

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Studio preformulativo di estratti di canapa industriale per preparazioni
farmaceutiche e cosmetiche*

Relatore

Prof.ssa Lorella Giovannelli

Candidata

Lisa Grassi

Anno Accademico 2023-24

Sessione autunnale

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Studio preformulativo di estratti di canapa industriale per preparazioni
farmaceutiche e cosmetiche*

Relatore

Prof.ssa Lorella Giovannelli

Candidata

Lisa Grassi

Correlatore

Prof. Giovanni B. Appendino

Anno Accademico 2023-24

Sessione autunnale

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. Cannabis	1
1.1. Cenni storici sull'uso terapeutico della cannabis	1
1.2. Descrizione e collocazione botanica della cannabis	2
1.3. Possibili applicazioni della pianta di canapa	4
1.4. Situazione normativa in Italia sulla cannabis	5
2. Metaboliti secondari della cannabis	7
2.1. Metaboliti secondari non fitocannabinoidi	7
2.2. Metaboliti secondari fitocannabinoidi	9
2.3. Fitocomplesso ed effetto "entourage"	13
3. Tecniche estrattive e importanza dei solventi	15
4. Sistema endocannabinoide cutaneo	20
4.1. Somministrazione topica e transdermica di cannabinoidi	21
4.2. Studi di permeazione	22
5. Cannabinoidi ad uso veterinario	25
PARTE SPERIMENTALE	26
SCOPO DEL LAVORO	27
MATERIALI	29
1. Solventi	29
2. Cannabinoidi	30
3. Estratti di canapa industriale	30
4. Eccipienti utilizzati per la preparazione di supposte a uso veterinario	31
STRUMENTI	33
METODI	34
1. Metodo estrattivo	34
2. Analisi termogravimetrica dei fitoestratti	36
3. Esperimenti di permeazione	38
3.1. Preparazione delle soluzioni degli esperimenti di permeazione	38

3.2. Procedimento dello studio di permeazione	39
4. Analisi cromatografica	42
5. Preparazioni rettali a base di fitoestratto di canapa.....	44
5.1. Preparazione di supposte a uso veterinario	44
5.1. Controllo di qualità delle supposte.....	45
5.2. Test di stabilità	45
RISULTATI E DISCUSSIONE	46
1. Estrazione	46
2. Esperimenti di permeazione	51
3. Analisi termogravimetrica.....	57
4. Supposte a base di fitoestratto AC3.3.....	63
4.1. Tempo di rammollimento delle supposte	66
4.2. Stabilità delle supposte.....	67
CONCLUSIONI	69
BIBLIOGRAFIA	70
SITOGRAFIA	80

INTRODUZIONE

1. Cannabis

1.1. Cenni storici sull'uso terapeutico della cannabis

Le prime testimonianze dell'impiego della cannabis come medicinale risalgono a circa 2700 anni fa. Nella tomba di un guaritore cinese nel Deserto del Gobi è stata rinvenuta una ciotola contenente circa 800 g di cannabis, a conferma che a quel tempo questa pianta era nota come rimedio terapeutico. Con approfondite ricerche, che hanno riguardato anche il DNA vegetale, si è accertato che il campione ritrovato nella tomba apparteneva alla cannabis narcotica, contenendo il cannabinolo (CBN), il prodotto di degradazione del Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), sostanza indicata per il trattamento del dolore e patologie gravi e per alleviare i sintomi associati a numerose malattie [Russo *et al.*, 2008].

In Italia risale alla prima metà dell'800 l'impulso più significativo all'impiego della *Cannabis indica* che a quel tempo proveniva dall'India. Il farmacista milanese Carlo Erba, insieme ad un gruppo di appassionati colleghi, sviluppò estratti alcolici, sciroppi e caramelle a base di derivati della cannabis che testò personalmente e che la sua azienda farmaceutica, la Carlo Erba, distribuì in tutto il mondo [www.samorini.it/dorvau].

Successivamente il medico Valieri suggerì di impiegare anche la cannabis nostrana, all'epoca tipicamente destinata a produrre fibra tessile, per il trattamento di pazienti che presentavano patologie nervose e respiratorie. Egli propose di utilizzare gli estratti di questa varietà in forma più concentrata come alternativa ai più costosi derivati dalla *Cannabis indica*, già conosciuti a quel tempo [www.samorini.it/valieri].

Fino alla metà del 1900 in alcuni manuali pubblicati dalle aziende farmaceutiche erano presenti estratti e tinture di cannabis consigliate per il trattamento dell'insonnia e di sintomi legati a gravi patologie (Figura 1).

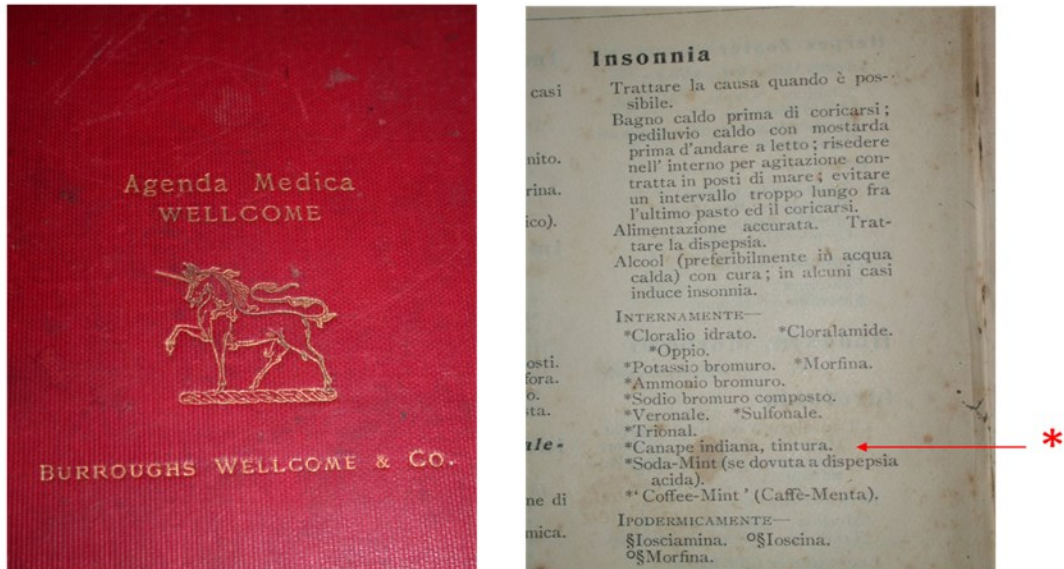


Figura 1. Foto di agenda pubblicata da una casa farmaceutica inglese con indicazioni per il trattamento dell'insonnia [Wellcome et al., 1910].

1.2. Descrizione e collocazione botanica della cannabis

Il famoso botanico svedese Carlo Linneo assegnò alla pianta di canapa il nome latino di *Cannabis sativa* L. La moderna tassonomia la inserisce nella famiglia delle Cannabacee o Cannabinacee, che a sua volta rientra nell'ordine delle urticali. Queste piante hanno tipicamente fiori unisessuati, situazione non frequente, con individui che possono essere monoici o dioici [Farag et al., 2017]. A questa famiglia appartengono due soli generi: *Cannabis* e *Humulus* (luppolo), i cui esemplari si sviluppano in numerosi paesi del mondo ma prevalentemente nella zona climatica temperata [Russo et al., 2019].

Le foglie di cannabis e in particolar modo le brattee possono essere ricoperte da protuberanze epidermiche definite tricomi ghiandolari, siti di produzione dei metaboliti secondari, come i fitocannabinoidi. Nella pianta di cannabis sono state identificate due classi di tricomi: ghiandolari e non ghiandolari. I tricomi ghiandolari possono essere a loro volta distinti in base alla loro forma, per esempio in tricomi pedunculati, sessili e bulbosi (Figura 2) [Andre et al., 2016].

