



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agricoltura, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Qualità delle Estrazioni di Terpeni in Cultivars di *Cannabis sativa L.*

Quality of Terpenes Extraction in Cannabis sativa L. Cultivars

Relatore

Prof. Stefano Bona

Correlatrici

Dott.ssa Maddalena Cappello Fusaro

Dott.ssa Irene Lucchetta

Laureando

Umberto Nordio

Matricola 2024087

Anno accademico 2023-2024

Sommario

Riassunto.....	5
Abstract.....	7
1. Introduzione.....	9
1.1 La regolamentazione del mercato della <i>Cannabis</i> in Europa e in Italia	9
1.2. Tassonomia e cenni botanici.....	10
1.3 Vie metaboliche e biosintesi dei cannabinoidi.....	11
1.4 Vie metaboliche e biosintesi dei terpenoidi	12
1.4.1 Monoterpeni.....	15
1.4.2 Sesquiterpeni.....	16
1.4.3 Diterpeni.....	17
1.4.4 Sesterpeni.....	17
1.4.5 Triterpeni.....	17
1.4.6 Tetraterpeni	18
1.5 Caratterizzazione dei chemiotipi.....	20
1.5.1 Cannabinoidi	20
1.5.2 Terpenoidi	20
1.6 Distillazione in corrente di vapore di olio essenziale (OE) di <i>Cannabis sativa L.</i>	21
2. Scopo della ricerca.....	23
3. Materiali e metodi	24
3.1 Distillazione in corrente di vapore	26
3.2 Estrazione in solvente	28
3.3 Analisi gascromatografiche.....	28
3.4 Analisi statistica	29
4. Risultati	30
4.1 Analisi qualitativa dei terpenoidi	30
4.1.1 Qualità dei monoterpenoidi.....	30
4.1.3 Estrazione di cannabinoidi	32
4.1.4 Qualità degli aldeidi	33
4.1.5 Qualità degli alcoli	34
4.1.6 Qualità dei solfuri.....	35
4.1.7 Qualità dei chetoni	36
4.1.8 Qualità degli esteri	37
4.1.9 Qualità degli idrocarburi aromatici	38
5. Discussione	40

6.	Conclusioni	42
7.	Bibliografia	44

Riassunto

Questa ricerca ha valutato l'efficacia di tre diversi metodi di estrazione (distillazione in corrente di vapore, estrazione in solvente da materiale fresco ed essiccato) sulla componente aromatica di otto cultivar di *Cannabis sativa* L.

I risultati hanno evidenziato differenze significative nella composizione chimica in base al metodo di estrazione utilizzato. L'estrazione in solvente da materiale fresco o essiccato è risultata più efficace per estrarre i cannabinoidi (70-93%), mentre la distillazione ha permesso di ottenere oli essenziali ricchi di monoterpeni (fino al 95%) e sesquiterpeni.

Sono emerse differenze anche tra le diverse varietà analizzate. La CK ha mostrato un'elevata concentrazione di sesquiterpeni, la 800 di alcoli, chetoni e idrocarburi aromatici nell'olio, la 350 di aldeidi.

L'interazione tra varietà e metodo di estrazione è risultata altamente significativa, indicando che la composizione finale dipende da entrambi questi fattori.

La scelta del metodo estrattivo e della varietà di canapa influenza notevolmente il profilo chimico degli estratti, con implicazioni per le loro potenziali applicazioni industriali, alimentari e farmaceutiche.

Abstract

This research evaluated the effectiveness of three different extraction methods (steam distillation, solvent extraction from fresh and dried material) on the aromatic component of eight cultivars of *Cannabis sativa* L.

The results highlighted significant differences in chemical composition based on the extraction method used. Solvent extraction from fresh or dried material was more effective for extracting cannabinoids (70-93%), while distillation made it possible to obtain essential oils rich in monoterpenes (up to 95%) and sesquiterpenes.

Differences also emerged between the different varieties analyzed. The CK cultivar showed a high concentration of sesquiterpenes, the 800 cultivar of alcohols, ketones and aromatic hydrocarbons in the oil, the 350 of aldehydes.

The interaction between variety and extraction method was highly significant, indicating that the final composition depends on both of these factors.

The choice of extraction method and hemp variety significantly influences the chemical profile of the extracts, with implications for their potential in industrial, food and pharmaceutical applications.

1. Introduzione

1.1 La regolamentazione del mercato della *Cannabis* in Europa e in Italia

A livello europeo, le normative sulla cannabis sono frammentate e variano da paese a paese, alcune norme generali guidano le legislazioni nazionali. Tra le convenzioni internazionali annoveriamo la Convenzione Unica sugli Stupefacenti del 1961, questa convenzione delle Nazioni Unite regola l'uso degli stupefacenti a livello globale, includendo la cannabis nella tabella I, dopo una recente rettifica che la inseriva nella tabella IV con sostanze più pericolose. Stabilisce che la *Cannabis* e i suoi derivati sono sostanze psicotrope controllate. Il protocollo del 1972 modifica la Convenzione Unica sugli Stupefacenti del 1961 e introduce normative più severe sul controllo della cannabis. Il Regolamento (CE) n. 1107/2009 e il Regolamento (UE) n. 2283/2015, riguardano la sicurezza dei prodotti agricoli e alimentari che possono includere derivati della cannabis, come l'olio di CBD. Ogni stato membro dell'Unione Europea ha la propria legislazione riguardante la *Cannabis*. Per esempio, i Paesi Bassi hanno una politica di tolleranza nei confronti del possesso di piccole quantità di cannabis per uso personale, anche paesi come la Spagna, la Germania e Malta hanno legalizzato l'uso della cannabis a scopo ricreativo, in diverse forme. Una Direttiva mirata potrebbe rivelarsi utile per garantire maggiore sicurezza e assicurare lo sviluppo delle filiere industriali e la valorizzazione della canapa come *commodities*.

In Italia, la regolamentazione della cannabis è disciplinata principalmente dalle seguenti fonti normative. La legge n. 309/1990 (Testo Unico sulle droghe) ha introdotto una regolamentazione riguardante le sostanze stupefacenti e ha classificato la cannabis come sostanza psicotropa. Stabilisce il regime penale relativo al possesso, produzione e traffico di droghe. La legge 16 maggio 2014 n. 79, inserisce le infiorescenze, le foglie, l'olio e la resina della *Cannabis* nella tabella II della Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. La legge di promozione della filiera canapicola italiana (Legge n. 242/2016), conosciuta volgarmente come "legge sulla cannabis light", ha normato la coltivazione di cannabis con contenuto di THC non superiore allo 0,2%. Regola la produzione e la vendita di cannabis industriale e i suoi derivati. La legge n. 38/2010 riguarda l'uso della cannabis a fini terapeutici. Ha legalizzato l'uso della cannabis medica per pazienti con specifiche patologie e ne regola l'approvvigionamento attraverso le farmacie, stabilendo che può essere prescritta da medici autorizzati. La circolare n. 38/2017 del Ministero della Salute fornisce indicazioni operative per l'uso terapeutico della cannabis, definendo le modalità di approvvigionamento e distribuzione. Nel 2018 è stato siglato un accordo tra diversi enti per la produzione e distribuzione della cannabis a fini medicinali.

La regolamentazione della cannabis in Europa e in Italia continua ad evolversi, con un numero crescente di iniziative legislative e discussioni pubbliche. La diversità delle normative riflette le differenze culturali e sociali tra i vari paesi. A livello europeo, si sta iniziando a considerare l'idea di una maggiore armonizzazione delle leggi, specialmente in relazione agli usi medici, ricreativi e ai prodotti contenenti CBD. In Italia sono necessarie norme per garantire gli investimenti nazionali ed esteri, che non lascino spazio a ideologie, che assicurino una commercializzazione controllata e un reddito agli imprenditori agricoli. Nonostante l'incertezza delle norme, negli ultimi anni l'interesse delle aziende agricole è cresciuto rapidamente, richiedendo ulteriori studi agli istituti di ricerca per aumentare l'efficienza, la sicurezza e la standardizzazione dei processi di produzione e di controllo. La filiera emergente delle infiorescenze, e l'aumento dell'uso della cannabis come medicinale è sostenuto da diversi studi oncologici (Birdsall et al., 2016; Chandra et al., 2017), nel campo della gestione della schizofrenia (Deiana, 2013), dell'epilessia (Maa and Figi, 2014), del dolore cronico (Boehnke et al., 2016; Haüser et al., 2018) e di altre patologie (Campeny et al., 2020; Kosiba et al., 2019; Wilsey et al., 2008; Wilsey et al., 2013).

1.2. Tassonomia e cenni botanici

La classificazione tassonomica del genere *Cannabis* è stata ed è attualmente oggetto di dibattito e ricerca. Il genere *Cannabis*, specie *sativa*, appartiene alla famiglia della Cannabaceae, è caratterizzato da un elevato livello di polimorfismo, da una elevata fertilità intraspecifica e da una impollinazione anemofila (Small, et al. 1976). Osservando la variabilità delle caratteristiche morfologiche delle infiorescenze, delle foglie e l'architettura degli internodi, ed oltre a queste anche il profilo dei cannabinoidi, era comunemente accettata la classificazione in due sottospecie, *subsp. sativa* e *subsp. indica* (Small and Cronquist, 1976; Clarke, 1981). Già nel 1924 era stata riconosciuta la sottospecie *ruderalis*, indipendente dal fotoperiodo per il raggiungimento dell'antesi, viene considerata la specie ancestrale, poiché resistente in areali rigidi, lontani dai siti di coltivazione tradizionale. Nonostante la proposta di ulteriori sottospecie, classificate in base all'origine geografica, da studi recenti è stato convenuto considerare il genere *Cannabis* come genere monospecifico (*C. sativa*), differenziando le cultivar secondo la composizione del profilo dei metaboliti secondari, quali cannabinoidi e terpenoidi (Hazekamp et al., 2016) (Piomelli and Russo, 2016), ipotesi verificata, ma non ancora del tutto chiarita, in seguito ad analisi con il metodo del DNA barcoding (Barcaccia et al., 2020). I cannabinoidi e i terpeni sono prodotti e accumulati nei tricomi glandulari, presenti maggiormente sull'epidermide delle brattee fiorali delle piante femminili (Happyana et al., 2013) (Small and Naraine, 2016).

1.3 Vie metaboliche e biosintesi dei cannabinoidi

La biosintesi dei cannabinoidi è un processo complesso che coinvolge diversi passaggi enzimatici e precursori chimici. I cannabinoidi, come il THC e il CBD, derivano principalmente dal cannabigerolo (CBG). Il precursore metabolico geranil pirofosfato (GPP), è prodotto a partire dagli isomeri isopentenil pirifosfato (IPP) e dimetilallil pirifosfato (DMAPP), che possono derivare da due vie metaboliche:

1. **Via del mevalonato (MVA)**, localizzata nel citoplasma.
2. **Via dell'ossossilulosio (DOX)**, che avviene nei plastidi (Fellermeier et al., 2001)

Il primo passo nella biosintesi dei cannabinoidi è la condensazione del geranilpirifosfato (GPP) con l'acido olivetolico (OA). Questa reazione è catalizzata dall'enzima olivetolate geranyltransferase (GOT) (Fellermeier and Zenk, 1998) (Fellermeier et al., 2001). Il prodotto di questa reazione è il cannabigerolo acido (CBGA), considerato il precursore di tutti i cannabinoidi con catene laterali pentiliche. Il CBGA può poi essere convertito in vari cannabinoidi attraverso reazioni catalizzate da specifici enzimi. I principali enzimi coinvolti in questa fase includono:

- **THC sintasi** per la produzione di tetraidrocannabinolo acido (THCA)(Taura et al., 1995).
- **CBD sintasi** per la formazione di cannabidiolo acido (CBDA)(Taura et al., 1996).
- **CBC sintasi** per la produzione di cannabichromene acido (CBCA)(Morimoto et al., 1998).

