* L.

Inoltre, una approfondita conoscenza delle componenti fitochimiche della pianta e dei meccanismi regolatori coinvolti nella sintesi di metaboliti secondari, potrebbe anche consentire attraverso un approccio di bioingegneria genetica, un ulteriore aumento della produzione di cannabinoidi, terpeni o composti fenolici specifici.

Per concludere, numerose aziende già utilizzano le infiorescenze di canapa per la realizzazione di numerosi prodotti: dalle tisane alla birra, dal gelato agli oli essenziali, fino ai già citati estratti di CBD, senza però una approfondita conoscenza delle differenze nei profili fitochimici del materiale vegetale che utilizzano. L'auspicio sarebbe quello di regolamentare l'uso delle infiorescenze di canapa industriale anche attraverso una migliore conoscenza delle differenze nella composizione chimica delle diverse varietà legalmente coltivabili, correlandole al genotipo ma anche all'interazione genotipo-ambiente. Ci si augura infine che tutti i soggetti coinvolti, aziende, Istituti di Ricerca, associazioni di categoria e Ministeri competenti, proseguano con degli sforzi collettivi tesi alla massimizzazione delle opportunità, per tutti coloro che hanno scommesso su questa pianta e sulle sue infinite risorse.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Khan IA, ElSohly MA.** 2015. Minor oxygenated cannabinoids from high potency *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry*. 117: 194–199.
- Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk E, Schibano D, Simsir Y, Navarro P, Etxebarria N, Usobiaga A.** 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *J Nat Prod*. 79: 324–331.
- Aladić K, Jokić S, Moslavac T, Tomas S, Vidović S, Vladić J, Šubarić D.** 2014. Cold pressing and supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Chem Biochem Eng Q*. 28: 481–490.
- Amada N, Yamasaki Y, Williams CM, Whalley BJ.** 2013. Cannabidivarin (CBDV) suppresses pentylenetetrazole (PTZ)-induced increases in epilepsy-related gene expression. *PeerJ*. 1: 214.
- Amaducci S, Scordia D, Liu F, Zhang Q, Guo H, Testa G, Cosentino S.** 2015. Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Ind Crops Prod*. 3: 45–63.
- Andre CM, Hausman JF, Guerriero G.** 2016. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci*. 7: 19.
- Arjmand S, Vaziri Z, Behzadi M, Abbassian H, Stephens GJ, Shabani M.** 2015. Cannabinoids and tremor induced by motor-related disorders: friend or foe? *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 12: 778–787.
- Attard AT, McElroy CR, Rezende CA, Polikarpov I, Clark JH, Hunt AJ.** 2015. Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Ind Crops Prod*. 76: 95–103.
- Bahi A, Al Mansouri S, Al Memari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Ojha S.** 2014.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol Behav*. 135: 119–124.
- Barrett ML, Gordon D, Evans FJ.** 1985. Isolation from *Cannabis sativa* L. of cannflavin-a novel inhibitor of prostaglandin production. *Biochem Pharmacol*. 34: 2019–2024.
- Behrend SW.** 2013. Cannabinoids may be therapeutic in breast cancer. *Oncol Nurs Forum*. 40: 191–192.
- Benelli G, Pavela R, Lupidi G, Nabissi M, Petrelli R, Ngahang Kamte SL, Cappellacci L, Fiorini D, Sut S, Dall'Acqua S, Maggi F.** 2017. The crop-residue of fiber hemp cv. Futura 75: from a waste product to a source of botanical insecticides. *Environ Sci Pollut Res Int*. 1–11.
- Bergamaschi MM, Queiroz RHC, Chagas MHN, De Oliveira DCG, De Martinis BS, Kapczinski F, Quevedo J, Roesler R, Schröder N, Nardi AE, Martín-Santos R, Hallak JEC,**