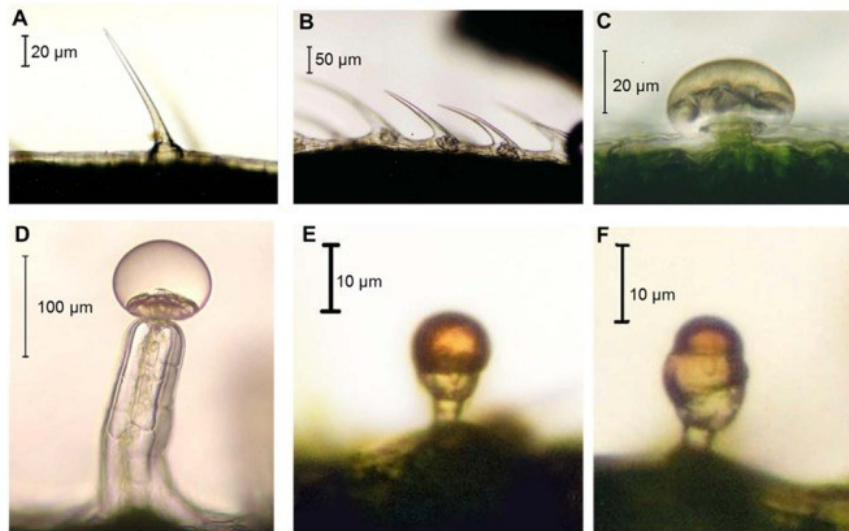


Figura 2. Tipologie di tricomi della canapa [Andre et al., 2016].

- | | |
|---|---------------------------------|
| A) Tricoma unicellulare non ghiandolare | B) tricomi cistolitici |
| C) tricoma capitato sessile | D) tricoma capitato-peduncolato |
| E) tricoma bulboso semplice | F) tricoma bulboso complesso |

I due generi appartenenti alle Cannabacee sono caratterizzati dall'immagazzinamento, in diverse strutture ghiandolari, di due famiglie di sostanze, i terpenoidi e i polichetidi isoprenilati, di natura resorcinolica nella cannabis (fitocannabinoidi) e trichetonica nel luppolo. Nella cannabis è stato documentato l'accumulo di oltre 150 fitocannabinoidi, in concentrazioni che possono arrivare nei fiori, addirittura al 30% [Schilling et al., 2020].

Oltre ai più noti fitocannabinoidi, come il Δ^9 -THC e il cannabidiolo (CBD), la pianta di cannabis produce numerose altre molecole come il cannabigerolo (CBG), il cannabinolo (CBN), il cannabicromene (CBC), la cannabidivarina (CBDV), la tetraidrocannabivarina (THCV), l'acido cannabidiolico (CBDA), l'acido cannabigerolico (CBGA), l'acido cannabidivarinico (CBDVA) e l'acido delta 9-tetraidrocannabinolico (Δ^9 -THCA) [Jin et al., 2020].

1.3. Possibili applicazioni della pianta di canapa

I semi di canapa, totalmente privi di cannabinoidi, sono di interesse per la filiera agroalimentare. Da essi è possibile ottenere la farina e l'olio di canapa caratterizzati da un sapore particolare, simile a quello della nocciola. Sono numerosi i prodotti da forno, come pane, pizza e biscotti, ottenuti impiegando i derivati della canapa (Figura 3). Questi alimenti, privi di glutine, possono essere adatti anche ad una alimentazione per celiaci [Kanabus *et al.*, 2021; Sorrentino *et al.*, 2021].

L'olio ottenuto dalla spremitura a freddo del seme presenta un profilo lipidico eccezionale che nessun altro alimento vegetale possiede, con un rapporto di acidi grassi polinsaturi omega 6 e omega 3 di 3:1, considerato ottimale per una corretta alimentazione. È stato condotto un *trial* clinico in cui candidati affetti da dermatite atopica hanno assunto *per os*, per venti settimane, olio di semi di canapa. Dai risultati dello studio è emerso un miglioramento nei partecipanti dei livelli plasmatici di trigliceridi. Inoltre, l'assunzione di olio di semi di canapa ha contribuito ad alleviare sintomi clinici, come prurito e secchezza cutanea in pazienti con patologie cutanee [Callaway *et al.*, 2005].

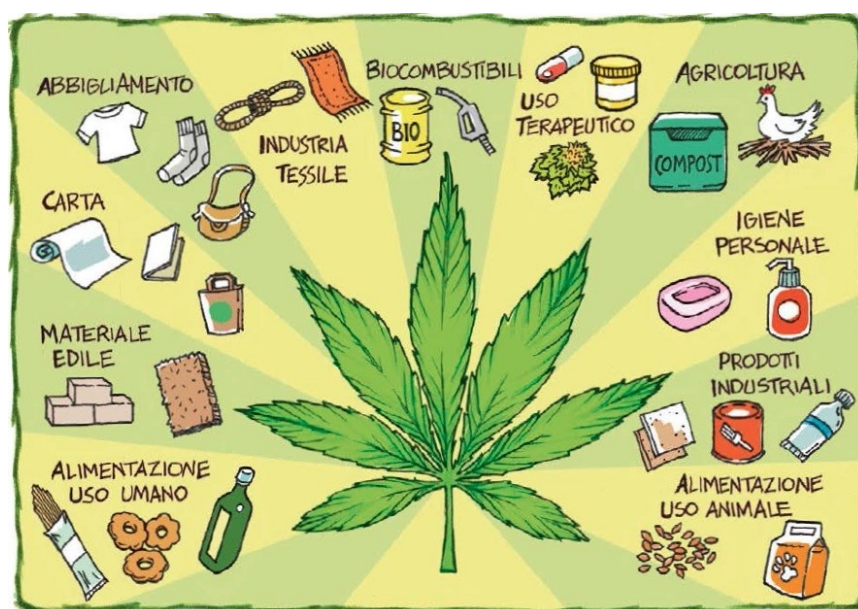


Figura 3. Ambiti di utilizzo dei diversi componenti della pianta di canapa [www.terranuova.it].

Il fusto della canapa con le sue principali frazioni, ovvero il legno (detto canapulo) e la fibra lunga macerata, trova applicazione nel campo dell'edilizia e nell'industria tessile (Figura 3). In particolare, il canapulo viene sfruttato per la realizzazione di tramezzi leggeri e resistenti all'umidità, mentre la fibra è utilizzata per la realizzazione di abiti e scarpe di elevata qualità [Sorrentino *et al.*, 2021].

L'olio di semi di canapa, grazie al suo elevato contenuto di acidi grassi essenziali polinsaturi quali carotenoidi e tocoferolo, viene utilizzato anche in ambito cosmetico, oltre che alimentare. Al fine di migliorare l'aspetto e la salute della cute, è stato condotto uno studio che ha previsto un confronto tra due preparazioni: una crema base e una crema base arricchita con il 3% di olio di canapa. È emerso che la preparazione arricchita di olio è efficace sulla riduzione della produzione di sebo in soggetti giovani. Inoltre, non sono stati evidenziati eventi avversi. Questo lavoro apre le porte ad ulteriori studi sul trattamento di altre problematiche cutanee con i derivati della canapa [Ali *et al.*, 2015].

1.4. Situazione normativa in Italia sulla cannabis

In Italia la normativa sulla regolamentazione della coltivazione, della produzione e della commercializzazione di sostanze stupefacenti fa riferimento alle disposizioni riportate in una normativa del 1990 e successive modifiche, ovvero il “Testo Unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza” [D.P.R. 9 ottobre 1990, n. 309].

Nel D.P.R. 309/90 si trovano allegate quattro tabelle (Tabella I, Tabella II, Tabella III e Tabella IV) che classificano le sostanze stupefacenti in ordine decrescente di pericolosità per la salute, rischio di dipendenza e beneficio terapeutico. Per “stupefacente” vengono considerate le sostanze che, se assunte dall'uomo, comportano uno stato di alterazione della coscienza con effetti depressivi o anche allucinogeni e comprovata dipendenza psicofisica, definito stato di *stupor*. In un decreto del Ministero della Salute del 2013, la cannabis è stata inserita nella Tabella II del Testo Unico sugli Stupefacenti [DM 23 gennaio 2013, n. 33].

Oltre alla pericolosità, alcune sostanze stupefacenti presentano un'importante attività farmacologica sfruttata a scopo terapeutico. Per questo motivo all'interno del decreto è stata

inserita una quinta tabella, definita Tabella dei medicinali, a sua volta suddivisa in cinque sezioni (A, B, C, D ed E).