Questi enzimi agiscono su omologhi del CBGA, differenziandosi in base alla lunghezza della catena laterale alchilica (Shoyama et al., 1984).

I cannabinoidi vengono biosintetizzati in cellule specializzate nei tricomi ghiandolari, dove vengono accumulati nella cavità secretoria e possono essere rilasciati come resina (Mahlberg and Kim, 2004) o secreti direttamente dagli enzimi (Sirikantaramas et al., 2005). Le differenze nel rapporto e nella quantità di questi composti sono indicative del fenotipo chimico (chemiotipo) della pianta (Small and Beckstead, 1973). Vari fattori ambientali influenzano il contenuto di cannabinoidi nelle piante. Ad esempio, un'estate fresca e umida può ridurre il contenuto di cannabinoidi (Latta and Eaton, 1975), mentre condizioni secche e ventose tendono ad aumentarlo. La produzione totale di cannabinoidi è quindi fortemente influenzata dalle condizioni ambientali (Mandolino et al., 2003). La biosintesi dei cannabinoidi è un processo complesso, influenzato da una serie di fattori genetici e ambientali. La comprensione di queste vie biosintetiche è cruciale per ottimizzare la produzione di cannabinoidi per scopi terapeutici e industriali.

1.4 Vie metaboliche e biosintesi dei terpenoidi

I lipidi costituiscono gli elementi fondamentali delle membrane cellulari, principalmente composte da acidi grassi. Tuttavia, esistono altre classi lipidiche prive di acidi grassi, tra cui i terpenoidi, che sono particolarmente significativi e vari. Questa categoria di composti è presente in tutte le piante e si forma attraverso due principali percorsi biosintetici: la via dell'acido mevalonico e quella del piruvato/gliceraldeide 3-fosfato. Entrambi i percorsi producono i precursori fondamentali isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilallil pirofosfato (DMAPP). Questi sono composti da cinque atomi di carbonio, e si definiscono isoprenoidi o unità isopreniche, e costituiscono la base per la creazione di molecole sempre più complesse, caratterizzate da un numero di atomi di carbonio multiplo di cinque (Maffei, 1999).

- **Via del mevalonato (MVA):** Questo percorso si svolge nel citoplasma e porta alla formazione di isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilallil pirofosfato (DMAPP) a partire dall' Acetil-CoA (McGarvey and Croteau, 1995) (Fig. 1).
- **Via del metil-erythritol 4-fosfato (MEP):** Questa via si verifica nei plastidi e porta anch'essa alla sintesi di IPP e DMAPP, utilizzando precursori come il gliceraldeide-3-fosfato e il piruvato (Lichtenthaler, 1999) (Fig. 2).

Gli isoprenoidi (IPP e DMAPP) possono essere condensati in diverse configurazioni per formare terpenoidi di varie dimensioni. Per esempio, la condensazione di cinque unità di isoprene porta alla formazione di geranyl pirofosfato (GPP), che è un precursore comune per molti terpeni. Gli enzimi terpenoidi sintasi catalizzano queste reazioni di condensazione, trasformando GPP in terpenoidi come il mircene, il limonene, il pinene e altri (Maffei, 1999). Dopo la sintesi iniziale, i terpenoidi possono subire ulteriori reazioni, come ossidazioni, riduzioni e reazioni di coniugazione. Queste reazioni sono catalizzate da enzimi come le ciclastasi, le ossidasi e le transferasi (Bohlmann et al., 1998). Una comprensione approfondita di questi percorsi biosintetici e dei fattori che ne influenzano il flusso è cruciale per comprendere il ruolo dei terpenoidi nelle interazioni pianta-ambiente e l'ingegneria metabolica per la produzione di terpenoidi. Nei prossimi paragrafi, verranno esplorati gli aspetti legati alle vie metaboliche dei terpenoidi, evidenziando l'importanza della regolazione di questi percorsi biosintetici interconnessi.

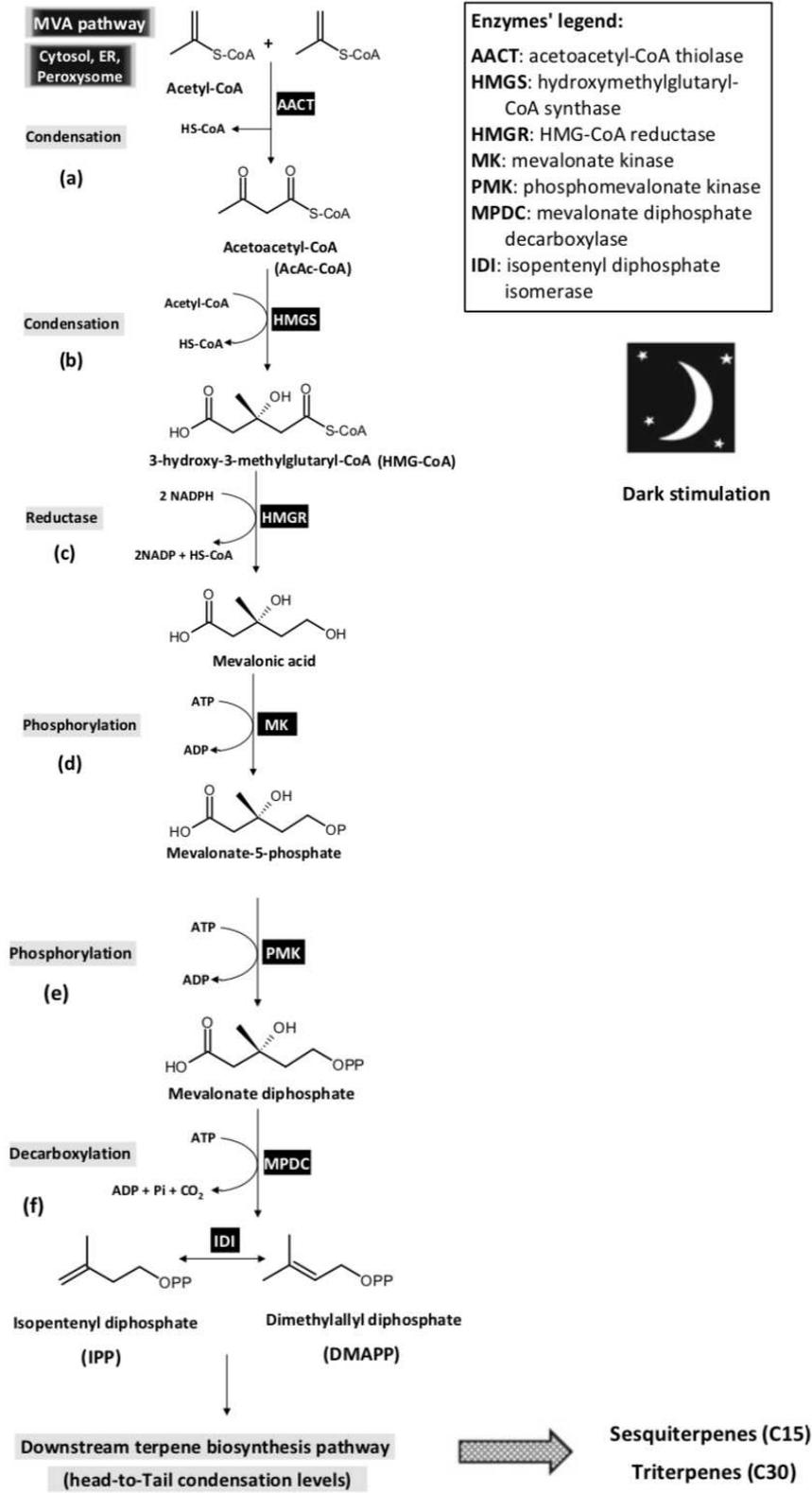
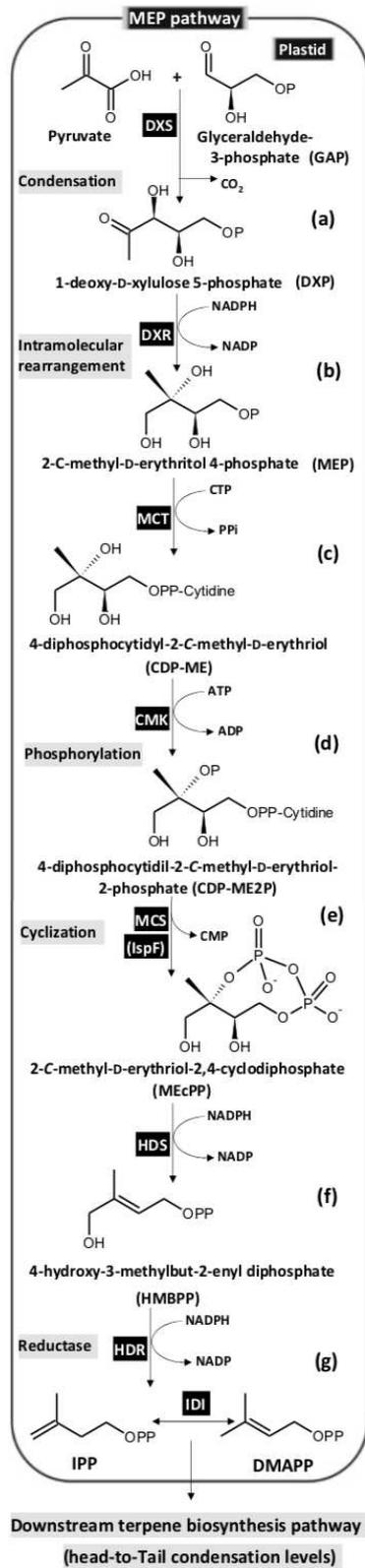


Figura 1 - Via metabolica del mevalonato (MVA) che avviene nel citoplasma, costituisce gli scheletri dei precursori per la biosintesi dei terpenoidi (IPP e DMAPP) (Nabil, 2024).



Enzymes' legend:

DXS: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate
DXR: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
MCT: 4-diphosphocytidil-2-C-methyl-D-erythritol synthase
CMK: 4-diphosphocytidil-2-C-methyl-D-erythritol kinase
MDS: 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase
HDS: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase
HDR: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase



Light stimulation

Monoterpenes (C10)
 Diterpenes (C20)
 Tetraterpenes (C40)

Figura 2 - Via metabolica del metil-erythritol 4-fosfato (MEP) che avviene nei plastidi, porta anch'essa dopo varie catalizzazioni alla produzione di IPP e DMAPP (Nabil, 2024).