- Zuardi AW, Crippa JAS.** 2011. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*. 36: 1219–1226.
- Bertoli A, Tozzi S, Pistelli L, Angelini LG.** 2010. Fibre hemp inflorescences: from crop-residues to essential oil production. *Ind Crops Prod*. 32: 329–337.
- Bocsa I, Karus M.** 1998. The cultivation of hemp: botany, varieties, cultivation and harvesting. *Ed. Hemptech*. pp. 184.
- Borrelli F, Fasolino I, Romano B, Capasso R, Maiello F, Coppola D.** 2013. Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*. 85: 1306–1316.
- Borrelli F, Pagano E, Romano B, Panzera S, Maiello F, Coppola D, De Petrocellis L, Buono L, Orlando P, Izzo AA.** 2014. Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a *Cannabis*-derived non-psychotropic cannabinoid. *Carcinogenesis*. 35: 2787–2797.
- Brenneisen R.** 2007. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents. In *Forensic Science and Medicine “Marijuana and the Cannabinoids”*. *Ed. Humana Press*. pp. 17–49.
- Brown DT.** 1998. *Cannabis: the genus Cannabis*. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles. *Ed. Harwood Academic Publishers*. 29–54.
- Burani M, Fabbri F.** 1997. C’era una volta la canapa: immagini e testimonianze. *Ed. Anzola dell’Emilia*. pp. 49.
- Burstein S.** 2015. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorgan Med Chem*. 23: 1377–1385.
- Burstein S, Levin E, Varanelli C.** 1973. Prostaglandins and *Cannabis*-II. Inhibition of biosynthesis by the naturally occurring cannabinoids. *Biochem Pharmacol*. 22: 2905–2910.
- Burstein S, Varanelli C, Slade LT.** 1975. Prostaglandins and *Cannabis*-III. Inhibition of biosynthesis by essential oil components of marihuana. *Biochem Pharmacol*. 24: 1053–1054.
- Calzolari D, Magagnini G, Lucini L, Grassi G, Appendino GB, Amaducci S.** 2017. High added-value compounds from *Cannabis* threshing residues. *Ind Crop Prod*. 108: 558–563.
- Capasso S.** 1994. Canapicoltura e sviluppo dei Comuni atellani. *Ed. Istituto di Studi Atellani*. pp. 206.
- Cassano R, Trombino S, Ferrarelli T, Nicoletta FP, Mauro MV, Giraldi C.** 2013. Hemp fiber (*Cannabis sativa* L.) derivatives with anti-bacterial and chelating properties. *Cellulose*. 20: 547–557.

- Cheng Y, Dong Z, Liu S.** 2014.  $\beta$ -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 mice through CB2 receptor activation and the PPAR $\gamma$  pathway. *Pharmacology*. 94: 1–12.
- Clarke RC.** 1981. Marijuana botany. An advanced study: the propagation and breeding of distinctive *Cannabis*. Ed. Ronin Publishing. pp. 195.
- Cleemput MV, Cattoor K, Bosscher KD, Haegeman G, Keukeleire DD, Heyerick A.** 2009. Hop (*Humulus lupulus*) – derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J Nat Prod*. 72: 1220–1230.
- Crippa JAS, Derenusson GN, Ferrari TB, Wichert-Ana L, Duran FLS, Martin-Santos R, Simões MV, Bhattacharyya S, Fusar-Poli P, Atakan Z, Santos Filho A, Freitas-Ferrari MC, McGuire PK, Zuardi AW, Busatto GF, Hallak JEC.** 2011. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *J Psychopharmacol Oxf Engl*. 25: 121–130.
- Cronquist A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Ed. Columbia University Press. pp. 1262.
- Da Porto C, Decorti D, Tubaro F.** 2012. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Ind Crop Prod*. 36: 401–404.
- Da Porto C, Decorti D, Natolino A.** 2014. Separation of aroma compounds from industrial hemp inflorescences (*Cannabis sativa* L.) by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and on-line fractionation. *Ind Crops Prod*. 58: 99–103.
- De Meijer EPM, Van der Kamp HJ, Van Eeuwijk FA.** 1992. Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica*. 62: 187–200.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Cristino L, Orlando P, Di Marzo V.** 2013. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *Br J Pharmacol*. 168: 79–102.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S.** 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 163: 1479–1494.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC.** 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 34: 605–613.

