UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

La reintroduzione della canapa in aree marginali e montane analisi e ricerche sulle attività sperimentali 2015 nel Verbano Cusio Ossola

DeFENS
DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER GLI ALIMENTI, LA NUTRIZIONE E L'AMBIENTE
Sez. Scienze Chimiche e Biomolecolari

Gigliola Borgonovo

Progetto SA.T.I.V.A.

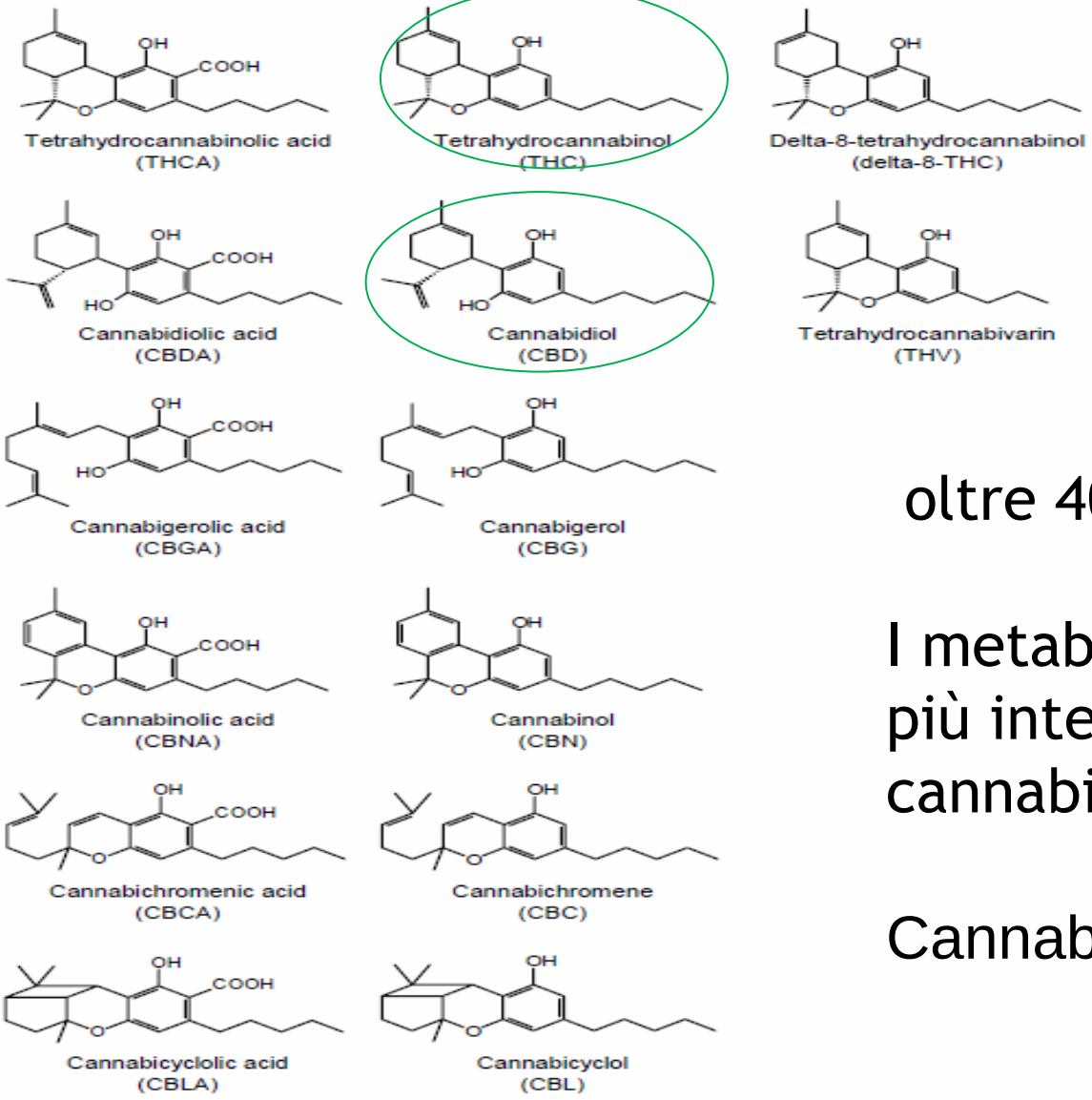
SAve a Territory Increasing Value of Agriculture

ARS.UNI.VCO

Coltivazioni sperimentali da semi certificati di canapa a basso contenuto di THC.
Varietà: 'Futura 75' di produzione francese

Identificazione e quantificazione principali fitocannabinoidi su canapa raccolta in località Cavandone