1.4.1 Monoterpeni

I monoterpeni si originano dalla condensazione di due unità isopreniche, l'IPP e il dimetilallil pirofosfato (DMAPP). L'IPP si forma tramite la condensazione di tre molecole di acetato nella via biosintetica che prende il nome dell'acido mevalonico. Da questa via metabolica sono prodotte e riconosciute più di mille molecole, la produzione annuale di isoprene e di monoterpeni emessi nell'atmosfera dagli organismi vegetali, è stimato in 450 milioni di tonnellate all'anno, di cui il 25 % composto da monoterpeni ossigenati. Gli isoprenoidi in particolare contribuiscono significativamente ad incrementare la concentrazione di ozono nella troposfera. La condensazione dell'IPP con il DMAPP forma il precursore di tutti i monoterpeni, il geranyl pirofosfato (GPP) (Maffei, 1999). I monoterpeni hanno strutture acicliche, cicliche e bicicliche. Gli enzimi definiti ciclasi, portano alla ciclizzazione del GPP per formare vari scheletri monoterpenici: mentani, pinani, canfani, carani, fenciani, tujani, iridani, piretrine e cannabinoli. Il monoterpene più studiato è sicuramente il mentolo, citiamo fra questi anche le piretrine per via della potente azione insetticida. (Maffei, 1999). Il limonene, monoterpene monociclico, è sempre presente ed è distintivo del profilo dello spazio di testa dell'OE di Cannabis (Rice and Koziel, 2015). La frazione di monoterpeni nell'OE della canapa è caratterizzata principalmente dalla presenza di limonene, β -myrcene, α -pinene e terpinolene (Fiorini, 2019).

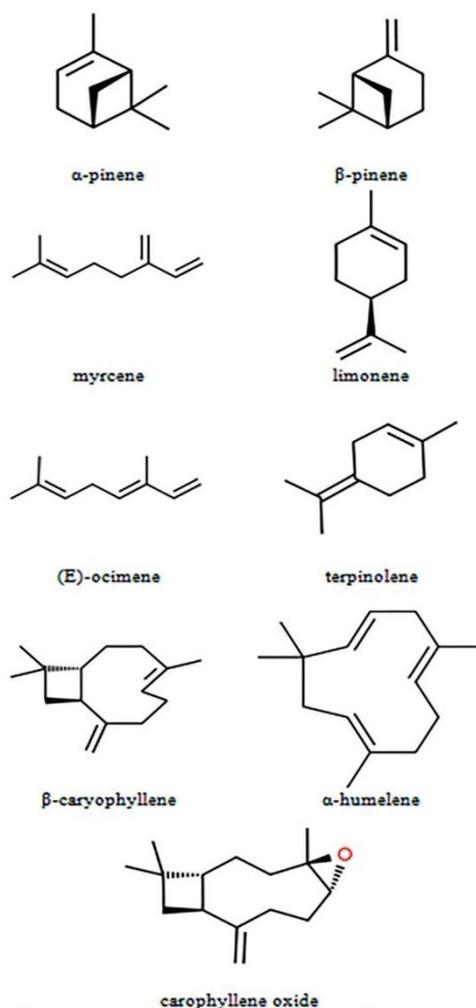


Figura 3 - Struttura chimica dei terpeni principali nell'Olio Essenziale della canapa (Rodriguez et al., 2023).

1.4.2 Sesquiterpeni

La condensazione del GPP con una molecola di IPP forma il precursore dei sesquiterpeni (C15), il farnesil pirofosfato (FPP), la struttura degli atomi di carbonio a catena più lunga, il maggior numero di doppi legami e le maggiori possibilità di ciclizzazioni, comportano una produzione di più di sette mila differenti strutture molecolari. Alcune delle classi più importanti sono: farnesani, humbertiani, bisabolani, sesquicanfani, cariofillani, humulani, cedrani, eudesmani, cuparani, clovani (Maffei, 1999). L'enzima Terpene Sintasi (TPS) seguito da enzimi ciclasi, sfrutta i cationi disponibili come substrato per la produzione di una grande varietà di sesquiterpeni (Nabil, 2024). In generale, nell'OE della *Cannabis*, i sesquiterpeni idrocarburi sono più abbondanti dei sesquiterpeni ossigenati, con il β-caryophyllene come composto predominante, seguito dal α-humulene. Il caryophyllene ossido è presente in percentuali inferiori ma comunque significative (Valtcho et al., 2020). Dei derivati importanti sono i sesquiterpeni lattoni, sono molecole prevalentemente dal gusto amaro, evitate dai

fitofagi ma non dall'uomo, che ne apprezza il gusto nelle bevande a base di erbe definiti appunto "amari" (Maffei, 1999).

1.4.3 Diterpeni

I diterpeni sono prevalentemente composti non volatili, presenti nel lattice e nella resina delle piante. Sono maggiormente presenti nelle resine delle Gimnosperme, nelle Euphorbiaceae e nelle Lamiaceae (Holopainen et al., 2013). Si formano dalla condensazione del FPP con una molecola di IPP, producendo geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) con uno scheletro a 20 atomi di carbonio. Fra le strutture tetracicliche, è incluso l' *ent*-kaurene che è precursore dell'acido gibberellico. La maggior parte dei diterpeni sono sempre ciclizzati, con strutture bicicliche (labdani e clerodani), tricicliche (pimarani e abietani), tetracicliche (kaurani, beyerani, gibberellani, stemarani, afidicolani) e macrocicliche (cembrani, dafnani e taxani). Uno dei composti più diffusi è comunque l'aciclico fitolo, che costituisce la parte lipofila della clorofilla, un altro residuo diterpenico è presente nella vitamina K1 (Maffei, 1999).

1.4.4 Sesterpeni

Il precursore dei sesterpeni (C25) è il geranylarnesil pirofosfato (GFPP), sintetizzato dalla condensazione di una molecola di GGPP con una di IPP. Sono molecole presenti soprattutto nei funghi e in organismi marini; l'ofiobolina A, un composto bioattivo contro funghi, batteri e nematodi, viene prodotta a partire dalla ciclizzazione del GFPP (Maffei, 1999).

1.4.5 Triterpeni

I triterpeni (C30) derivano dalla via dell'acido mevalonico (MVA), si formano dall'unione di due molecole di FPP definendo una struttura a 30 atomi di carbonio definita squalene (Nabil, 2024). La ciclizzazione dello squalene forma un ossido, che con una serie di ciclizzazioni, portano alla produzione di molecole bioattive triterpeniche come i fitosteroli, le saponine e i triterpenoidi modificati come i limonoidi. I semi dell'*Azadirachta indica* producono uno dei limonoidi più complessi, l'azadiractina, che inibisce il senso di fame negli insetti. (Maffei, 1999) Le saponine vengono prodotte dopo la formazione di agliconi idrofobici, questi triterpeni vengono glicosilati a diversi livelli e con diversi legami carbonio, definendone la bio attività (Fuchs et al., 2017).

1.4.6 Tetraterpeni

La condensazione di due molecole di geranilgeranil pirofosfato (GGPP) costituisce il fitoene, formato da 8 unità isopreniche in una struttura a catena (Britton et al., 1998) (Britton et al., 2008). Diversi processi metabolici (desaturazioni, ciclizzazioni, ossigenazioni) (Nabil, 2024) contribuiscono alla diversificazione strutturale e alla formazione di intermedi metabolici via via sempre più insaturi fino alla struttura del licopene. La ciclizzazione di questa molecola forma il β -carotene, che in seguito ad una ossidrilazione produce zeaxantina (Maffei, 1999). I tetraterpeni sono essenzialmente i pigmenti delle piante chiamati comunemente carotenoidi, e si suddividono in caroteni e xantofille. La localizzazione dei doppi legami e la diversità di enzimi coinvolti influiscono sulla struttura dei caroteni variandone la pigmentazione dall'arancione, al giallo, al rosso del licopene. Le xantofille giocano un ruolo importante nella gestione dello stress luminoso (eccesso o deficit), l'eccesso viene dissipato via depossidazione per proteggere il sistema fotosintetico dallo stress ossidativo (Della Penna and Pogson, 2006) (Tanaka, 2008).

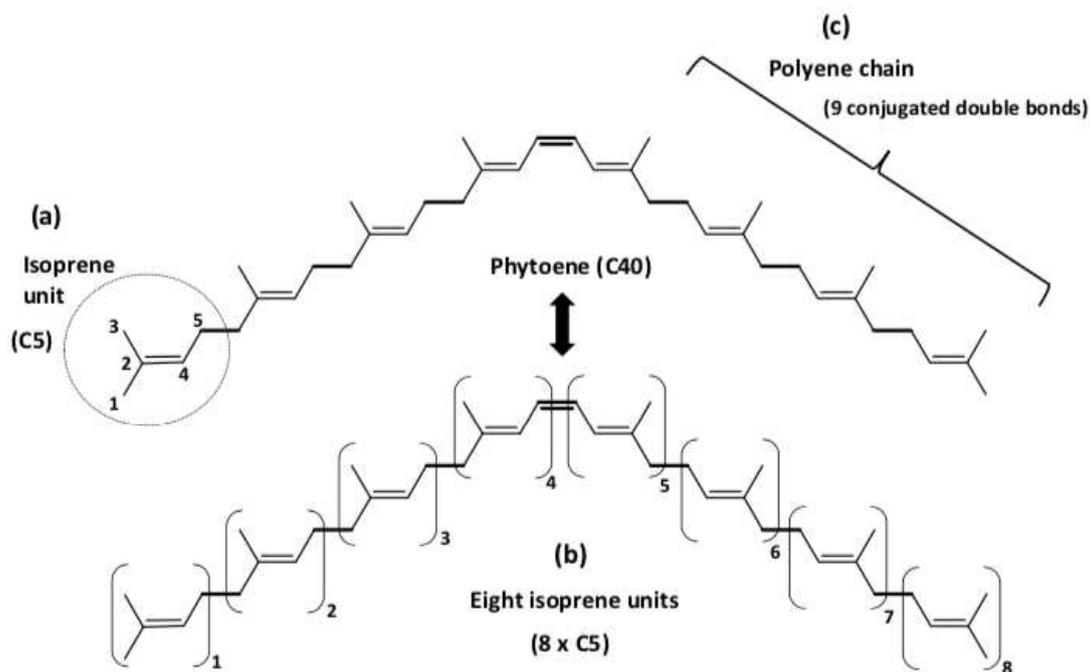


Figura 4 - Illustrazione della struttura tetraterpenica (C₄₀) del fitoene con 8 unità isopreniche (C₅) (Nabil, 2024).

1.4.7 Politerpeni

I politerpeni sono polimeri formati dalla ripetizione di un numero importante di unità isopreniche, la gomma e la guttaperca sono le molecole più studiate all'interno di questa classe.