Nel corso degli anni sono stati emanati diversi decreti per modificare il Testo Unico in merito alla classificazione del CBD. Nel 2023 con il decreto del Ministero della Salute è stato proposto l'inserimento nella Sezione B della Tabella dei medicinali [DM 7 agosto 2023, n. 194]. Tuttavia, una sentenza del Tribunale Amministrativo Regionale (TAR) del Lazio ha sospeso tale provvedimento fino al 16 gennaio 2024, ritenendo che l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) non avesse fornito motivazioni sufficienti riguardo ai rischi di dipendenza psichica o fisica associati al CBD [www.sifap.org]. Il TAR ha inoltre richiamato le raccomandazioni di gennaio 2019 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), secondo il quale le preparazioni a base di CBD con un contenuto di THC inferiore allo 0,2% non rappresentano un rischio per la salute pubblica [https://faaat.net].

Di recente però, il Ministero della Salute, su parere favorevole dell'ISS e del Consiglio Superiore di Sanità (CSS), ha proposto di reinserire nella Sezione B della Tabella dei medicinali le “composizioni per somministrazione ad uso orale di cannabidiolo ottenuto da estratti di Cannabis” [DM 27 giugno 2024, n. 157] Tale decreto, entrato in vigore il 5 agosto 2024, considera il CBD ottenuto da estrazione di infiorescenze di cannabis al pari del Δ^9 -THC naturale e di sintesi (dronabinol).

In base al DM n 157 del 2024, in Italia la dispensazione delle preparazioni a base di CBD estratto da infiorescenze di cannabis per somministrazione orale sia ad uso umano che in ambito veterinario, è consentita soltanto previa presentazione di ricetta non ripetibile (RNR) e compilazione da parte del farmacista del registro di entrata-uscita delle sostanze stupefacenti.

Tuttavia, l'11 settembre 2024 il TAR del Lazio ha sospeso il DM del 27 giugno fino al 16 dicembre 2024. Il tribunale ha infatti ribadito che i dati scientifici dimostrano che il CBD è privo di effetti psicoattivi e che quindi non può essere classificato come sostanza stupefacente [https://www.canapasativaitalia.org].

2. Metaboliti secondari della cannabis

Allo scopo di valutare le potenzialità farmacologiche della *Cannabis sativa* L., la ricerca scientifica si è focalizzata sull'indagine dei metaboliti specializzati, detti metaboliti secondari, elementi non indispensabili per la vita della pianta ma essenziali per la loro co-esistenza e co-evoluzione con altre specie vegetali e animali. Le famiglie più importanti dei metaboliti secondari nelle specie vegetali sono tre: gli alcaloidi, i terpenoidi e i fenilpropanoidi, noti come composti fenolici. Queste sostanze sono coinvolte nello sviluppo di meccanismi di difesa contro predatori e virus, nei sistemi di comunicazione tra piante e conferiscono protezione dai raggi UV. Tutto ciò ha permesso ad organismi stanziali come le piante di crescere ed evolvere nel tempo anche in ambienti ostili [Erb *et al.*, 2020; Zaynab *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020].

La concentrazione dei metaboliti secondari nella cannabis non è uniforme in tutte le parti della pianta e varia in base a molteplici fattori come la fase del ciclo di vita, la varietà genomica e le condizioni ambientali di crescita della pianta [Pacífico *et al.*, 2008]. Per esempio, a livello delle radici della cannabis tra gli alcaloidi spermidinici sono stati identificati la cannabissativina e l'anidrocannabissativina. I metaboliti secondari nella cannabis hanno numerose proprietà benefiche per l'uomo, motivo per cui vengono impiegati in campo farmaceutico, cosmetico e alimentare [Radwan *et al.*, 2021].

2.1. Metaboliti secondari non fitocannabinoidi

FLAVONOIDI

Nella cannabis sono stati identificati una trentina di flavonoidi appartenenti alla classe dei composti polifenolici. I flavonoidi originano dalla via biosintetica dei fenilpropanoidi, che avviene all'interno del citoplasma. Questi composti risultano maggiormente concentrati nelle foglie e nelle infiorescenze, mentre non sono stati rilevati nelle radici [Jin *et al.*, 2020].

Tra i flavonoidi principali presenti nella cannabis ci sono gli agliconi quercetina, orientina, vitexina, isovitexina, luteolina, apigenina, e camferolo, i quali possono subire modifiche come la metilazione, la glicosilazione, la prenilazione e la geranilazione. Crombie nel 1980 fu il primo a identificare questi composti, esclusivi della cannabis, chiamandoli canniflavone-1 e 2. In

seguito, i flavoni furono ripresi e caratterizzati da Radwan che scoprì un nuovo composto, la cannflavina C [Radwan *et al.*, 2021].

In uno studio recente, ventisette lotti di infiorescenze di canapa industriale sono stati analizzati tramite UHPLC-Q-Orbitrap HRMS per la caratterizzazione di polifenoli e acidi fenolici. È emerso che l'80% dei polifenoli totali era rappresentato da flavonoidi, con un contributo importante di flavoni come la cannflavina A e B [Izzo *et al.*, 2020].

La produzione di cannflavina avviene nelle prime fasi di sviluppo della pianta, ossia nella germogliazione, e precede la sintesi dei cannabinoidi. È stata dimostrata la capacità delle cannflavine di inibire in modo reversibile la prostaglandina E2 sintasi (PGE2) e la 5-lipossigenasi (5-LO) riducendo così la produzione di elementi pro-infiammatori come la PGE2 [Werz *et al.*, 2014]. La potenza antinfiammatoria della cannflavina A non è trascurabile: si posiziona infatti tra quella dell'aspirina e del desametasone [Barrett *et al.*, 1985].

TERPENOIDI

I terpeni sono una delle classi di metaboliti secondari più abbondanti presenti nella cannabis. I terpenoidi al momento identificati sono più di 120 e conferiscono l'odore peculiare della pianta. La produzione dei terpeni, caratterizzati da una struttura lineare o ciclica, avviene a livello dei tricomi ghiandolari attraverso due percorsi biosintetici: la via del metileritritolo fosfato plastidiale (MEP) per i monoterpeni e quella del mevalonato citosolico (MEV) per i sesquiterpeni. [Jin *et al.*, 2020]. In uno studio sulla caratterizzazione del profilo terpenico di infiorescenze di cannabis, è emerso che il β -cariofillene, α -humulene e farnesene erano tra i sesquiterpeni più abbondanti, mentre il mircene, l' α -pinene e il limonene erano tra i monoterpeni più rappresentativi [Booth *et al.*, 2017].

Dall'allungamento della più piccola unità terpenica, chiamata isoprenica, formata da cinque atomi di carbonio, possono derivare più di 20.000 differenti molecole suddivise in cinque classi prevalenti: i monoterpeni (due unità di isoprene, scheletro C₁₀), i sesquiterpeni (scheletro C₁₅), i diterpeni (scheletro C₂₀), i triterpeni (scheletro C₃₀) e i tetraterpeni (scheletro C₄₀). I principali terpeni ritrovati nell'olio essenziale di cannabis ottenuto per distillazione a vapore di infiorescenze, sono stati i monoterpeni, pari a 92,5%, e i sesquiterpeni, pari a 6,8% [Radwan *et al.*, 2021].

2.2. Metaboliti secondari fitocannabinoidi

ACIDO CANNABIDIOLICO (CBDA)

Il CBDA è generalmente il fitocannabinoide non psicotropo predominante nella *Cannabis sativa* L. Durante il ciclo di vita della pianta, la raccolta e lo stoccaggio, il CBDA andrà spontaneamente incontro a decarbossilazione non enzimatica, una reazione favorita da esposizione alla luce e al calore. La decarbossilazione dei cannabinoidi acidi prevede la perdita del gruppo carbossilico, legato al nucleo resorcinolico, con eliminazione di anidride carbonica e formazione del corrispettivo cannabinoide neutro. La velocità di decarbossilazione risulta accelerata a temperature elevate (superiori a 100 °C) [Hanuš *et al.*, 2016].

Nella Figura 4 è riportato il meccanismo di decarbossilazione generale dei cannabinoidi acidi.