- Di Marzo V, Piscitelli F.** 2015. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. 12: 692–698.
- ElSohly MA, Slade D.** 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. 78: 539–548.
- Englund AM, Stone J, Morrison PD.** 2012. *Cannabis* in the arm: what can we learn from intravenous cannabinoid studies? *Curr Pharmaceut Des*. 18: 4906–4914.
- Fellermeier M, Zenk M H.** 1998. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett*. 427: 283–285.
- Firenzuoli F, Francesco E, Idalba L.** 2015. *Cannabis*. Erba medica: norme, preparazioni galeniche, attualità e prospettive di cura. Ed. *Edra Masson*. pp. 182.
- Fournier G, Bausset J, Maciuk A, Thouminot C, Beherec O.** 2011. The influence of drying and storage conditions on collected samples of industrial hemp crops to determine regulatory levels of  $\Delta^9$ -THC. *Ann Toxicol Anal*. 23: 101–104.
- Gaoni Y, Mechoulam R.** 1964. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 86: 1646–1647.
- Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM.** 2015. Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in *Cannabis*. *J AOAC Int*. 98: 1503–1522.
- Girgih AT, Udenigwe CC, Aluko RE.** 2013. Reverse-phase HPLC separation of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate produced peptide fractions with enhanced antioxidant capacity. *Plant Foods Hum Nutr*. 68: 39–46.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR.** 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 1071: 10–23.
- Grayson M.** 2015. *Cannabis*: 4 big question. *Nature*. 525.
- Grinspoon L.** 1971. Marijuana reconsidered, 2nd edition. Ed. *Quick American Archives*, Oakland, CA. pp. 443.
- Grotenhermen F, Russo E.** 2002. *Cannabis* and cannabinoids: pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. Ed. *Haworth Press*, Binghamton, NY. pp. 478.
- Grotenhermen F.** 2005. Cannabinoids. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 4: 507–530.
- Guerriero G, Sergeant K, Hausman JF.** 2013. Integrated-omics: a powerful approach to understanding the heterogeneous lignification of fibre crops. *Int J Mol Sci*. 14: 10958–10978.
- Guerriero G, Sergeant K, Hausman JF.** 2014. Wood biosynthesis and typologies: a molecular rhapsody. *Tree Physiol*. 34: 839–855.

- Guerriero G, Hausman JF, Strauss J, Ertan H, Siddiqui KS.** 2015. Deconstructing plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. *Plant Sci.* 234: 180–193.
- Guerriero G, Hausman JF, Strauss J, Ertan H, Siddiqui KS.** 2016. Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Eng Life Sci.* 16: 1–16.
- Gulluni N, Re T, Loiacono I, Lanzo G, Gori L, Macchi C, Epifani F, Bragazzi N, Firenzuoli F.** 2018. Cannabis essential oil: a preliminary study for the evaluation of the brain effects. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018: 11.
- Gutiérrez A, Del Río JC.** 2005. Chemical characterization of pitch deposits produced in the manufacturing of high-quality paper pulps from hemp fibers. *Bioresour Technol.* 96: 1445–1450.
- Haj CG, Sumariwalla PF, Hanuš L, Kogan NM, Yektin Z, Mechoulam R, Feldmann M, Gallily R.** 2015. HU-444, a novel, potent anti-inflammatory, nonpsychotropic cannabinoid. *J Pharmacol Exp Ther.* 355: 66–75.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D.** 1998. Cannabidiol and (-) $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 8268–8273.
- Hao XM, Yang Y, An LX, Wang JM, Han L.** 2014. Study on antibacterial mechanism of hemp fiber. *Adv Mat Res.* 887–888: 610–613.
- Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, Van Dam A, Schneider B, Kayser O.** 2013. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* L. using LC-MS and cryogenic NMR. *Phytochemistry.* 87: 51–59.
- Haustveit G, Wold JK.** 1973. Some carbohydrates of low molecular weight present in *Cannabis sativa* L. *Carbohydr Res.* 29: 325–329.
- Hendriks H, Malingré TM, Batterman S, Bos R.** 1977. Alkanes of the essential oil of *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry.* 16: 719–721.
- Hillig KW, Mahlberg PG.** 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Am J Bot.* 91: 966–975.
- Hillig KW.** 2005. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genet Resour Crop Evol.* 52: 161–180.
- Ibrahim TA.** 2012. Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules.* 17: 11315–11334.
- Iseger TA, Bossong MG.** 2015. Asystematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophr Res.* 162: 153–161.