Profilo fitochimico

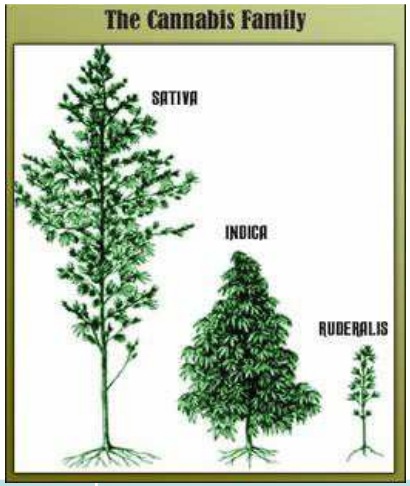


oltre 400 componenti

I metaboliti secondari più interessanti sono i cannabinoidi

Cannabinoidi acidi

- *Cannabis indica*
  - *Cannabis sativa*
    - *Cannabis ruderalis*



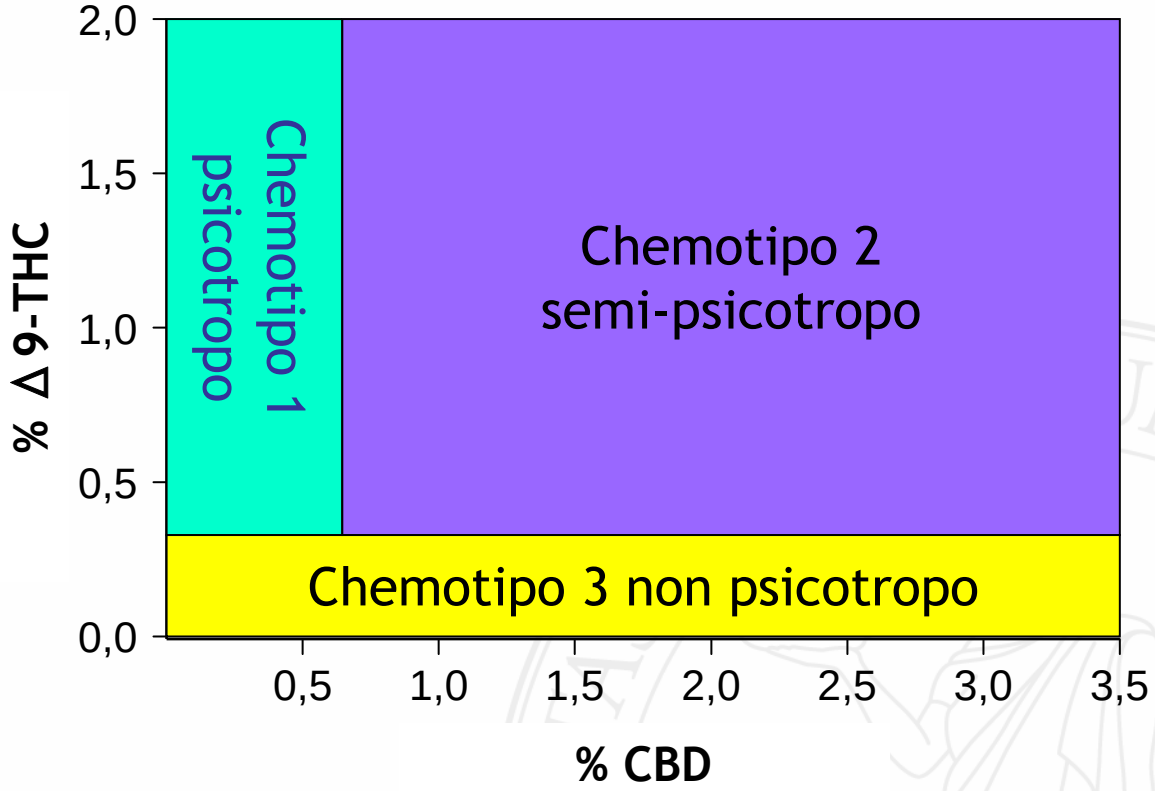
Tipo di canapa	Parte usata/utilizzi	Profilo fitochimico
Canapa da fibra	Fusto/Tessuti per abbigliamento, arredamento, corde, tappeti, carta, feltri isolanti, geotessili, compositi, pannelli isolanti, materiale inerte per edilizia….	CBD>>THC
Canapa alimentare	Semi/olio alimentare, cosmetica, vernici, resine…	----
Canapa medicinale	Infiorescenze femminili	THC,CBD…..
Canapa "ricreazionale"	Infiorescenze femminili	THC>>CBD

L’azione biologica della *Cannabis* è complessa

Δ^9-THC
Agente psicoattivo
Antidolorifico
Euforizzante
Antinausea
Antiemetico
Anticinetosico
Stimolante l’appetito
Ipotensivo (Pressione endooculare)

CBD
Antiinfiammatorio
Analgesico
Antiemetico
Antipsicotico
Antischemico
Sedativo e Ansiolitico
Antiepilettico
Ipotensivo

Classificazione dei chemotipi in base al contenuto in cannabinoidi



(Small e Beckstead, Lloydia 1973, 144-165; De Meijer, Euphytica 1992, 187-200)