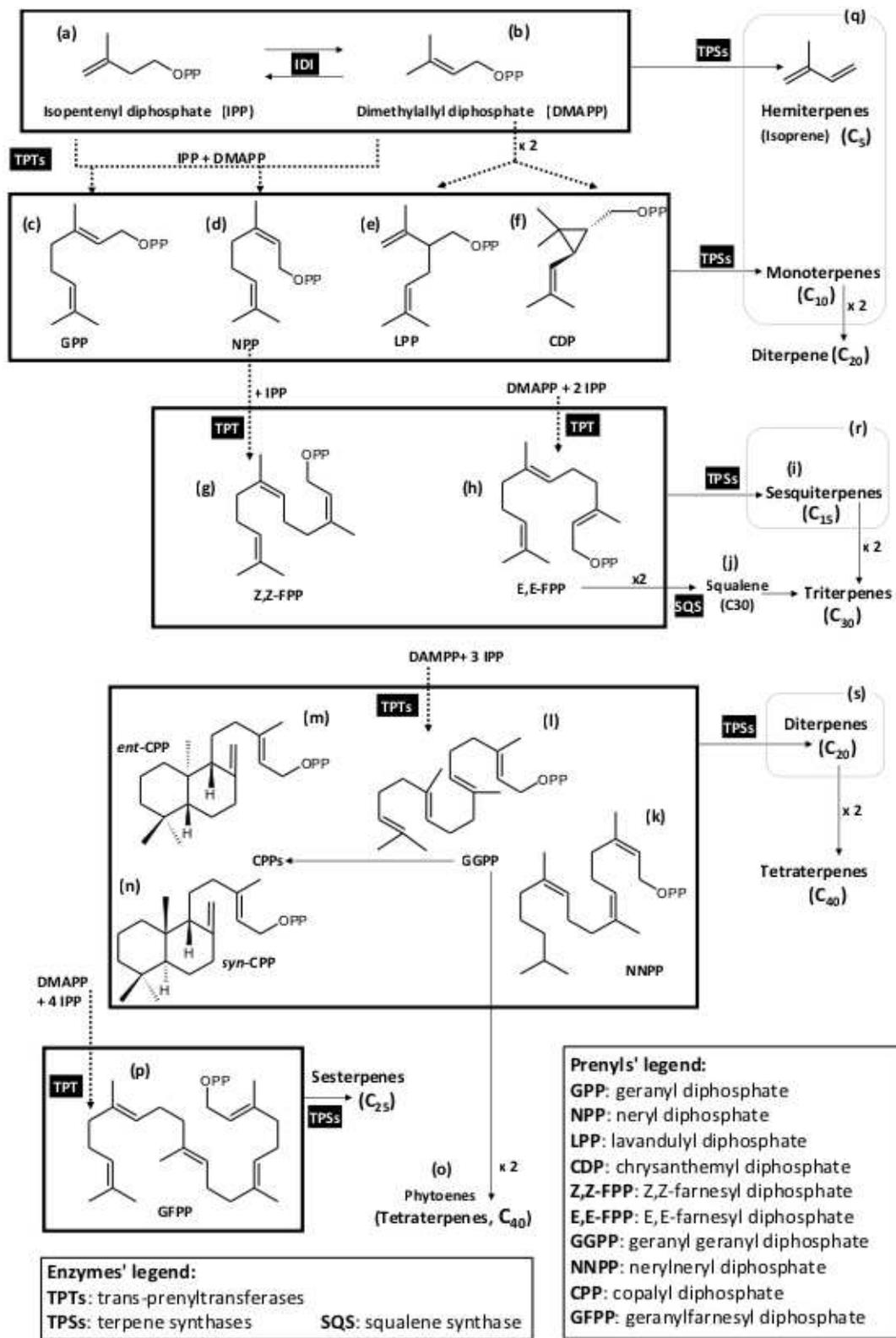


Figura 5 - Sequenza delle prenilazioni basate sul processo di condensazione coda-testa che porta alla formazione di vari precursori di diverse famiglie di terpeni (emiterpeni C₅, monoterpeni C₁₀, sesquiterpeni C₁₅, diterpeni C₂₀, sesterpeni C₂₅, triterpeni C₃₀, , tetraterpeni C₄₀). (Nabil, 2024)

Come illustrato dettagliatamente in questo capitolo, le vie biosintetiche dei terpenoidi, come la via del mevalonato e la via del metil-eritritolo fosfato, sono responsabili della produzione di una vasta gamma di molecole terpeniche, dalle piccole unità isopreniche ai terpeni di maggiori dimensioni. Queste vie metaboliche sono strettamente interconnesse e le concentrazioni dei diversi intermedi e prodotti finali dipendono dalle complesse regolazioni e interazioni enzimatiche coinvolte.

1.5 Caratterizzazione dei chemiotipi

1.5.1 Cannabinoidi

Visto il crescente interesse nella selezione e nel miglioramento genetico di cultivar di *Cannabis* caratterizzate da livelli controllati di metaboliti secondari di interesse industriale, alimentare e farmaceutico, quali cannabinoidi e terpeni, una comprensione approfondita delle vie biosintetiche interconnesse di questi composti è cruciale. Nel 1971 venne proposta una prima classificazione di fenotipi chimici in base al rapporto $([THC]+[CBN])/[CBD]$ (Fetterman et al., 1971). Successivamente sono stati identificati cinque principali fenotipi chimici, detti chemiotipi, basati sui livelli di THC, CBD, CBG e altri cannabinoidi (de Meijer et al., 1992; Fournier et al., 1987; Mandolino and Carboni, 2004; de Meijer, 2014). La regolazione e l'ottimizzazione di questi percorsi metabolici interconnessi è fondamentale per lo sviluppo di cultivar con i profili chimici desiderati (Wenger et al., 2020). Studi hanno esaminato le variazioni nei profili di cannabinoidi e terpeni durante la crescita di diverse cultivar appartenenti a diversi chemiotipi (Aizpurua-Olaizola et al., 2016), e sono stati identificati enzimi terpeno sintasi coinvolti nella biosintesi dei terpeni in *Cannabis sativa* (Booth et al., 2017).

1.5.2 Terpenoidi

Negli stati con una regolamentazione chiara e legale del mercato della *Cannabis sativa*, è emersa la necessità di una classificazione oggettiva, mirata a descrivere le variazioni chimiche fra le cultivars, l'aroma e il bouquet sono dei caratteri distintivi. Fishedick J.T. dopo aver rilevato i dati quantitativi del contenuto dei terpenoidi di 233 campioni di 30 varietà, ha proposto un approccio di classificazione basato sul profilo terpenico, distinguendo 5 gruppi maggiori (mircene, terpinolene, Og Kush, cariofillene, bisabolol), e suddivisi in 13 classi con diversi rapporti e diverse combinazioni (Cookie, Og Kush/Limonene, Og Kush, Purple, Terpinolene). Queste informazioni sono molto utili per i medici e i ricercatori clinici, che studiano e approfondiscono gli effetti terapeutici di determinate molecole con effetti di entourage con i cannabinoidi (Fishedick, 2017).

1.6 Distillazione in corrente di vapore di olio essenziale (OE) di *Cannabis sativa L.*

Per la produzione di OE solitamente vengono impiegate infiorescenze fresche o secche. Nelle cultivar monoiche, il contenuto in olio essenziale varia dal 0,01% al 0,60 %, nelle cultivar dioiche dal 0,03 % al 0,26 %, il valore maggiore registrato è dello 0,60 %, estratto con l'idrodistillazione (Abdollahi et al., 2020). Questi parametri sono generici e sono fortemente influenzati da fattori genetici, fattori ambientali, tecniche colturali, epoca di raccolta e stoccaggio. I monoterpeni, i sesquiterpeni e i cannabinoidi sono le molecole più studiate all'interno dell'olio essenziale della canapa. L'idrodistillazione e la distillazione in corrente di vapore, sono le tecniche più popolari per l'estrazione degli oli essenziali dalle piante. Questo metodo è stato sviluppato per abbassare il punto di evaporazione delle molecole estratte in pressione di corrente di vapore (Nitsche et al., 2017). La corrente di vapore passa attraverso la biomassa all'interno del fusto di distillazione a una temperatura dai 100 °C ai 110 °C, i soluti e l'idrolato vengono quindi condensati da un condensatore ad acqua, separati all'interno della buretta sempre raffreddata ad acqua, dove la fase più alta è l'olio essenziale e la fase più bassa è l'acqua aromatica (Chemat and Strube, 2015). La tipologia di distillazione influisce significativamente nella selettività delle molecole estraibili.

2. Scopo della ricerca

L'obiettivo di questa ricerca è stato valutare l'efficienza e la qualità di tre diversi metodi di estrazione della componente aromatica di nove diverse cultivar di *Cannabis sativa* L., coltivate nell'estate del 2024 nelle province di Rovigo e Verona, in Italia. In particolare, sono stati confrontati il profilo aromatico della componente volatile ottenuta tramite distillazione in corrente di vapore, con la componente derivata da estrazioni in solvente effettuate su infiorescenze fresche ed essiccate. L'analisi si è concentrata sulle differenze delle diverse classi di terpeni, fondamentali per la valutazione organolettica e per gli impieghi galenici. I dati raccolti sono stati elaborati tramite ANOVA e analisi delle componenti principali (PCA) per identificare le differenze significative tra le cultivar e i metodi di estrazione.

3. Materiali e metodi

Per questa prova sperimentale sono state utilizzate otto diverse cultivar di *Cannabis sativa* L., coltivate in pieno campo ad Ariano (RO), con una di queste coltivata anche nella provincia di Verona. Su tutte le varietà sono state condotte tre tipologie di estrazione: distillazione in corrente di vapore delle infiorescenze fresche, estrazione in solvente da materiale fresco e la stessa estrazione da materiale essiccato. Per ogni estrazione sono state effettuate tre repliche, ottenendo un disegno sperimentale con 8 varietà x 3 tipologie di estrazione x 3 repliche, per un totale di 72 unità sperimentali, come riportato in tabella 1.

Tabella 1 - Elenco delle tesi confrontate.

Varietà	Codice varietà	Tipologia di prodotto	Tipologia di estrazione	Prodotto finale	Codice trattamento	Repl che
350	A	Fresco	Solvente	Estratto	A_Fresco_Sol v	3
350	A	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	A_Fresco_Dist	3
350	A	Secco	Solvente	Estratto	A_Secco_Solv	3
800	B	Fresco	Solvente	Estratto	B_Fresco_Solv	3
800	B	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	B_Fresco_Dist	3
800	B	Secco	Solvente	Estratto	B_Secco_Solv	3
911C	C	Fresco	Solvente	Estratto	C_Fresco_Solv	3
911C	C	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	C_Fresco_Dist	3
911C	C	Secco	Solvente	Estratto	C_Secco_Solv	3

CK	D	Fresco	Solvente	Estratto	D_Fresco_Solv v	3
CK	D	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	D_Fresco_Dist	3
CK	D	Secco	Solvente	Estratto	D_Secco_Solv	3
Sour diesel	E	Fresco	Solvente	Estratto	E_Fresco_Solv	3
Sour diesel	E	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	E_Fresco_Dist	3
Sour diesel	E	Secco	Solvente	Estratto	E_Secco_Solv	3
911	F	Fresco	Solvente	Estratto	F_Fresco_Solv	3
911	F	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	F_Fresco_Dist	3
911	F	Secco	Solvente	Estratto	F_Secco_Solv	3
Amnesia	G	Fresco	Solvente	Estratto	G_Fresco_Solv v	3
Amnesia	G	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	G_Fresco_Dist	3
Amnesia	G	Secco	Solvente	Estratto	G_Secco_Solv	3
550	J	Fresco	Solvente	Estratto	J_Fresco_Solv	3
550	J	Fresco	Distillazione	Olio essenziale	J_Fresco_Dist	3

550	J	Secco	Solvente	Estratto	J_Secco_Solv	3
-----	---	-------	----------	----------	--------------	---

3.1 Distillazione in corrente di vapore

Per condurre le varie prove di distillazione è stato utilizzato un distillatore Albrigi (Stallavena di Grezzana-Verona, Italy) con capacità di 20 L (Figura 6), per estrarre l'olio essenziale dalla parte aerea (fiori e foglie) di otto cultivar a chemiotipo CBD prevalente, e una cultivar a chemiotipo CBG prevalente. Per ciascuna prova sono stati utilizzati 4 kg di infiorescenze e foglie apicali fresche, raccolte il giorno precedente e conservate in cella refrigerata a 4°C. La matrice vegetale è stata dunque lavorata velocemente, composta principalmente da infiorescenze e foglie apicali separate meccanicamente dai rami utilizzando dei destimmatori a rulli. Il fusto di cottura, caricato con 2 litri di acqua, tiene separato il materiale vegetale grazie ad una piastra forata, questa consente al vapore di attraversare facilmente la matrice fresca compattata con uniformità all'interno del fusto. Al raggiungimento della temperatura di 50°C si attiva il flusso idrico continuo che raffredda la buretta separatrice e il condensatore. L'estrazione inizia quando la temperatura di esercizio arriva a 100°C, questa viene mantenuta costante per la durata totale di 60 minuti. Per aumentare l'efficienza dell'estrazione, il sistema era dotato di un tubo di cobazione in modo da garantire che l'idrolato condensato e separato, venga recuperato nel fusto di distillazione. Le prove sono state ripetute in tre repliche per ogni varietà.