- Kennedy DO, Dodd FL, Robertson BC, Okello EJ, Reay JL, Scholey AB.** 2011. Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *J Psychopharmacol.* 25: 1088–1100.
- Khan BA, Wang J, Warner P, Wang H.** 2015. Antibacterial properties of hemp hurd powder against *E. coli*. *J Appl Polym Sci.* 132: 41588.
- Klein FK, Henry Rapoport H, Elliott HW.** 1971. *Cannabis* alkaloids. *Nature.* 232: 258–259.
- Komori T, Fujiwara R, Tanida M, Nomura J, Yokoyama MM.** 1995. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunology.* 2: 174–180.
- Kurano M, Hasegawa K, Kunimi M, Hara M, Yatomi Y, Teramoto T, Tsukamoto K.** 2018. Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1863: 191–198.
- Liu RH.** 2013. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr Int Rev J.* 4: 384S–392S.
- Machado BAS, De Abreu Barreto G, Costa AS, Costa SS, Silva RPD, Da Silva DF, Padilha FF.** 2015. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS ONE.* 10: e0134489.
- Mahlberg PG, Kim ES.** 2004. Accumulation of cannabinoids in the secretory cavity of *Cannabis*. *J Ind Hemp.* 9: 15–36.
- Malingré T, Hendriks H, Batterman S, Bos R.** 1973. The presence of cannabinoid components in the essential oil of *Cannabis sativa* L. *Pharm Weekbl.* 108: 549–552.
- Malingré T, Hendriks H, Batterman S, Bos R, Visser J.** 1975. The essential oil of *Cannabis sativa* L. *Planta Med.* 28: 56–61.
- Mandolino G, Carboni A, Forapani S, Faeti V, Ranalli P.** 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor Appl Genet.* 98: 86–92.
- Marsh G.** 2003. Nextstep for automotive materials. *Mater Today.* 6: 36–43.
- McPartland JM, Russo EB.** 2001. *Cannabis* and cannabis extracts: greater than the sum of their parts? *J Cannabis Ther.* 1: 103–132.
- Mechoulam R.** 1989. The alkaloids: chemistry and pharmacology. *Ed. Cordell.* pp. 300.
- Mechoulam R, Parker LA.** 2013. The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol.* 64: 21–47.

- Mediavilla V, Steinemann S.** 1997. Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. *J Int Hemp Assoc.* 4: 80–82.
- Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, Ross SA, Khan IA, ElSohly MA.** 2010. Potency trends of  $\Delta^9$ -THC and other cannabinoids in confiscated *Cannabis* preparations from 1993 to 2008. *J Forensic Sci.* 55: 1209–1217.
- Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deansand SG, Franz C.** 2001. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J.* 16: 259–262.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR.** 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann NY Acad Sci.* 1074: 514–536.
- Orellana-Serradell O, Poblete CE, Sanchez C, Castellón EA, Gallegos I, Huidobro C, Llanos MN, ContrerasHR.** 2015. Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 33: 1599–1608.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G.** 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58: 389–462.
- Pavela R, Benelli G.** 2016. EOs as eco-friendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci.* 21: 1000–1007.
- Perez-Gómez E, Andradas C, Flores JM, Quintanilla M, Paramio JM, Guzmán M, Sánchez C.** 2013. The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas. *Oncogene.* 32: 2534–2542.
- Pertwee RG.** 2006. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol.* 147: 163–171.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA.** 2010. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev.* 62: 588–631.
- Pertwee RG.** 2014. Handbook of cannabis, 1st ed. Handbooks in psychopharmacology. *Ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom; New York, NY.* pp. 784.
- Ramikie TS, Nyilas R, Bluett RJ, Gamble-George JC, Hartley ND, Mackie K, Watanabe M, Katona I, Patel S.** 2014. Multiple mechanistically distinct modes of endocannabinoid mobilization at central amygdala glutamatergic synapses. *Neuron.* 81: 1111–1125.
- Rekand T.** 2014. THC:CBD spray and MS spasticity symptoms: data from latest studies. *Eur Neurol.* 71: 4–9.