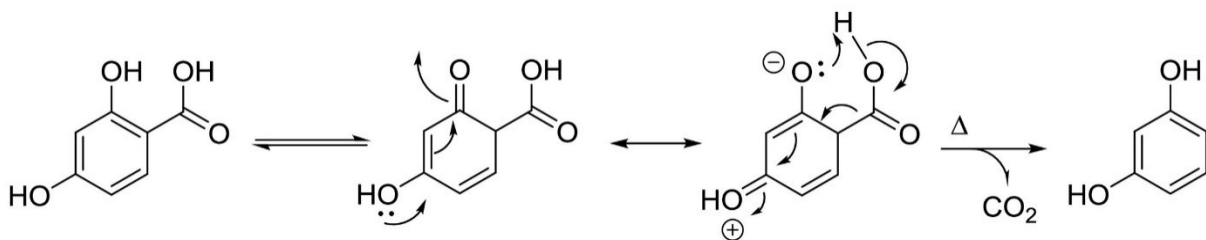


Figura 4. Meccanismo di decarbossilazione dei cannabinoidi acidi [Pollastro *et al.*, 2017].

A causa di questa sua instabilità, le proprietà del CBDA come tale sono state meno studiate rispetto a quelle dei composti neutri come il THC, CBD e il CBG e per questo ha trovato limiti di impiego [Formato *et al.*, 2020].

La tecnica analitica più indicata per la determinazione quantitativa dei composti acidi presenti in un estratto di cannabis è la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), in quanto il campione non viene sottoposto ad alte temperature, come invece avviene impiegando un gascromatografo (GC) [Filer *et al.*, 2022].

CANNABIDILOLO (CBD)

Il CBD, molecola non psicoattiva della *Cannabis sativa*, è stato identificato per la prima volta da Roger Adams nel 1940 il cui intento era quello di individuare il principale componente inebriante della marijuana. L'estratto utilizzato per il riconoscimento della molecola fu ricavato da una pianta di cannabis da fibra proveniente dal Minnesota. Il materiale di partenza era il distillato di un estratto, definito "l'olio rosso" per la sua colorazione rosso-rubino legata alla formazione di prodotti di ossidazione dei cannabinoidi [Adams *et al.*, 1940].

Il CBD (Figura 5) non viene sintetizzato nella pianta di cannabis, ma è un artefatto: deriva dalla decarbossilazione del CBDA, reazione innescata da calore, luce, modalità di conservazione e processo di estrazione [Wang *et al.*, 2016].

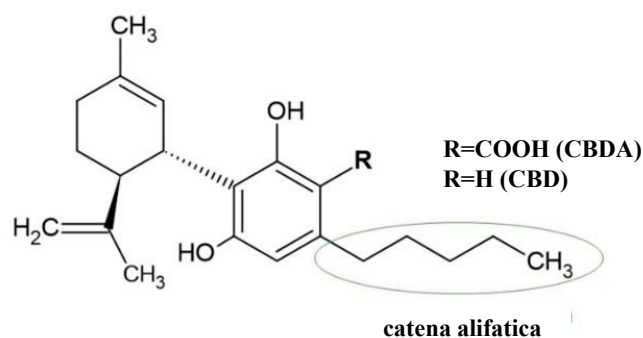


Figura 5. Struttura chimica del cannabidiolo (CBD, R=H) e dell'acido cannabidiolico (CBDA, R=COOH) [Kanabus *et al.*, 2021].

Il CBD è un fitocannabinoide molto studiato per le sue proprietà e applicazioni, apprezzato per l'assenza di psicoattività. I suoi bersagli molecolari sono numerosi in particolare, è agonista inverso del recettore cannabinoide tipo 1 (CB1) e antagonista del recettore cannabinoide tipo 2 (CB2), entrambi appartenenti al sistema endocannabinoide, ubiquitario nel corpo umano. Il CBD agisce inoltre come agonista nei confronti del recettore vanilloide 1 (TRPV1), dei recettori nucleari PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*) e dei recettori del sistema serotoninergico, in particolare il 5-HT1A, mentre agisce da antagonista nei confronti del recettore GPR55, recettore transmembrana associato a proteine G. In tutti questi casi, l'attività è relativamente modesta. I *target* del CBD non sono solo recettori ma anche enzimi, come l'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH), e canali ionici, in particolare il canale del calcio di tipo T. Da questa panoramica di interazioni derivano i numerosi effetti farmacologici

del CBD che spaziano dalla azione ansiolitica, a quella anticonvulsivante, antipsicotica, antidolorifica, antinfiammatoria, ipnotica, antitumorale e antiossidante (Figura 6) [Peng *et al.*, 2022; Martinez Naya *et al.*, 2023].

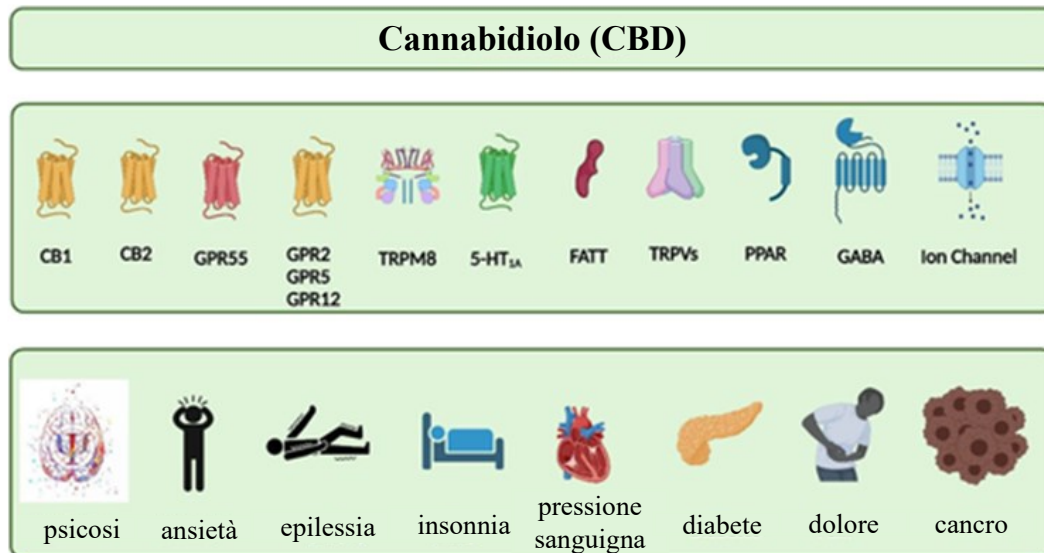


Figura 6. Rappresentazione delle principali aree terapeutiche su cui può agire il CBD e principali recettori coinvolti [Peng *et al.*, 2022].

Le potenzialità del CBD ad uso terapeutico sono sempre più supportate da evidenze scientifiche. L'azione anticonvulsivante del CBD, confermata da studi clinici, ha portato la Food and Drug Administration (FDA) nel 2018 ad approvare Epidiolex[®], una soluzione ad uso orale a base di CBD come adiuvante nelle patologie rare, quali la sindrome di Dravet e quella di Lennox-Gastaut che comportano crisi convulsive [FDA, 25 giugno 2018].

I fitocannabinoidi (CBs) appartengono alla classe chimica dei cannabinoidi terpenofenolici (C₂₁). I CBs, prodotti dalla pianta di cannabis, derivano da un unico precursore comune, il precannabigerolo, ovvero il CBGA, la molecola con il più basso grado di ossidazione tra i fitocannabinoidi conosciuti. Il CBGA viene sintetizzato (Figura 7) nei tricomi ghiandolari a partire dall'acido olivetolico (OA), il quale origina dalla via polichetidica cruciale per l'ottenimento dell'anello aromatico fenolico dei CBs, e dal geranil difosfato (GPP), prodotto dalla via del metileritritolo fosfato (MEP), principale via biosintetica per la produzione dei mono- e diterpeni. OA e GPP vengono riconosciuti e legati dall'enzima geraniltransferasi olivetolica (GOT) che attua l'isoprenilazione del OA ad ottenere il CBGA. Oltre ad un anello

aromatico e una catena pentilica il CBGA presenta un residuo carbossilico stabile, che determina la natura acida dei cannabinoidi acidi [Hanuš *et al.*, 2016].

In presenza di enzimi specifici, l'ossido-ciclizzazione della molecola di CBGA genera diversi metaboliti secondari: il Δ^9 -THCA, il CBCA e il CBDA. La possibilità di avere resine più ricche di THCA o CBDA dipende dalla genetica della pianta di partenza [Onofri *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021].