Figura 6 - In primo piano il distillatore impiegato per l'estrazione di olio essenziale.



Figura 7 - Matrice vegetale (fiori e foglie apicali) impiegata per l'estrazione di olio essenziale

3.2 Estrazione in solvente

Per quanto riguarda l'estrazione delle infiorescenze fresche, queste sono state raccolte, conservate in cella refrigerata a -80°C fino al momento dell'estrazione.

Per l'estrazione delle infiorescenze secche, il materiale è stato raccolto ed essiccato in ambiente controllato, al buio con una temperatura media di 30°C e una umidità relativa del 50%, per un tempo di 10 giorni circa, finché l'umidità delle infiorescenze non è risultata al di sotto del 10%.

L'estrazione in solvente è stata performata partendo da 2 g di materiale vegetale macinato, in seguito trasferito in 20 ml di soluzione di diclorometano (CD_2Cl_2) di qualità analitica e miscelato per una durata di trenta minuti. Esclusivamente per il prodotto fresco, prima della fase di miscelazione, è stata effettuata una sonicazione di 10 minuti a temperatura ambiente iniziale.

3.3 Analisi gascromatografiche

La composizione chimica di tutti i campioni è stata analizzata utilizzando un sistema di gascromatografia (GC 7890B), dotato di una colonna Agilent J&W DB-5MS della lunghezza di 60 m o 30 m, con diametro interno di $320\ \mu\text{m}$ e spessore del film di $0,50\ \mu\text{m}$. La fase mobile utilizzata è stata l'elio, che ha trasportato i metaboliti attraverso la colonna cromatografica contenente una fase stazionaria.

La gascromatografia (GC) è una tecnica che consente la separazione dei composti volatili presenti nei campioni. Il rivelatore posto all'uscita della colonna registra il passaggio dei composti separati, producendo un gas-cromatogramma, fondamentale per analisi sia qualitative che quantitative.

In questo studio è stata adottata la tecnica della cromatografia gas-solido (GSC), in cui la fase stazionaria è composta da particelle solide porose e la separazione avviene tramite un processo di adsorbimento. Come alternativa, si sarebbe potuta utilizzare la cromatografia gas-liquido (GLC), che impiega una fase stazionaria liquida e sfrutta il meccanismo di separazione per ripartizione.

I cromatogrammi generati per ciascun campione sono stati visualizzati ed elaborati utilizzando il software VUVision Data Analysis di VUV Analytics. Ogni cromatogramma fornisce una rappresentazione bidimensionale dei componenti rilevati, con il tempo di ritenzione (RT) sull'asse x e la concentrazione sull'asse y. L'area di ciascun picco rappresenta la concentrazione della molecola corrispondente nel campione. Successivamente, il software confronta l'assorbimento della sostanza rilevata con i dati spettrali presenti nella libreria, permettendo così l'identificazione delle molecole.

Per l'analisi gascromatografica degli oli essenziali, i campioni sono stati diluiti in esano con un rapporto di concentrazione di 1:10.

3.4 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software R Studio. Per verificare la presenza di differenze significative tra le diverse tesi, sono stati applicati i seguenti test:

- **Analisi della Varianza (ANOVA):** Questo test è stato utilizzato per confrontare le medie dei diversi fattori considerati, al fine di individuare eventuali differenze statisticamente significative.
- **Test di Confronto Multiplo di Tukey (Tukey's HSD):** Successivamente all'ANOVA, è stato applicato il test post-hoc di Tukey per determinare quali specifiche coppie di fattori mostrassero differenze significative.

Questi strumenti statistici hanno consentito di analizzare in modo accurato le differenze tra i fattori studiati, offrendo una base solida per le conclusioni del lavoro.

4. Risultati

4.1 Analisi qualitativa dei terpenoidi

I risultati delle analisi gascromatografiche hanno permesso l'identificazione di più di 100 molecole e sono riportati nei seguenti grafici raggruppati per classe di composti: monoterpenoidi, sesquiterpenoidi, cannabinoidi, idrocarburi aromatici, alcoli, chetoni, solfuri, esteri e aldeidi. I dati sono espressi in termini percentuali peso su peso (% p/p) ed è stata valutata la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) fra le varietà e i metodi di estrazione.

4.1.1 Qualità dei monoterpenoidi

La frazione dei monoterpeni caratterizza in maniera preponderante la qualità degli estratti di olio essenziale, con concentrazioni dal 90 al 95% nella varietà 911C (C) coltivata in provincia di Verona, dal 88 al 91% nella varietà 911 (F) coltivata in Ariano Polesine. La varietà CK (D) si distingue per un contenuto di monoterpeni dal 56 al 66%, da annotare che al momento della raccolta le piante avevano appena subito una precipitazione atmosferica. Anche le cultivar Sour Diesel (E), Amnesia (G) e 550 (J) risultano particolarmente interessanti per la concentrazione elevata di monoterpenoidi che si attesta fra 83 e 87%.

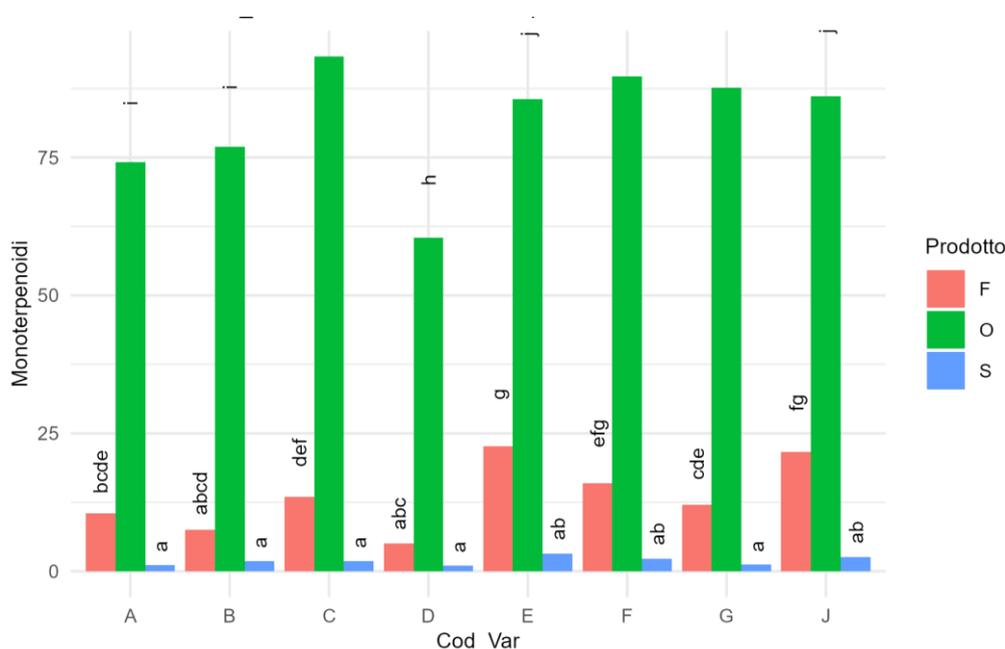


Figura 8 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in monoterpenoidi tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 2 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di monoterpenei. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	5827.09	832.44	119.02	0
Prodotto	2	101221.38	50610.69	7236.3	0
Cod_Var:Prodotto	14	1570.52	112.18	16.04	0
Residuals	53	370.68	6.99	NA	NA

4.1.2 Qualità dei sesquiterpenoidi

La cultivar CK (D) dimostra un'interessante concentrazione di sesquiterpeni, con differenze altamente significative rispetto le altre varietà, questa variazione è causata in minima parte anche dalle condizioni meteorologiche poco favorevoli. Degne di nota sono le concentrazioni di sesquiterpenoidi nelle cultivar 350 (A) e 800 (B). Anche per le frazioni estratte con solvente dal materiale fresco ed essiccato, riscontriamo differenze significative, ma solo per le cultivar 800 e Sour Diesel sono altamente significative.

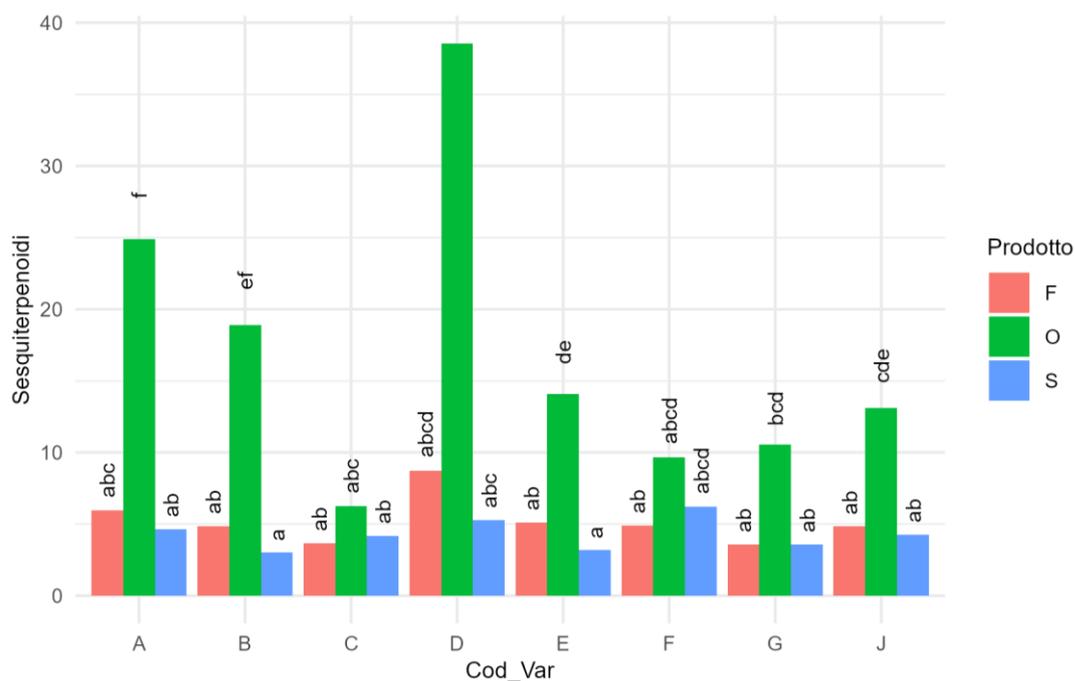


Figura 9 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpenoidi tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 3 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di sesquiterpenoidi. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	1042.43	148.92	23.08	0
Prodotto	2	2346.9	1173.45	181.86	0
Cod_Var:Prodotto	14	1422.08	101.58	15.74	0
Residuals	53	341.99	6.45	NA	NA

4.1.3 Estrazione di cannabinoidi

Trattandosi di composti insolubili in acqua e con un punto di ebollizione da 157 a 180°C, i cannabinoidi caratterizzano le estrazioni con solvente, con concentrazioni dal 70 al 85% da materiale fresco, e con concentrazioni maggiori fino ad arrivare al 93% per le estrazioni da matrice essiccata. La tecnica di estrazione dell'olio essenziale è interessante nelle applicazioni in cui la presenza di cannabinoidi può rivelarsi una caratteristica indesiderata.