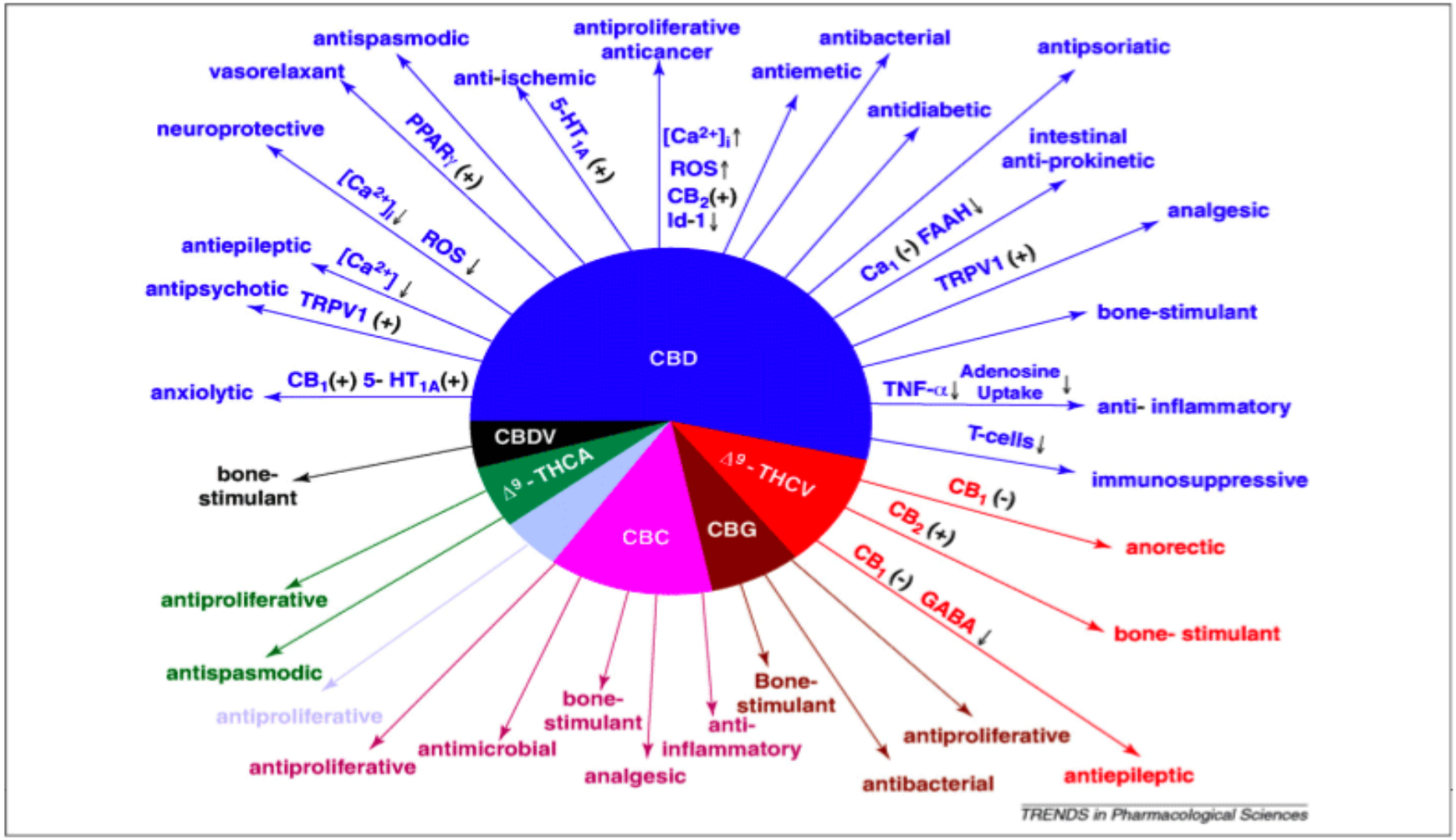
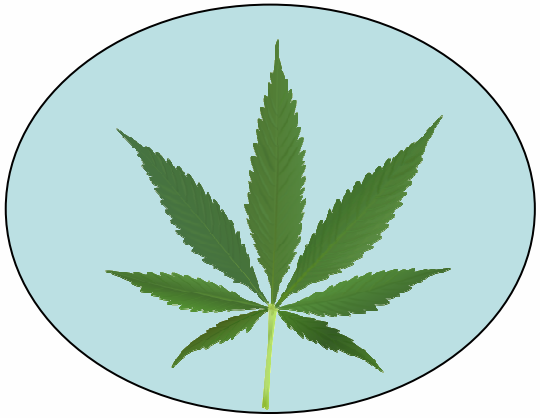


Figure 1. Pharmacological actions of non-psychotropic cannabinoids (with the indication of the proposed mechanisms of action).
Abbreviations: Δ^9-THC, Δ^9-tetrahydrocannabinol; Δ^8-THC, Δ^8-tetrahydrocannabinol; CBN, cannabinol; CBD, cannabidiol; Δ^9-THCV, Δ^9-tetrahydrocannabivarin; CBC, cannabichromene; CBG, cannabigerol; Δ^9-THCA, Δ^9-tetrahydrocannabinolic acid; CBDA, cannabidiolic acid; TRPV1, transient receptor potential vanilloid type 1; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor γ; ROS, reactive oxygen species; 5-HT_{1A}, 5-hydroxytryptamine receptor subtype 1A; FAAH, fatty acid amide hydrolase. (+), direct or indirect activation; ↑, increase; ↓, decrease.