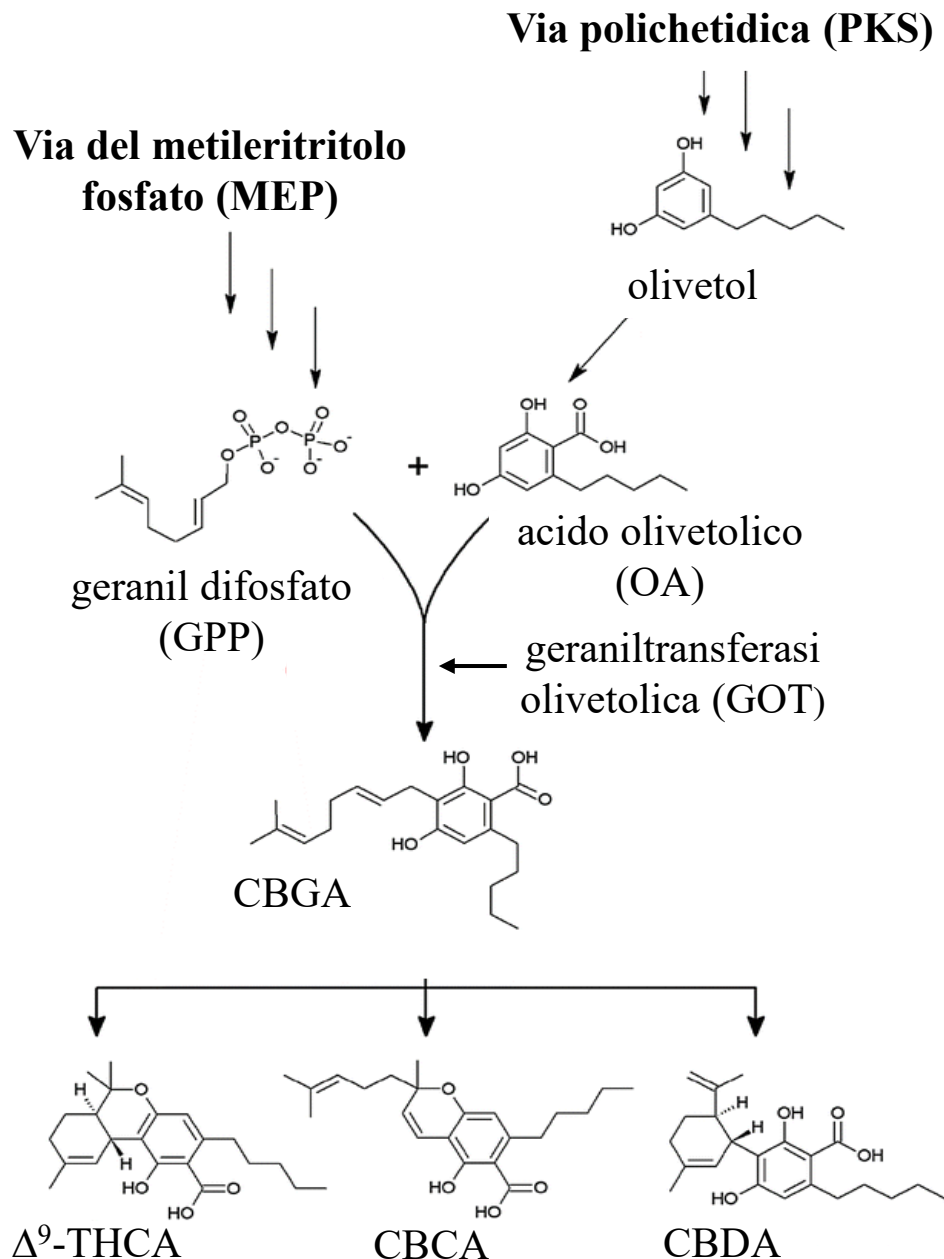


Figura 7. Via biosintetica di fitocannabinoidi.
La spiegazione delle sigle è riportata nel testo [Wróbel *et al.*, 2018].

2.3. Fitocomplesso ed effetto “*entourage*”

Con “effetto *entourage*” si intende l’effetto sinergico che può scaturire da un insieme di molecole di classi diverse come quelle contenute in un estratto *full spectrum* di cannabis [Russo *et al.*, 2019]. Un estratto a spettro completo può contenere fino a 500 molecole diverse, tra cannabinoidi, terpenoidi, flavonoidi, spiroindani, stilbenoidi e fenantreni (Figura 8) [Radwan *et al.*, 2021].

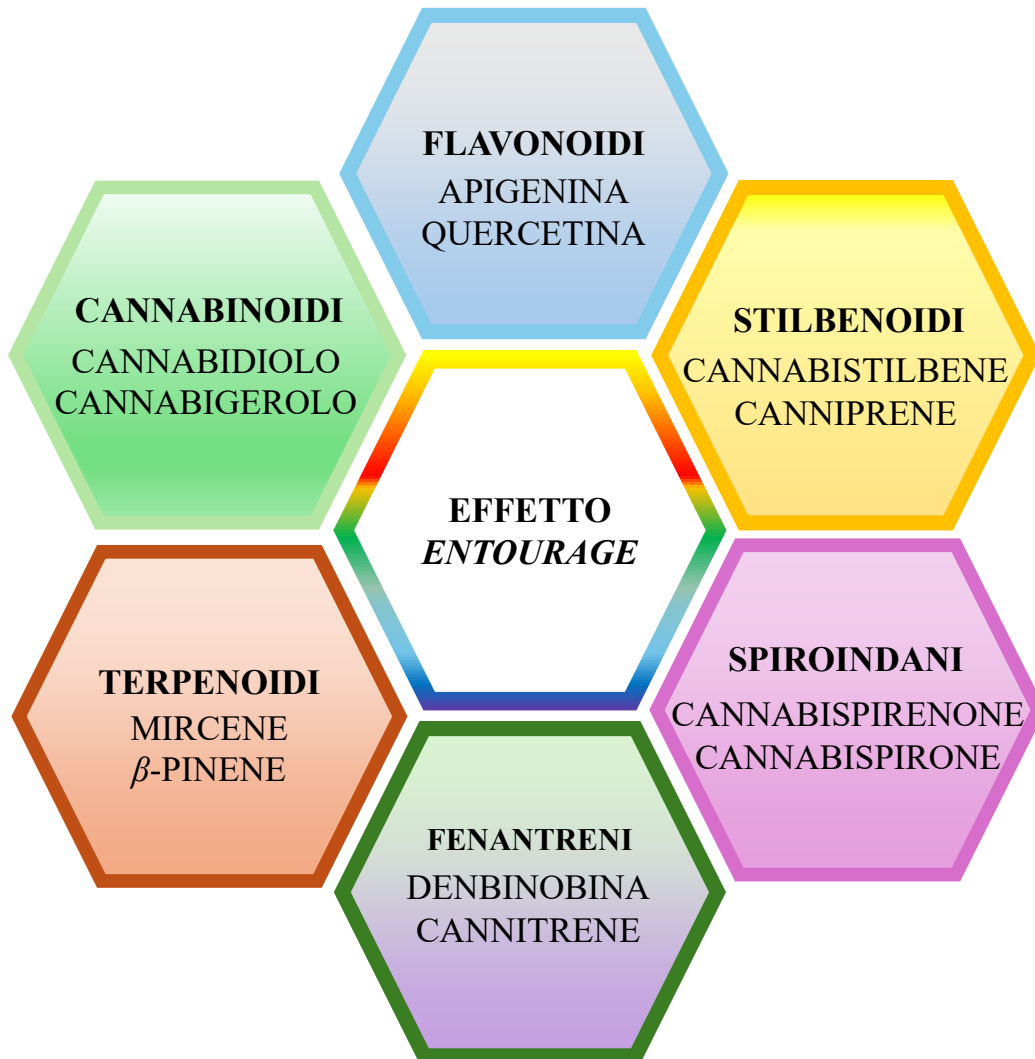


Figura 8. Molecole presenti in un estratto di cannabis responsabili dell'effetto entourage.

Il CBD ha la potenzialità di esercitare l'effetto “*entourage*”, in quanto l'azione allosterica negativa sul recettore CB1 antagonizza l'azione agonista del THC su questo recettore. La somministrazione di CBD e THC, in un rapporto bilanciato, permette così di contrastare i sintomi di ansia e sedazione legati all'azione del THC [Russo *et al.*, 2006].