Dal grafico relativo alla concentrazione dei cannabinoidi (Figura 10) emergono chiaramente gli effetti principali dei diversi metodi di estrazione. In particolare, nell'olio essenziale, la concentrazione di cannabinoidi risulta molto bassa, spesso appena rilevabile o addirittura assente.

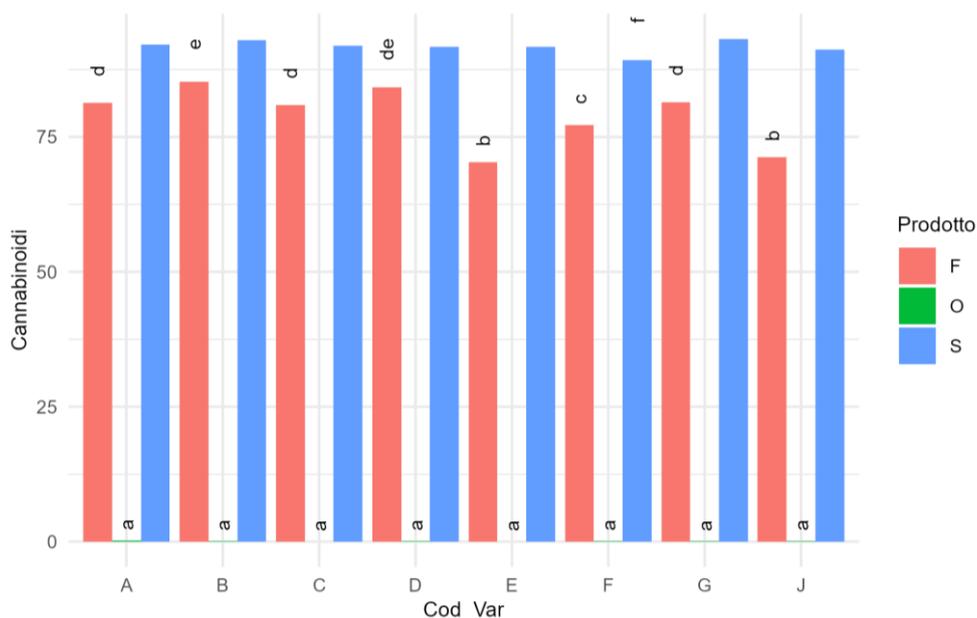


Figura 10 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in cannabinoidi tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; Olio: O; Secco: S), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 4 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di cannabinoidi. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	2403.51	343.36	260.13	0
Prodotto	2	131311.99	65655.99	49741.11	0
Cod_Var:Prodotto	14	420.72	30.05	22.77	0
Residuals	53	69.96	1.32	NA	NA

4.1.4 Qualità degli aldeidi

Negli estratti analizzati, gli aldeidi sono presenti in concentrazioni relativamente basse ma sempre significativa, nell'ordine fra lo 0,03 e lo 0,12 %. Nella cultivar 350 (A) si denota una concentrazione più elevata nell'olio essenziale rispetto alle altre cultivar, pure per il prodotto fresco. Quest'ultimo con una concentrazione dello 0,1 % caratterizza la frazione più consistente nella cultivar 550 (J). Le differenze fra le varietà per la tipologia di estrazione da prodotto secco riportano una leggera significatività.

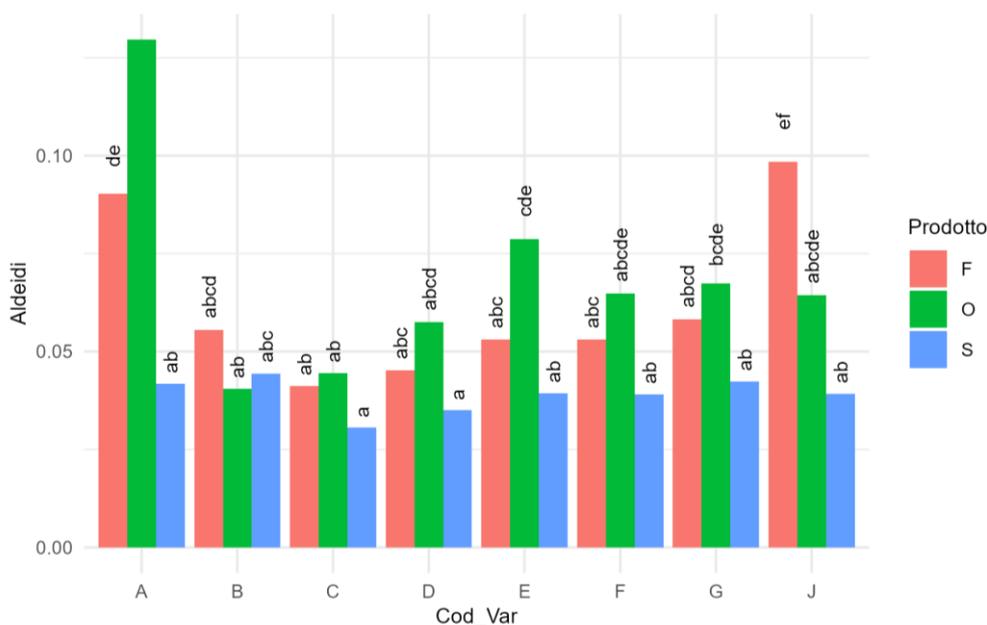


Figura 11 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in aldeidi tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; Olio: O; Secco: S), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 5 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di aldeidi. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	0.01	0	15.93	0
Prodotto	2	0.01	0.01	44.13	0
Cod_Var:Prodotto	14	0.01	0	6.12	0
Residuals	53	0.01	0	NA	NA

4.1.5 Qualità degli alcoli

Per le estrazioni in solvente da matrice essiccata, nella classe degli alcoli, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative. Nella distillazione della cultivar 800 (B) si registra invece la concentrazione maggiore (1,7 %) di alcoli, e differisce significativamente dalle distillazioni delle varietà 350 (A), CK (D) e Amnesia (G). L'estrazione in solvente dal prodotto fresco della cultivar Amnesia, è caratterizzata da una concentrazione particolare ed esclusiva di questi composti.

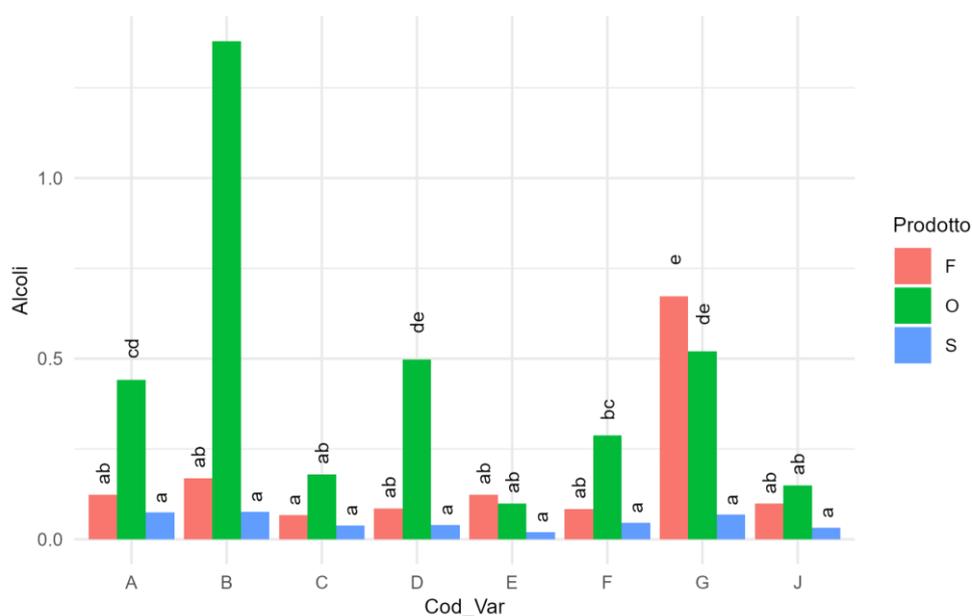


Figura 12 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in alcoli tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 6 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di alcoli. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	1.96	0.28	62.43	0
Prodotto	2	1.92	0.96	214.53	0
Cod_Var:Prodotto	14	2.67	0.19	42.5	0
Residuals	53	0.24	0	NA	NA

4.1.6 Qualità dei solfuri

I solfuri presentano una caratteristica peculiare in quanto sono per lo più insolubili. Come si denota dal grafico (Figura 13), nella distillazione i solfuri sono presenti in tracce, mentre nelle estrazioni in solvente, sia da matrice fresca sia da matrice essiccata, si evidenziano differenze leggermente significative. In particolare, la cultivar 911(F) si distingue per l'elevato tenore di solfuri nel prodotto secco.

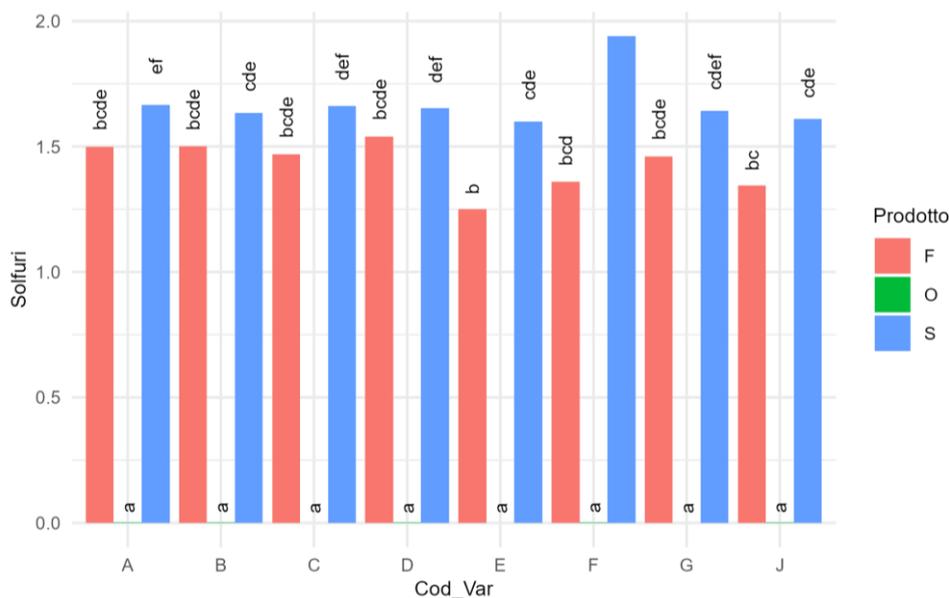


Figura 13 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in solfuri tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 7 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di solfuri. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	0.94	0.13	14.24	0
Prodotto	2	43.41	21.71	2296.75	0
Cod_Var:Prodotto	14	0.32	0.02	2.41	0.01
Residuals	53	0.5	0.01	NA	NA

4.1.7 Qualità dei chetoni

La cultivar 800 (B) si presta particolarmente concentrata di chetoni nell'olio essenziale e nel prodotto fresco. Questi composti sono maggiormente disponibili, con concentrazioni dallo 0,1 allo 0,2 %, nelle frazioni estratte dal prodotto fresco.