Izzo et al., Trends in Pharm. Res. 2009, 515-527

Lavoro sperimentale



estratti

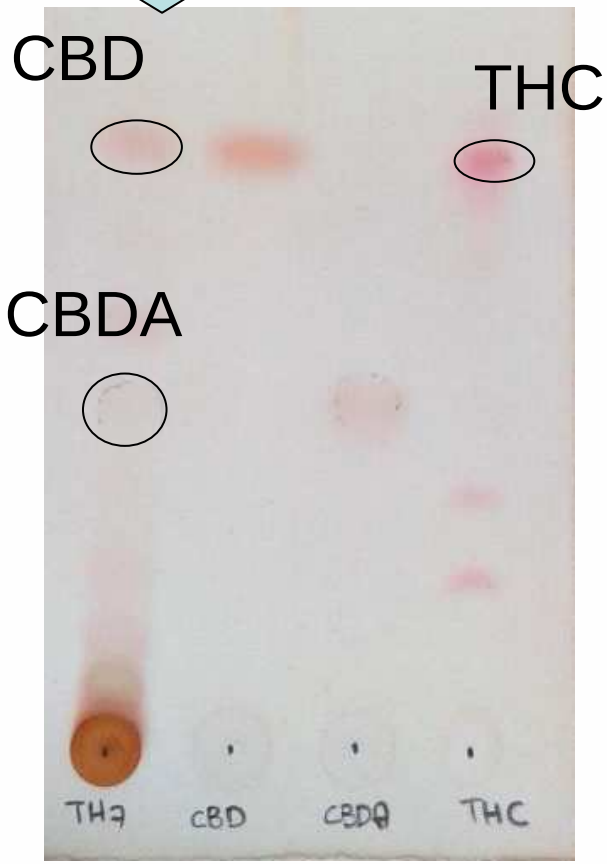
Analisi qualitativa

Purificazione principali fitocannabinoidi, indagini NMR

Analisi quantitativa (HPLC e ^{1}H NMR)

Analisi qualitativa

L'estratto contiene CBD e CBDA



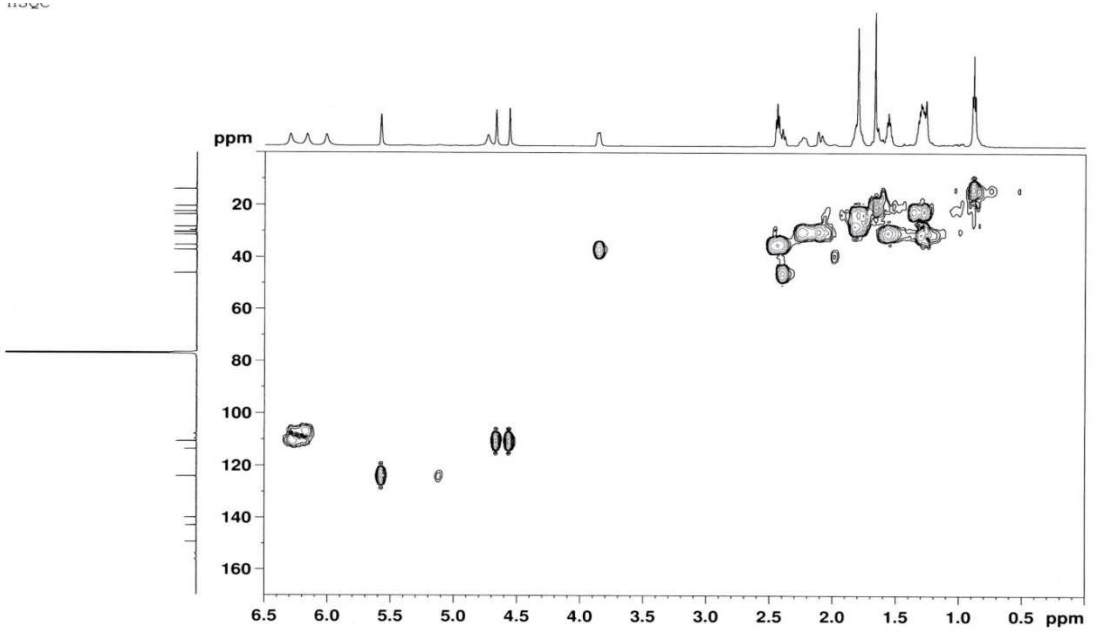
TLC	Rf CBD	Rf CBDA	Rf THC
Sperimentale	0,63	0,20	-
Letteratura	0,63	0,19	0,62