I terpeni sono una classe molto vasta ed eterogenea di molecole, che assumono rilevanza farmacologica quando presenti nella cannabis a concentrazioni pari o superiori a 0,05% [Odieka *et al.*, 2022]. Uno studio condotto nel 2021 relativo all'interazione terpenoidi-cannabinoidi ha dimostrato l'attività dei terpeni sui recettori dei cannabinoidi CB1, sia *in-vitro* che *in-vivo*. β -cariofillene, α -humulene e il β -pinene sono stati definiti “cannabimimetici” e se ne suggerisce l'utilizzo per il potenziamento dell'azione terapeutica dei principali cannabinoidi [LaVigne *et al.*, 2021].

“L'effetto *entourage*” pone le basi per l'impiego degli estratti vegetali per produrre medicinali al fine di sfruttare appieno gli effetti benefici che può apportare la pianta di *Cannabis sativa* L., senza limitarsi esclusivamente all'azione che deriva da un singolo metabolita secondario [Russo *et al.*, 2011].

3. Tecniche estrattive e importanza dei solventi

Il solvente che si utilizza per il processo estrattivo ha un impatto significativo sul risultato finale, in termini quantitativi e qualitativi, determinando l'insieme di numerose classi chimiche (fitocomplesso) ricavabili dalla pianta di cannabis [Tzimas *et al.*, 2024].

I cannabinoidi presentano generalmente una bassa polarità, per la presenza di gruppi idrossilici fenolici e del gruppo carbossilico per i fitocannabinoidi acidi, mentre la classe dei terpenoidi è prevalentemente apolare in quanto costituita da più unità isopreniche come, per esempio, il mircene. Questi metaboliti presentando caratteristiche chimico-fisiche differenti non verranno estratti nello stesso modo da un unico solvente [Ciolino *et al.*, 2018].

Nella Tabella 1 sono riportate le costanti dielettriche (ϵ) dei principali solventi usati per l'estrazione dei cannabinoidi. Questa costante è indice della polarità di un solvente. Solventi apolari, come l'esano, presentano una costante dielettrica bassa mentre solventi polari, come l'acqua, sono caratterizzati da costante dielettrica elevata [Haynes *et al.*, 2014].

Tabella 1. Costante dielettrica di alcuni dei solventi impiegati per l'estrazione della cannabis [Haynes *et al.*, 2014].

Solvente	Costante dielettrica (ϵ)
Esano	1,8
Acetone	21,0
Etanolo	25,3
Metanolo	33,0
Acqua	80,1

L'Agenzia europea per i medicinali (EMA), organizzazione preposta al controllo dei prodotti medicinali immessi nel mercato, collabora con le autorità regolatorie per la stesura delle linee guida per i solventi utilizzabili nella lavorazione e produzione di prodotti farmaceutici. Le linee guida ICH (*International Council for Harmonisation*) suddividono i solventi in tre classi, classe 1, classe 2 e classe 3, a seconda del grado di tossicità per la salute umana. Alle aziende farmaceutiche è consigliato, ove possibile, l'impiego di solventi non pericolosi, collocati nella classe 3, come ad esempio etanolo, butanolo e acetone. Maggiori restrizioni riguardano invece

l'uso di metanolo, cloroformio ed esano, appartenenti alla classe 2, intrinsecamente tossici per l'uomo [<https://database.ich.org>].

Nello studio di Brighenti *et al.* è stato evidenziato che i solventi polari come etanolo, metanolo, ma anche quelli leggermente meno polari come miscele di metanolo e cloroformio (per es. 9:1), sono da preferire per l'estrazione dei principali cannabinoidi rispetto a solventi apolari come l'esano. Tra vari solventi testati, tuttavia, l'etanolo è risultato essere quello con polarità più adatta per l'estrazione dei cannabinoidi, soprattutto quelli acidi come il CBDA [Brighenti *et al.*, 2017].

Il crescente mercato della cannabis richiede la standardizzazione dei suoi prodotti per una migliore qualità e sicurezza per l'utilizzatore. Risulta quindi necessario stabilire le metodiche di produzione, raccolta e lavorazione ideali per l'ottenimento degli estratti di canapa [Namdar *et al.*, 2018].

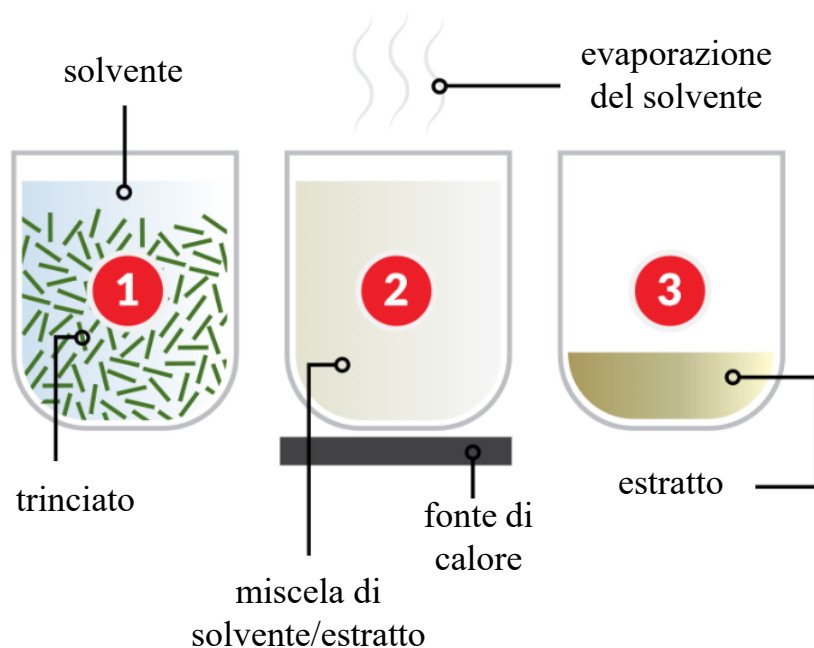


Figura 9. Rappresentazione del processo estrattivo tramite solvente: 1 dispersione del materiale vegetale in opportuno solvente; 2 filtrazione del composto; 3 ottenimento dell'estratto [www.powerblanket.com].

Uno studio ha confrontato i risultati di estrazioni effettuate per macerazione diretta di infiorescenze prelevate da differenti posizioni lungo il fusto della pianta: in cima, nelle parti

centrali e alla base. Ciascuna frazione di materiale vegetale raccolta nei diversi punti è stata trattata con tre diversi solventi, al fine di valutare la miglior resa del processo estrattivo. I solventi utilizzati sono stati etanolo, esano e una miscela esano/etanolo (7:3 v/v). Le analisi dei diversi estratti effettuate mediante HPLC e GC-MS hanno permesso di evidenziare che le quantità di cannabinoidi e di terpenoidi erano maggiori nel caso dell'estrazione delle infiorescenze apicali e impiegando la miscela esano/etanolo. Anche la selezione del materiale vegetale di partenza ha influito sul risultato finale: le infiorescenze apicali maggiormente esposte alla luce presentavano il maggior quantitativo di cannabinoidi e di terpenoidi, a differenza delle infiorescenze secondarie, formatesi nei rami centrali della pianta, e quelle localizzate nella parte bassa, cresciute con una minore esposizione luminosa [Namdar *et al.*, 2018].

L'estrazione con solventi, come etanolo, acetone, alcool isopropilico, esano e cloroformio, è una procedura relativamente semplice ed efficiente, che richiede tempi brevi. Nonostante questi vantaggi, i solventi organici risultano pericolosi in quanto infiammabili, volatili e tossici. Alla luce di ciò, sono state proposte nuove tecniche estrattive, dette "green", che non richiedono l'impiego di solventi organici, poco sostenibili dal punto di vista ambientale e potenzialmente pericolosi la salute umana [Micalizzi *et al.*, 2021].