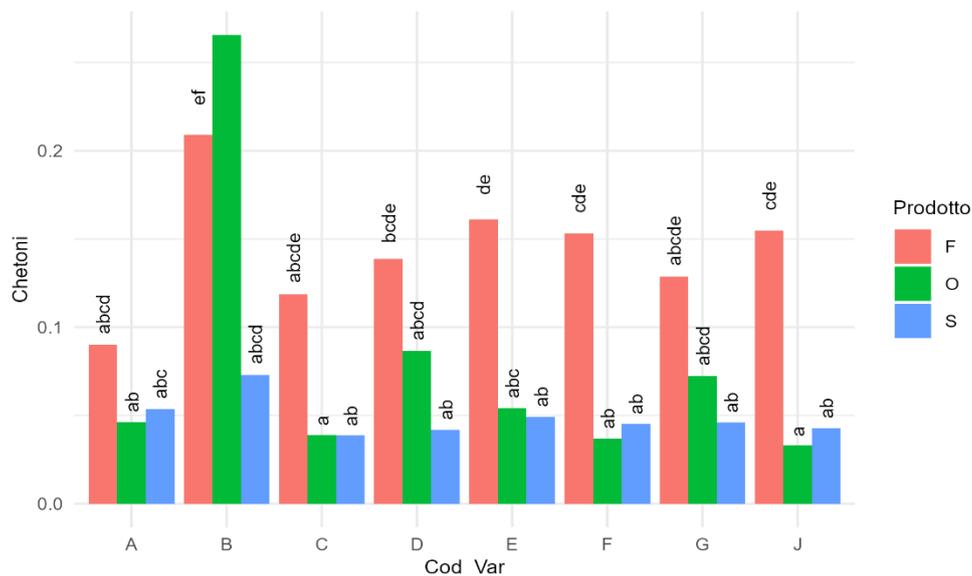


Figura 14 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in chetoni tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 8 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di chetoni. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	0.1	0.01	12.88	0
Prodotto	2	0.12	0.06	52.64	0
Cod_Var:Prodotto	14	0.06	0	4.08	0
Residuals	53	0.06	0	NA	NA

4.1.8 Qualità degli esteri

Le cultivar interessate da concentrazioni significative di esteri sono Amnesia e 550, specialmente per le estrazioni via distillazione, in confronto con le altre cultivar. Per le tipologie di estrazioni in solvente, non notiamo differenze statisticamente significative se non per la varietà 800 (B). La resa degli esteri è molto variabile nelle estrazioni dell'olio essenziale.

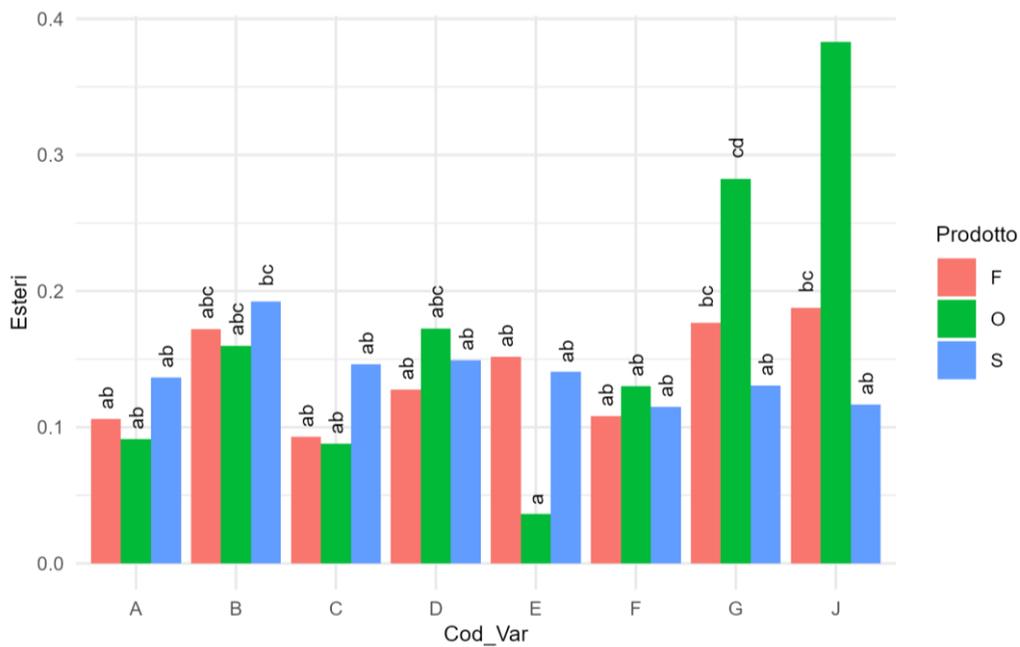


Figura 15 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in esteri tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 9 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di esteri. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<i>Cod_Var</i>	7	0.17	0.02	12.44	0
<i>Prodotto</i>	2	0.01	0.01	3.62	0.03
<i>Cod_Var:Prodotto</i>	14	0.19	0.01	7	0
<i>Residuals</i>	53	0.1	0	NA	NA

4.1.9 Qualità degli idrocarburi aromatici

Per la classe di composti degli idrocarburi aromatici, si evidenzia una concentrazione superiore al 2 % nella frazione di olio essenziale della cultivar 800 (B). Per la varietà Amnesia (G) la concentrazione si attesta allo 0,8 %, per il resto delle cultivar e dei prodotti delle non riportiamo differenze significative.

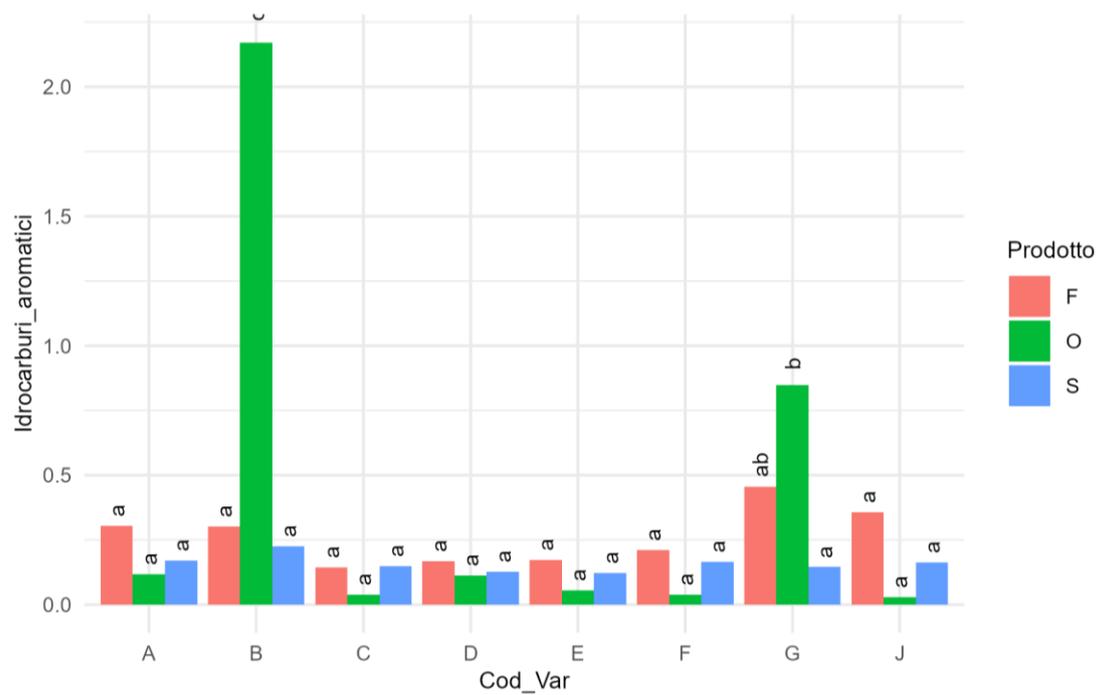


Figura 16 - Interazione tra le medie in percentuale del contenuto in idrocarburi aromatici tra le diverse varietà (A: 350; B: 800; C: 911C; D: CK; E: Sour diesel; F: 911; G: AMNESIA; J: 550) nelle diverse metodologie di estrazione (Fresco: F; O: Olio; S: Secco), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey.

Tabella 10 - Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per i fattori Varietà e Prodotto, inclusa l'interazione Varietà × Prodotto, sulla concentrazione di idrocarburi aromatici. La tabella mostra i valori di F e i livelli di significatività (p-value) per ciascun effetto considerato. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Cod_Var	7	5.42	0.77	27.82	0
Prodotto	2	0.92	0.46	16.51	0
Cod_Var:Prodotto	14	7.66	0.55	19.67	0
Residuals	53	1.47	0.03	NA	NA

5. Discussione

L'analisi dei risultati delle interazioni degli effetti principali di questa ricerca rivela che la frazione dei cannabinoidi è più consistente, con percentuali dal 68 al 93% (p/p), esclusivamente nei metodi di estrazione in solvente. Questo è in linea con quanto riportato da Brighenti et al. (2017), che hanno osservato concentrazioni simili utilizzando metodi di estrazione comparabili. Nell'olio essenziale, invece, a causa dell'elevata temperatura di ebollizione richiesta, la concentrazione di cannabinoidi è minima, rilevabile solo grazie all'elevata precisione del rivelatore a spettrometro di massa.

La frazione dei monoterpeni rappresenta la componente più significativa dell'olio essenziale estratto dalle infiorescenze di Cannabis, come confermato anche da Nissen et al. (2010). I risultati dell'interazione con gli effetti principali dei prodotti derivati da estrazione in solvente e da distillazione mostrano differenze altamente significative, evidenziando una spiccata selettività nel metodo di distillazione.

Per le frazioni volatili dei monoterpenoidi, estratte dalla matrice fresca ed essiccata, si osserva una notevole diminuzione della concentrazione nei confronti dell'estrazione con distillazione. Questo fenomeno può essere attribuito principalmente al fatto che nell'estrazione in solvente vengono estratti anche i cannabinoidi, che in cultivar selezionate per un alto valore di cannabinoidi garantiscono una maggiore concentrazione. Inoltre, come suggerito da Russo (2011), una minima parte potrebbe essersi degradata o perduta a causa del processo di essiccazione a temperatura superiore ai punti di ebollizione dei monoterpeni.

L'analisi della frazione dei sesquiterpenoidi non rivela differenze statisticamente significative tra i prodotti freschi ed essiccati, in accordo con quanto riportato da Fishedick et al. (2010). Tuttavia, l'olio essenziale si è contraddistinto per l'elevata resa di sesquiterpeni.

La classe dei composti dei solfuri è stata identificata esclusivamente nelle estrazioni in solvente, specialmente e a concentrazioni più elevate nella matrice essiccata. Questo risultato è in linea con gli studi di Booth et al. (2017) sulla composizione chimica della *Cannabis*.

Per quanto riguarda le altre classi di composti (alcoli, aldeidi, chetoni, esteri e idrocarburi aromatici), si sono osservate variazioni significative tra le diverse varietà e tecniche estrattive, confermando l'importanza della scelta del metodo di estrazione e della varietà di Cannabis per ottenere profili chimici specifici, come evidenziato anche da (Hazekamp et al., 2016).