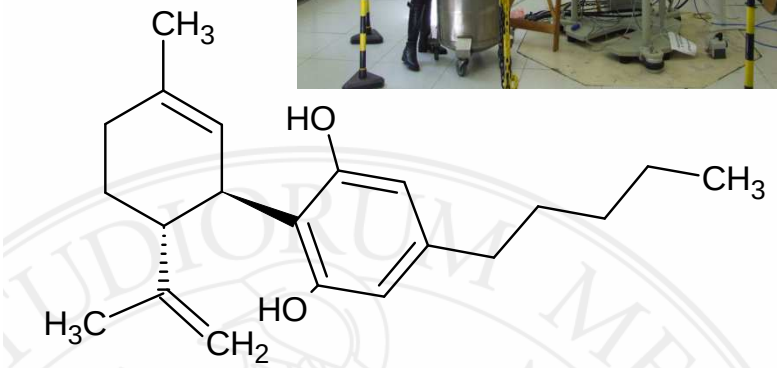
Eluente: esano /Et_2O 8/2
Colorante: fast blue 0,5%, NaOH 0,1N

(Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids, 2012)

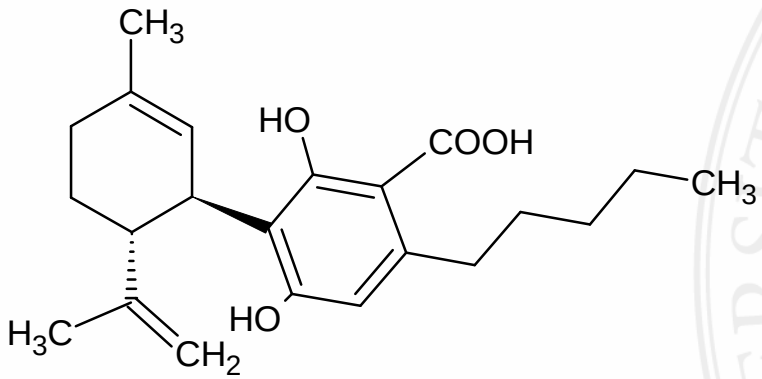
CBDA=rosso chiaro,
CBD=rosso-marrone e
THC=rosa