- Reynolds JR.** 1890. On the therapeutical uses and toxic effects of *Cannabis indica*. *The Lancet*. 135: 637–638.
- Romano LL, Hazekamp A.** 2013. Cannabis oil: chemical evaluation of an upcoming Cannabis-based medicine cannabinoids. *Cannabinoids*. 1: 1–11.
- Ross SA, ElSohly HN, ElKashoury EA, Mahmoud A, ElSohly MA.** 1996. Fatty acids of Cannabis seeds. *Phytochemical Analysis*. 7: 279–283.
- Ross SA, ElSohly MA.** 1996. The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa*. *J Nat Prod*. 59: 49–51.
- Rothschild M, Bergstrom G, Wangberg S.** 2005. *Cannabis sativa*: volatile compounds from pollen and entire male and female plants of two variants, *Northern Lights* and *Hawaiian Indica*. *Bot J Linn Soc*. 147: 387–397.
- Russo EB.** 2011. Taming THC: potential Cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 163: 1344–1364.
- Sanchez IJF, Verpoorte R.** 2008. Introduction to secondary metabolism in Cannabis. *Phytochem Rev*. 7: 615–639.
- Schluttenhofer C, Yuan L.** 2017. Challenges towards revitalizing hemp: a multifaceted crop. *Trends Plant Sci*. 22: 917–929.
- Schultes RE.** 1970. Random thoughts and queries on the botany of Cannabis, in: The Botany and chemistry of Cannabis. Ed. J. & A. Churchill, London, UK. 11–33.
- Scott KA, Shah S, Dalglish AG, Liu WM.** 2013. Enhancing the activity of cannabidiol and other cannabinoids in vitro through modifications to drug combinations and treatment schedules. *Anticancer Res*. 33: 4373–4380.
- Scott KA, Dalglish AG, Liu WM.** 2014. The combination of cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol enhances the anticancer effects of radiation in an orthotopic murine glioma model. *Mol Cancer Ther*. 13: 2955–2967.
- Singh B, Sharma R.** 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *Biotechnol*. 5: 129–151.
- Sikora V, Berenji J, Latković D.** 2011. Influence of agroclimatic conditions on content of main cannabinoids in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Genetika*. 43: 449–456.
- Sirikantaramas S, Morimoto S, Shoyama Y, Ishikawa Y, Wada Y, Shoyama Y.** 2004. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J Biol Chem*. 279: 39767–39774.

- Small E, Beckstead H, Chan A.** 1975. The evolution of cannabinoid phenotypes in *Cannabis*. *Economic Botany*. 29: 219–232.
- Small E.** 2015. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *Bot Rev*. 81: 189–294.
- Solinas M, Massi P, Cinquina V, Valenti M, Bolognini D, Gariboldi M, Monti E, Rubino T, Parolaro D.** 2013. Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and in U87-MG and T98G glioma cells through a multitarget effect. *PLoS ONE*. 8: e76918.
- Spadaro C.** 2016. Il filo di canapa. L'eco-pianta del futuro. *Ed. Altreconomia*. pp. 127.
- Törjek O, Bucherna N, Kiss E, Homoki H, Finta-Korpelová Z, Bócsa I, Nagy I, Heszky LE.** 2002. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MAD6) in hemp. *Euphytica*. 127: 209–218.
- Tzadok M, Uliel-Siboni S, Linder I, Kramer U, Epstein O, Menascu S, Nissenkorn A, Yosef OB, Hyman E, Granot D, Dor M, Lerman-Sagie T, Ben-Zeev B.** 2016. CBD-enriched medical *Cannabis* for intractable pediatric epilepsy. *Seizure-Eur J Epilepsy*. 35: 41–44.
- Valdeolivas S, Navarrete C, Cantarero I, Bellido ML, Muñoz E, Sagredo O.** 2015. Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice. *Neurotherapeutics*. 12: 185–99.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA.** 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310: 329–332.
- Velasco G, Hernández-Tiedra, S, Dávila D, Lorente M.** 2016. The use of cannabinoids as anticancer agents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 64: 259–266.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G.** 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16: 97–110.
- Welling MT, Liu L, Shapter T, Raymond CA, King JG.** 2016. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. *Euphytica*. 208: 463–475.
- Williamson EM.** 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. 8: 401–409.
- Wright MJ, Vandewater SA, Taffe MA.** 2013. Cannabidiol attenuates deficits of visuospatial associative memory induced by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol*. 170: 1365–1373.