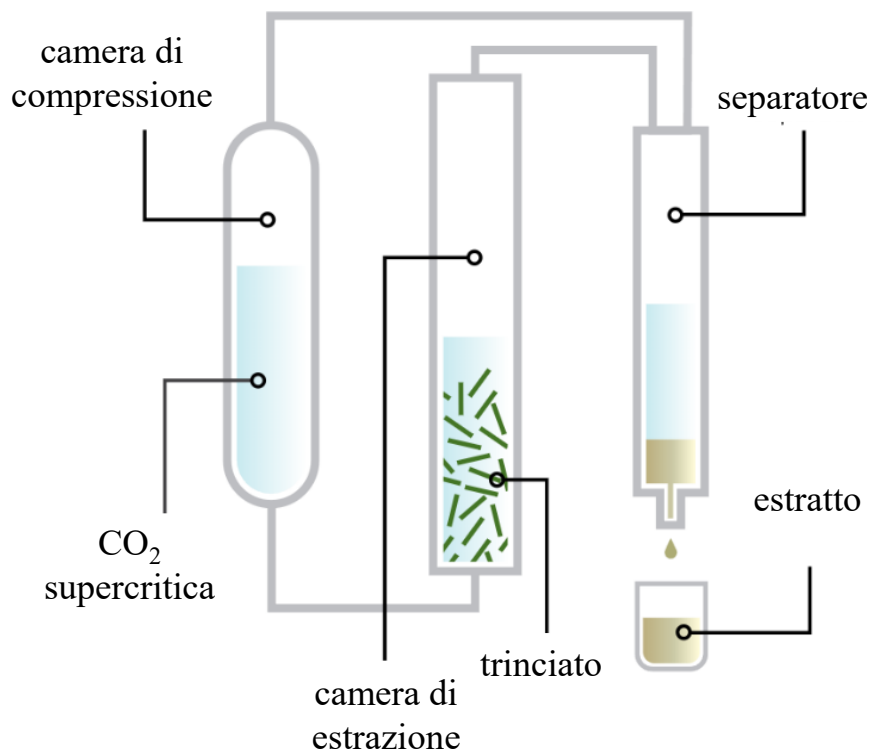


Figura 10. Rappresentazione del processo di estrazione con CO₂ supercritica [www.powerblanket.com].

È stato dimostrato per esempio che con l'estrazione con CO₂ supercritica (Figura 10) è possibile ottenere alte rese di CBD e THC a partire dalla pianta, precedentemente essiccata e macinata, anche senza l'utilizzo di co-solventi. Inoltre, è possibile selezionare i parametri del processo estrattivo per raggiungere una certa selettività dei principali cannabinoidi, con l'opportunità di separare i componenti psicoattivi da quelli non psicoattivi [Rochfort *et al.*, 2020].

L'estrazione con fluido supercritico è di importanza significativa per l'ottenimento di composti bioattivi da matrici vegetali di alto valore in ambito alimentare e farmaceutico [De Aguiar *et al.*, 2023]. La CO₂ supercritica, frequentemente utilizzata come principale solvente per questa tecnica estrattiva, raggiunge il suo stato supercritico a 31,1 °C e 72,9 atm: in queste condizioni presenta caratteristiche chimico-fisiche intermedie tra quelle di un gas e quelle di un liquido, in quanto riesce a penetrare nella matrice vegetale come un gas e ad estrarre i composti di interesse come un liquido. Inoltre, le basse temperature di impiego permettono di preservare molecole termolabili. La CO₂ supercritica è atossica, non infiammabile, facilmente reperibile, riciclabile e ha un costo superiore rispetto ai solventi organici tradizionali, come l'esano, l'acetone e

l'etanolo, impiegati nell'estrazione con solvente (Figura 9). La CO₂ supercritica inoltre è un solvente classificato come GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro): a condizioni ambientali si presenta allo stato gassoso ed evita per questo di lasciare residui nei prodotti farmaceutici o alimentari [Cvjetko Bubalo *et al.*, 2015].

4. Sistema endocannabinoide cutaneo

Nell'antichità i preparati a base di cannabis, o le stesse foglie, venivano impiegati per la guarigione delle ferite, per trattare le problematiche della pelle e addirittura per bendare i defunti. Oggi è noto che questo impiego, che era basato su intuizioni ed esperienza umana, ha una base scientifica che trova spiegazione nell'esistenza del sistema endocannabinoide cutaneo (SEC) (Figura 11) [<https://cannabiscienza>]. Diversi studi hanno evidenziato come il corretto funzionamento del SEC sia implicato nel mantenimento dell'omeostasi delle principali funzioni fisiologiche della pelle, come la proliferazione dei cheratinociti, componente cellulare fondamentale per conferire impermeabilità e quindi garantire un'azione difensiva verso l'ambiente esterno, e il rilascio di mediatori pro- e/o antinfiammatori da parte delle cellule del sistema immunitario. L'azione da parte dei ligandi endogeni, anandamide (AEA) e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), sui recettori CB1 e CB2 a livello del follicolo pilifero è coinvolta nel regolare l'allungamento del fusto del pelo, mentre a livello della ghiandola sebacea influenza la produzione di sebo. È chiaro che l'alterazione di questo sistema, implicato in numerose funzioni dell'apparato tegumentario, è causa di patologie cutanee come la dermatite atopica, l'acne *vulgaris*, la pelle secca e la sensazione pruriginosa. La scoperta di questo sistema ha aperto le porte all'indagine di possibili applicazioni topiche e transdermiche da parte dei ligandi esogeni per i recettori del SEC, ossia i fitocannabinoidi [Bíró *et al.*, 2009].

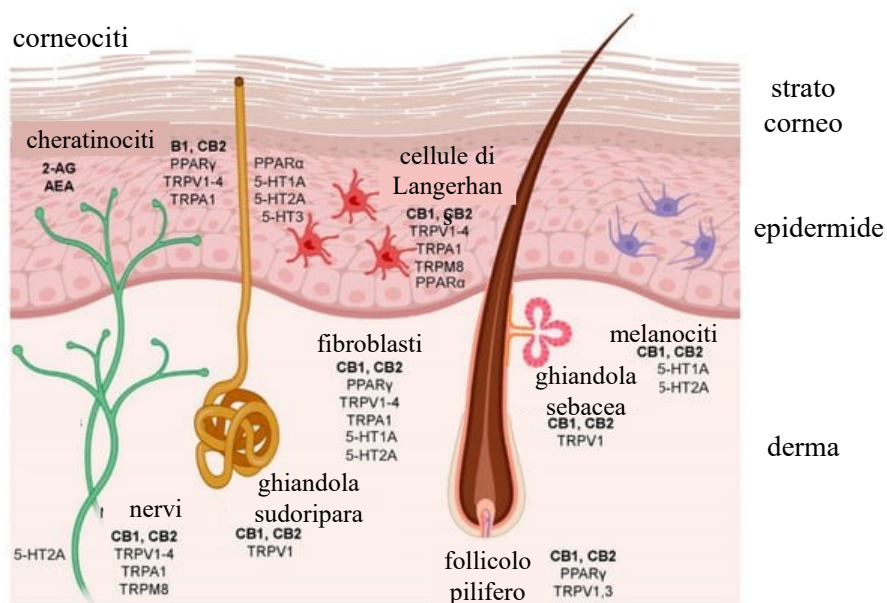


Figura 11. Localizzazione dei recettori del sistema endocannabinoide nella cute [Mnekin *et al.*, 2021].

4.1. Somministrazione topica e transdermica di cannabinoidi

La pelle è l'organo più esteso del corpo umano e rappresenta anche la zona di somministrazione di molecole attive incorporate in preparazioni semisolidi come creme e gel ma anche cerotti transdermici. Le formulazioni topiche possono determinare un effetto locale oppure sistemico; si ricorre a questo tipo di preparazione perché presenta vantaggi quali la semplicità di applicazione, permette l'auto-medicazione e non causa dolore o possibili infezioni dovute all'utilizzo di aghi impiegati in caso di somministrazioni endovenosa o intramuscolare [Prausnitz *et al.*, 2008].

La via topica e quella transdermica permettono di *bypassare* le problematiche legate al metabolismo di primo passaggio, complicanza che insorge a seguito di somministrazione orale dei principali fitocannabinoidi. Il THC e il CBD subiscono infatti una diminuzione importante della loro biodisponibilità orale, ridotta al 13÷20% e determinano anche un'inibizione dell'attività degli enzimi mitocondriali CYP450, portando a complicanze in soggetti in politerapia [Mahmoudinoodezh *et al.*, 2022; Nasrin *et al.*, 2021].