Analisi 1D e 2D NMR

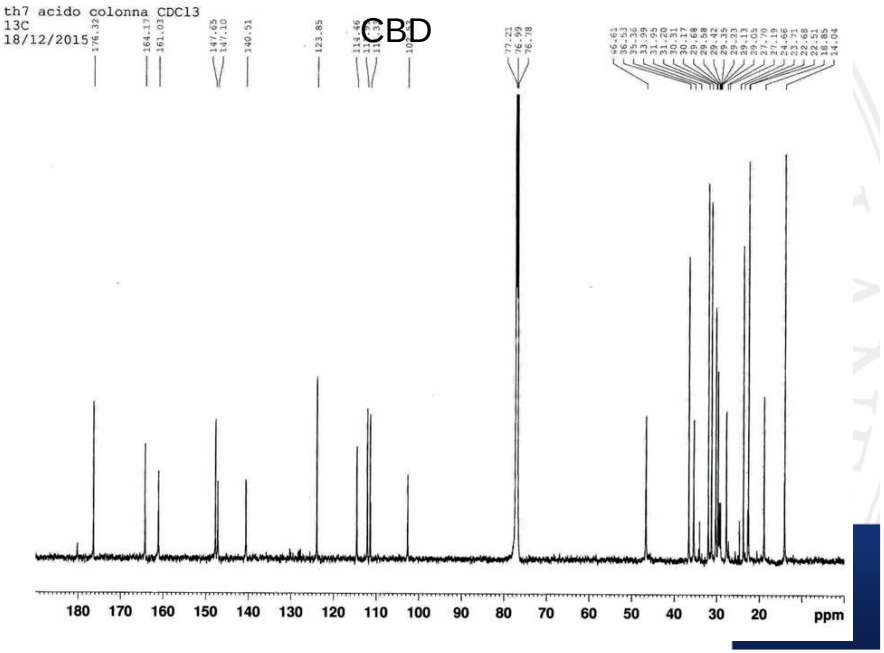




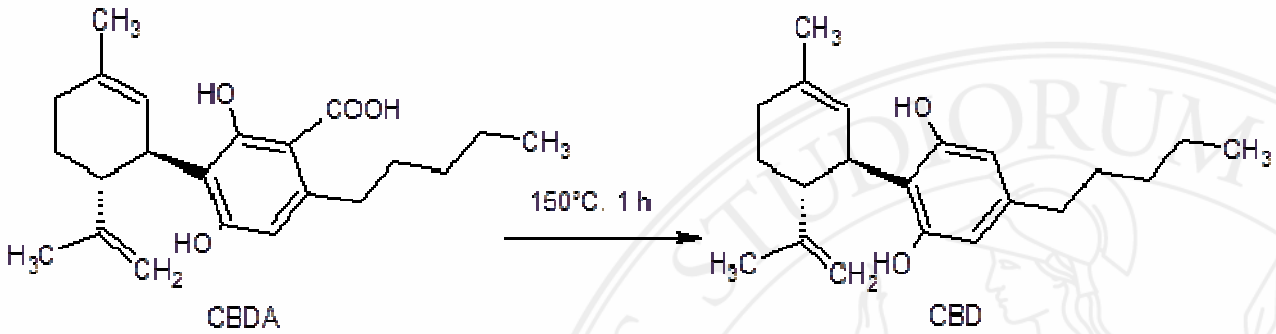
CBD



CBDA



Decarbossilazione CBDA



Analisi quantitativa: ^{1}H NMR

718 Chem. Pharm. Bull. 52(6) 718—721 (2004) Vol. 52, No. 6

Quantitative Analysis of Cannabinoids from *Cannabis sativa* Using ^{1}H-NMR

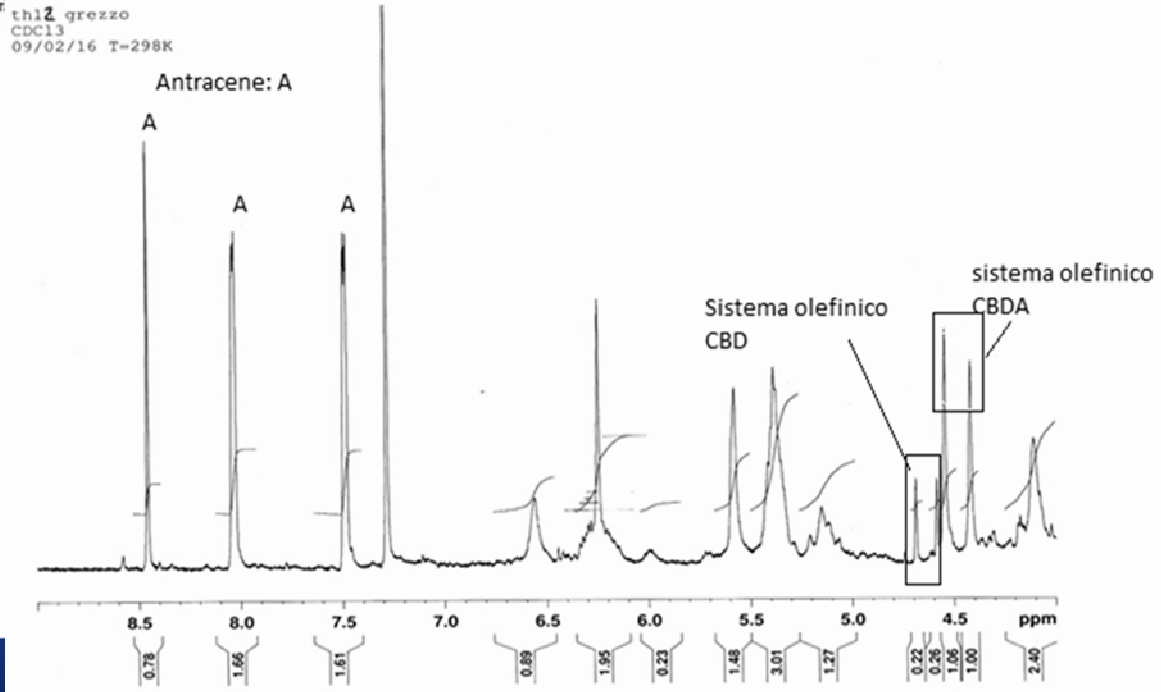
Arno Hazekamp,* Young Hae Choi, and Robert Verpoorte

Table 4. Quantitation of the Amount of THCA in Four Different Cannabis Types (mg/g of Dry Weight Plant Material), Calculated from the Amount of THCA in the Extracts with NMR and GC