6. Conclusioni

Questa ricerca ha evidenziato che i differenti metodi di estrazione producono risultati significativamente diversi in termini di composizione chimica dei prodotti ottenuti dalla Cannabis. L'estrazione in solvente si è dimostrata più efficace per l'isolamento dei cannabinoidi, mentre la distillazione ha mostrato una maggiore selettività per i terpeni, in particolare monoterpeni e sesquiterpeni.

Un risultato chiave di questo studio è la constatazione che la composizione chimica varia notevolmente tra le diverse varietà di Cannabis esaminate. Questa variabilità si manifesta non solo nelle concentrazioni dei principali composti come cannabinoidi e terpeni, ma anche nella presenza e nelle proporzioni di composti minori come solfuri, alcoli, aldeidi, chetoni e idrocarburi aromatici.

È fondamentale sottolineare che gli esiti della tipologia di estrazione dipendono fortemente dalla cultivar utilizzata. L'interazione tra la varietà di Cannabis e il metodo di estrazione emerge come un fattore cruciale nel determinare il profilo chimico finale del prodotto. Questa osservazione ha implicazioni significative sia per la ricerca che per le applicazioni pratiche, suggerendo che la scelta della varietà e del metodo di estrazione dovrebbe essere attentamente considerata in base all'obiettivo specifico dell'estrazione.

Queste considerazioni evidenziano l'importanza di un approccio integrato nella caratterizzazione e nell'utilizzo della Cannabis, che tenga conto sia della diversità genetica delle varietà che delle tecniche di estrazione impiegate. Tale approccio potrebbe portare a una maggiore precisione nella standardizzazione dei prodotti a base di Cannabis e a un utilizzo più mirato delle diverse varietà in ambito terapeutico e industriale.

Infine, questi risultati aprono la strada a ulteriori ricerche volte a ottimizzare le tecniche di estrazione in relazione alle specifiche varietà di Cannabis, con l'obiettivo di massimizzare l'efficienza e la selettività nell'isolamento dei composti desiderati.

7. Bibliografía

- Abdollahi M., Sefidkon, F., Calagiri, M., Mousavi, A., & Mahomoodally, M. F.** Impact of four hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties and stage of plant growth on yield and composition of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 155, 112793. - 2020.
- Aizpurua-Olaizola O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A.** Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*. 79 (2), 324-331 - 2016.
- Barcaccia G., Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozzi, A., Borin, M., Bona, S.,** Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars - 2020.
- Birdsall S.M., Birdsall, T.C., Tims, L.A.,** The use of medical marijuana in cancer. *Curr. Oncol.* - 2016.
- Boehnke K.F., Litinas, E., Clauw, D.J.,** Medical cannabis use is associated with decreased opiate medication use in a retrospective cross-sectional survey of patients with chronic pain. *J. Pain* - 2016.
- Bohlmann J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R.,** Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1998.
- Booth J.K., Page, J.E., Bohlmann, J.,** Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *PLoS ONE* 12(3) - 2017.
- Brighenti V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., & Benvenuti, S.** Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L.(hemp). *Journal of pharmaceutical* - 2017.
- Britton G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.,** Carotenoids, vol. 3. Biosynthesis and metabolism. Birkhäuser, Basel - 1998.
- Britton G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.,** Carotenoids, vol. 4. Natural functions. Birkhäuser, Basel - 2008.
- Campeney E., López-Pelayo, H., Nutt, D., Blithikioti, C., Oliveras, C., Nuño, L., Maldonado, R., Florez, G., Arias, F., Fernández-Artamendi, S.,** The blind men and the elephant: systematic review of systematic reviews of cannabis use related health harms. *Eur. Neuropsychopharmacol.* - 2020.
- Chandra S., Lata, H., ElSohly, M.A., Walker, L.A., Potter, D.,** Cannabis cultivation: methodological issues for obtaining medical-grade product. *Epilepsy Behav.* - 2017.
- Chemat F., Strube, J.** Green Extraction of Natural Products. Theory and Practice. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. DOI:10.1002/9783527676828 - 2015.
- Clarke R. C.** Marijuana botany. An advanced study: the propagation and breeding of distinctive cannabis (California, USA: And/Or Press). - 1981.
- de Meijer E.P.M.,** The chemical phenotypes (chemotypes) of Cannabis. In: Pertwee R.G. (editor). *Handbook of Cannabis*. Handbooks in Psychopharmacology: Oxford University Press. - 2014.

- de Meijer E.P.M., van der Kamp, H.J., van Eeuwijk, F.A.**, Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica*. - 1992.
- Deiana S.**, Medical use of cannabis. Cannabidiol: a new light for schizophrenia? *Drug Test. Anal.* - 2013.
- Della Penna D., Pogson, B.J.** Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* 57:711–738 - 2006.
- Fellermeier M., Wolfgang, E., Adelbert, B. & Meinhart, H. Zenk** Biosynthesis of cannabinoids. Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucoses. *Eur. J. Biochem.* - 2001.
- Fellermeier M., Zenk, MH.** Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* May - 1998.
- Fetterman P.S., Keith, E.S., Waller, C.W., Guerrero, O., Doorenbos, N.J., Quimby, M.W.**, Mississippi-grown *Cannabis sativa* L.: preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *J. Pharm. Sci.* - 1971.
- Fiorini D., Molle, A., Nabissi, M., Santini, G., Benelli, G., & Maggi, F.** Valorizing industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products: Cannabidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation. - 2019.
- Fischedick J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R.** Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2058-2073. - 2010.
- Fischedick J.T.**, Identification of Terpenoid Chemotypes Among High THC-producing *Cannabis sativa* L. Cultivars. *Cannabis and Cannabinoid Research*. - 2017.
- Fournier G., Richez-Dumanois, C., Duvezin, J., Mathieu, J.P., Paris, M.**, identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects. *Planta Medica*. - 1987.
- Fuchs H., Niesler, N., Trautner, A., Sama, S., Jerz, G., Panjideh, H., Weng, A.** Glycosylated triterpenoids as endosomal escape enhancers in targeted tumor therapies. *Biomedicines* 5(2):1–25 - 2017.
- Haüser W., Petzke, F., Fitzcharles, M.**, Efficacy, tolerability and safety of cannabis- based medicines for chronic pain management—an overview of systematic reviews. *Eur. J. Pain* - 2018.
- Happyana N., Agnolet, S., Muntendam, R., et al.** Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medical *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*. - 2013.
- Hazekamp A., Tejkalová, K., and Papadimitriou, S.** Cannabis: From Cultivar to Chemovar II - A Metabolomics Approach to Cannabis Classification. *Cannabis Cannabinoid Res.* - 2016.
- Holopainen J.K., Himanen, S.J., Yuan, J.S., Chen, F., Stewart, C.N.** Ecological functions of terpenoids in changing climates. In: Ramawat KG, Mérillon JM (eds) *Natural products*. Springer, Berlin - 2013.
- Kosiba J.D., Maisto, S.A., Joseph, W.**, Patient-reported use of medical cannabis for pain, anxiety, and depression symptoms: systematic review and meta-analysis. *Soc. Sci. Med.* - 2019.

- Latta R.P. Eaton B.J.** Seasonal fluctuations in cannabinoid content of Kansas marijuana. *Econ Bot.* - 1975.
- Lichtenthaler H.K.** "The MEP pathway: an important pathway for the biosynthesis of isoprenoids." *Plant Physiology.* - 1999.
- Maa E., Figi, P.,** The case for medical marijuana in epilepsy. *Epilepsia* - 2014.
- Maffei M.** Metabolismo e prodotti secondari delle piante. *Biosintesi dei terpenoidi.* UTET libreria srl. 7: 183-203 - 1999.
- Mahlberg P.G., Kim, E.S.** Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *J Ind Hemp.* - 2004.
- Mandolino G., Bagatta, M., Carboni, A., Ranalli, P., de Meijer, E.P.M.** Qualitative and quantitative aspects of the inheritance of chemical phenotype in *Cannabis*. *J Ind Hemp.* - 2003.
- Mandolino G., Carboni, A.,** Potential of marker assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica.* - 2004.
- McGarvey D.J. and Croteau R.** Terpenoid metabolism. *Plant cell* 7 1015–1026. - 1995.
- Morimoto S. Komatsu K., Taura F., and Shoyama Y.** Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry.* - 1998.
- Nabil S.,** Secondary Metabolites in Plant Stress Adaptation. *Analytic Space of Secondary Metabolites.* Springer Nature Switzerland AG, 2024.
- Nissen L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., & Monti, A.** Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5), 413-419. - 2010.
- Nitsche M. e Gbadamosi R.,** Steam Distillation. In *Practical Column Design Guide*; Nitsche, M., Gbadamosi, R., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 187–213, ISBN 978-3-319-51687-5. - 2017.
- Piomelli D., and Russo, E. B.** The *Cannabis sativa* Versus *Cannabis indica* Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. *Cannabis Cannabinoid Res.* - 2016.
- Rice S., Koziel, J.,** Characterizing the smell of marijuana by odor impact of volatile compounds: An application of simultaneous chemical and sensory analysis. *PLoS ONE* - 2015.
- Rodriguez B.C., Duran-Zuazo, V.H., Garcia-Tejero, I.F., Ruiz, B.G.** Current and future applications for hemp essential oils: a review - 2023.
- Russo E. B.** Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344-1364. - 2011.
- Shoyama Y., Hirano, H., Nishioka, I.** Biosynthesis of propyl cannabinoid acid and its biosynthetic relationship with pentyl and methyl cannabinoid acids *Phytochemistry.* - 1984.
- Sirikantaramas S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa, Y., Morimoto, S., Shoyama, Y.** Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.* - 2005.

- Small E., and Cronquist, A.** A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon. - 1976.
- Small E., Beckstead, H.D.** Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of cannabis. Lloydia. - 1973.
- Small E., Jui, P.Y., Lefkovitch, L.P.,** A numerical Taxonomic Analysis of Cannabis with Special Reference to Species Delimitation. Syst. Bot. - 1976.
- Small E., Naraine, S.G.U.,** Size matters: evolution of large drug-secreting resin glands in elite pharmaceutical strains of Cannabis sativa (marijuana). Genet Resour Crop Evol. - 2016.
- Tanaka Y., Sasaki, N., Ohmiya, A.,** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. Plant J 54:733–749 - 2008.
- Taura F., Morimoto, S., Shoyama, Y.** Cannabidiolic-acid Synthase from Cannabis sativa L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxydacyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. J. Biol. Chem. - 1996.
- Taura F., Morimoto, S., Shoyama, Y., and Mechoulam, R.,** First direct evidence for the mechanism of DELTA.1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. J. Am. Chem. Soc. - 1995.
- Valtcho D. Z., Vladimir, S., Ivanka, B. S. , Miroslava, K., Tess, A., Ivayla, D.** Grinding and Fractionation during Distillation Alter Hemp Essential Oil Profile and Its Antimicrobial Activity - 2020.
- Wenger J.P., DabneyIII, C.J., ElSohly, M.A., Chandra, S., Radwan, M.M., Majumdar, C.G., and Weiblen, G.D.** Validating a predictive model of cannabinoid inheritance with feral, clinical, and industrial Cannabis sativa - 2020.
- Wilsey B., Marcotte, T., Deutsch, R., Gouaux, B., Sakai, S., Donaghe, H.,** Low-dose vaporized cannabis significantly improves neuropathic pain. J. Pain - 2013.
- Wilsey B., Marcotte, T., Tsodikov, A., Millman, J., Bentley, H., Gouaux, B., Fishman, S.,** A randomized, placebo-controlled, crossover trial of cannabis cigarettes in neuropathic pain. J. Pain. - 2008.