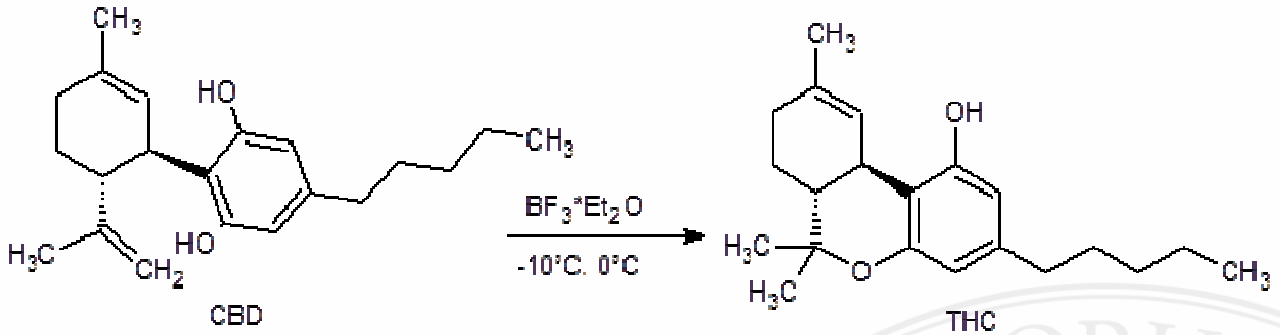
	Cultivar type	THCA by NMR (mg/g dry weight)	Used proton signal	THCA by GC (mg/g dry weight)
Extract 1	Drug	179 (±10)	H-4	198 (±3)
Extract 2	Drug	229 (±1)	H-4	234 (±14)
Extract 3	Intermediate	118 (±3)	H-4	103 (±6)
Extract 4	Fiber	Too low	H-4	0.88 (0.09)
		CBDA by NMR (mg/g dry weight)		CBDA by GC (mg/g dry weight)
Extract 4	Fiber	22.0 (±1.4)	H-4	21.4 (±1.9)

For the fiber type also CBDA was quantified. Each experiment was performed in tr

La quantificazione è stata effettuata calcolando il rapporto tra le aree dei segnali di un opportuno standard interno (antracene) e quelli d'interesse.

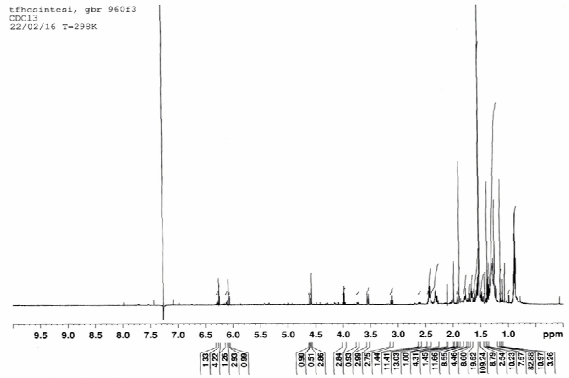


Sintesi chimica del Δ^9-THC

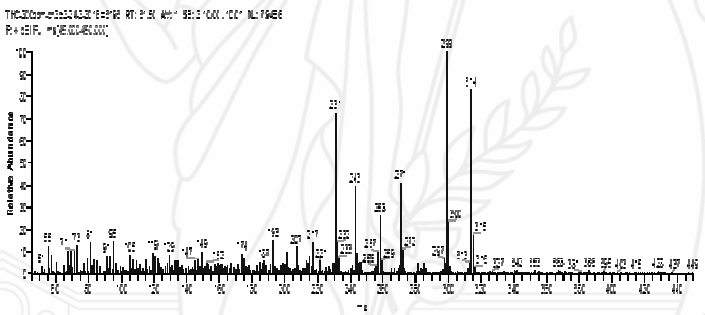


WO 2006/053766

Analisi ^{1}H NMR

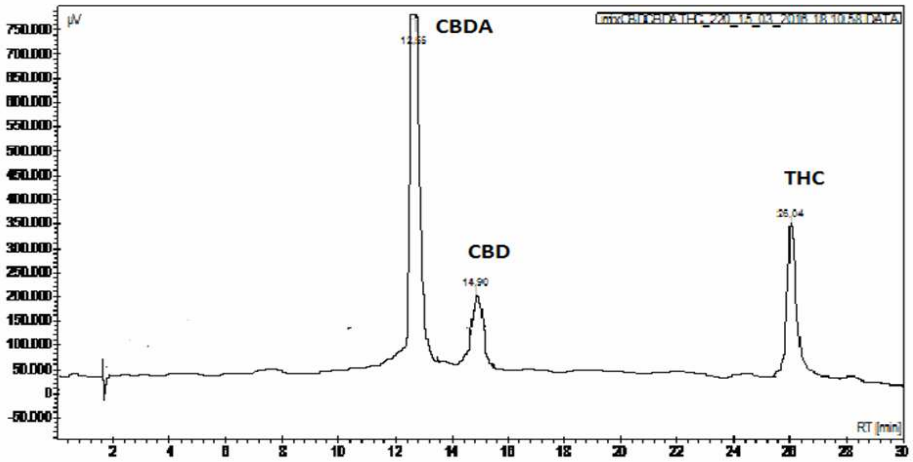


Analisi GC/MS

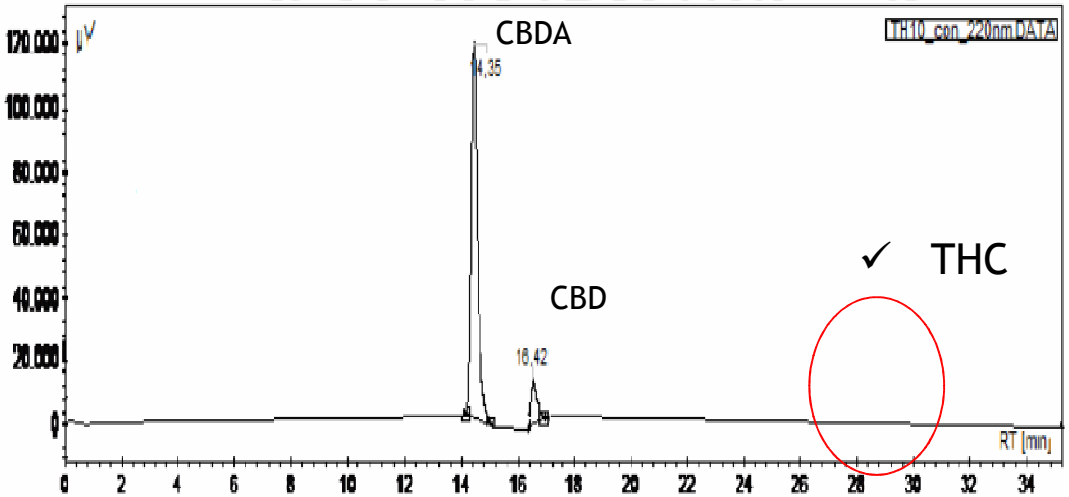


Analisi HPLC

Miscela dei tre standard



Estratto



Colonna: Alltima C18
Eluenti: A H_2O/0.1% HCOOH, B ACN
Analisi a gradiente dal 70 % di B al 90 % di A in 35 minuti, a flusso 1

Per il THC la concentrazione più bassa rivelabile (LOD limit of detection) mediante HPLC, risulta essere 0.05 % (0.025% De Backer et al, 2009, 4115-4124)

	CBD mg/g DW	CBDA mg/g DW
HPLC	10 ± 3,90	145,9 ± 40,38
NMR (dati preliminari)	14,6	71,0

Parti aeree
CBD 1,0-1,4%

Tisana
CBD valore medio 0,03%

Semi

Prova *Metodo*	Unità di misura	Risultato
* Determinazione del contenuto di umidità e sostanze volatili *ISO 665:2000*	%	7,3
* Sostanza grassa *UNI EN ISO 659-2009*	%	25,5
* Sulla sostanza grassa estratta		
Acidità, espressa come acido oleico (metodo a freddo) *UNI EN ISO 660-2009*	%	0,90
ESTERI METILICI DEGLI ACIDI GRASSI *ISO 5508:1990 + ISO 12966-2:2011*		
Acido miristico	%	0,03
Acido pentadecanoico	%	0,02
Acido palmitico	%	7,48
Acido palmitoleico	%	0,16
Acido eptadecanoico	%	0,05
Acido eptadecenoico	%	0,02
Acido stearico	%	2,71
Acido oleico	%	12,76
Acido linoleico	%	56,88
Acido gamma-linolenico	%	2,04
Acido linolenico	%	15,64
Acido octadecatetraenoico	%	0,62
Acido arachico	%	0,75
Acido eicosenoico	%	0,38
Acido beenico	%	0,31
Acido lignocerico	%	0,15
Acidi grassi saturi	%	11,50
Acidi grassi monoinsaturi	%	13,32
Acidi grassi polinsaturi	%	75,18
Acidi grassi Omega 3	%	16,26
Acidi grassi Omega 6	%	58,92

- alimento ad uso umano ed animale (ricco di proteine)
- farina
- Esche per pesci
- Olio: condimento per alimenti, utilizzato nella produzione di margarine, tofu, gelati
- integratore alimentare per uso nutraceutico (naturalmente ricco di omega 3 ed omega 6)
- utilizzato nella produzione di cosmetici e detergenti per l'igiene del corpo
- detersivi
- inchiostri per stampa
- tinte per esterni edifici
- lubrificanti
- solventi
- mastici
- biodiesel
- combustibile
- colori ad olio

…

Conclusioni

È stato possibile valutare e quantificare i principali fitocannabinoidi presenti

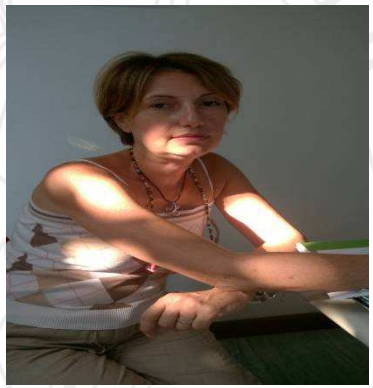
La canapa analizzata, appartiene al chemotipo 3 (canapa da fibra)

Ringraziamenti

Thea Sottocorna
Andrea Sasso

Angela Bassoli

Leonardo Scaglioni



Stefania Mazzini