I bersagli terapeutici di formulazioni ad uso cutaneo possono essere molti: lo strato corneo per migliorare l'idratazione o debellare le micosi; gli annessi cutanei quali i follicoli piliferi per trattare follicoliti o l'acne *vulgaris*; i cheratinociti attivi localizzati nell'epidermide per il trattamento di dermatite atopica e psoriasi, fino ad arrivare alle terminazioni nervose presenti nel derma per un'azione anestetica [Roberts *et al.*, 2021].

Per superare lo strato corneo, struttura della cute che maggiormente limita il processo di diffusione, le molecole devono presentare specifiche caratteristiche fisico-chimiche, come un ridotto peso molecolare, logP compreso tra 1 e 3 e basso punto di fusione. Il CBD ha peso molecolare ridotto (314,47 Da) ma coefficiente di ripartizione (logP 6) superiore a quello ottimale per una somministrazione topica e scarsa solubilità in acqua, caratteristiche che ne complicano la permeazione attraverso la cute. Risulta quindi necessaria, per la sua somministrazione topica, la messa a punto di una formulazione che permetta di superare questi ostacoli e che consenta la diffusione del CBD negli strati cutanei [Vanti *et al.*, 2021].

Per ottimizzare una formulazione topica a base di CBD alcuni autori hanno valutato l'utilizzo di diversi solventi per individuare quello più appropriato al tipo di molecola e alla via di somministrazione. Casiraghi *et al.* hanno condotto uno studio di permeazione *ex-vivo*,

attraverso membrana di cadavere, impiegando celle di diffusione di Franz. È risultato che la miscela di glicole propilenico/acqua 80:20 p/p permetteva di garantire una ritenzione nella membrana più elevata rispetto a solventi quali glicole polietilenico 400, olio di oliva e paraffina liquida [Casiraghi *et al.*, 2020].

4.2. Studi di permeazione

L'assorbimento di molecole attraverso membrane biologiche o artificiali può essere studiato tramite esperimenti *in-vitro* o *ex-vivo*. Lo studio della permeazione di attivi funzionali viene condotto tramite l'impiego di celle di diffusione orizzontali o verticali, al fine di determinarne il possibile effetto locale o sistemico [Colombo *et al.*, 2015].

Gli esperimenti di permeazione *in-vitro* condotti con membrane di sintesi o biologiche trovano impiego in differenti settori, dall'ambito farmaceutico a quello cosmetico. La conoscenza dell'assorbimento delle molecole somministrate per via topica è il primo passo per la valutazione del profilo farmacocinetico e la loro successiva azione farmacologica e tossicologica. Grazie a questi modelli di studio in membrana è possibile evidenziare precocemente il potenziale rischio di tossicità e irritazione di determinate sostanze [Ponmozhi *et al.*, 2021].

MEMBRANE PER GLI STUDI DI PERMEAIONE

L'avvento della cella di Franz ha permesso di ampliare la scelta delle membrane da impiegare per condurre gli studi di permeazione cutanea *in-vitro*. La pelle umana presenta delle complicazioni nel processo di preparazione e nella conservazione: una volta escissa la pelle non si riesce a garantirne l'integrità per più di una settimana circa, senza contare i costi e la difficile reperibilità [Wester *et al.*, 1998].

Negli ultimi decenni sono state ideate nuove membrane artificiali utilizzate come alternativa delle membrane biologiche. Le membrane sintetiche sono facilmente reperibili e conservabili, e riducono le variabilità che caratterizzano invece le membrane biologiche escisse da donatori di diversa età, sesso ed etnia. Esse sono state infatti sviluppate e progettate con caratteristiche sia strutturali che chimiche, per imitare la stratificazione cutanea, al fine di condurre studi

dermatologici che permettano di predire la permeazione cutanea a costi contenuti. Il limite principale delle membrane sintetiche è l'assenza di componenti attive come le cellule di Langerhans, i corneociti, i melanociti, i vasi sanguigni e linfatici [Neupane *et al.*, 2020].

Le varie tipologie di materiali utilizzati per la produzione delle membrane garantiscono compatibilità con i solventi, adeguata porosità e non danno origine a preoccupazioni di tipo etico. Per lo studio della diffusione di molecole funzionali presenti in preparazioni ad uso cutaneo è possibile impiegare membrane sintetiche costituite da diversi materiali, come la cellulosa, il chitosano e il polidimetilsilossano. Le membrane biomimetiche Strat-M® (Merck Millipore) di recente introduzione hanno dimostrato una buona riproducibilità nei confronti della cute umana e ridotta variabilità nelle repliche dei risultati di permeazione avendo una struttura uniforme, caratteristica invece non costante nella cute umana escissa [Ponmozhi *et al.*, 2021].

A differenza delle membrane idrofile a base di cellulosa, le membrane Strat-M® presentano un carattere idrofobico in quanto subiscono un trattamento con una miscela di lipidi sintetici in proporzione tale da cercare di imitare lo strato corneo della cute umana [Haq *et al.*, 2018], costituito appunto da corneociti appiattiti intrecciati in una matrice lipidica e proteica fondamentale per la corretta salute della pelle e per svolgere la funzione protettiva dell'apparato tegumentario. I corneociti producono i lipidi, come la ceramide, che fungono da "collante" per le cellule stesse e creano una barriera chimica verso gli agenti esterni [Baroni *et al.*, 2012].

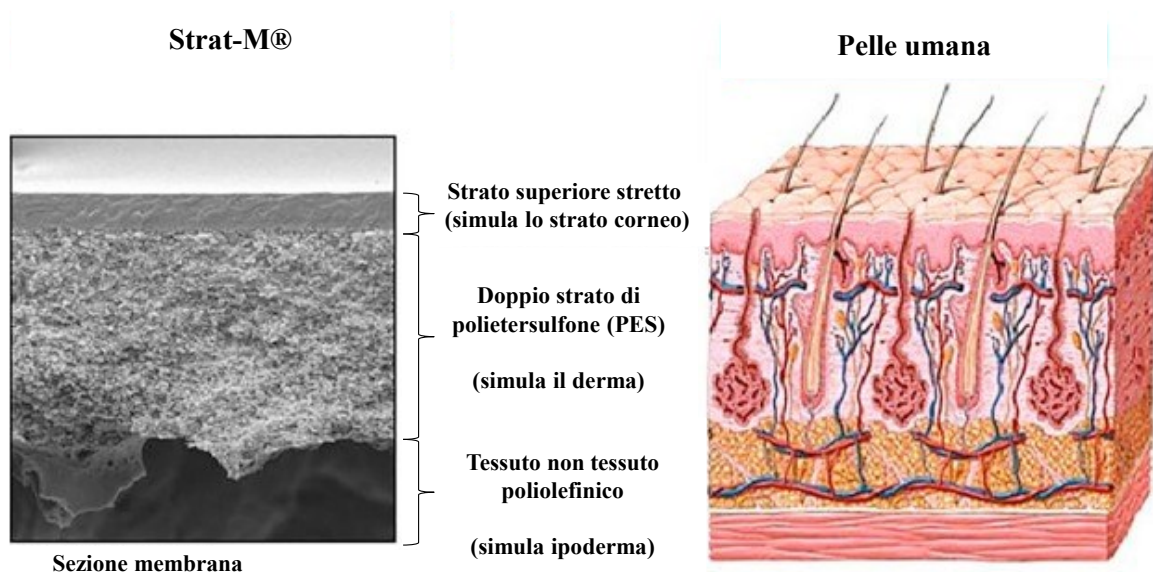


Figura 12. Confronto tra membrana Strat-M® e gli strati della cute umana [Haq *et al.*, 2018].

La particolarità di questa membrana, che le consente di simulare quella cutanea (Figura 12), è la presenza di multistrati polimerici caratterizzati da differenti porosità e permeabilità. Lo strato superiore della membrana Strat-M[®] si presenta compattato e morfologicamente simile allo strato corneo. Subito sotto lo strato compatto si trova un doppio strato di polietersulfone (PES), progettato per simulare il derma, e uno strato inferiore di tessuto non tessuto poliolefinico il quale, avendo una maggiore porosità dello strato di PES, permette una migliore diffusione delle molecole [Neupane *et al.*, 2020; Haq *et al.*, 2018].

Nell'insieme Strat-M[®] si presenta come una membrana porosa, di colore bianco e uno spessore dei diversi strati che la costituiscono che aumenta dall'alto verso il basso, per un valore complessivo di 300 μm [Uchida *et al.*, 2015].

5. Cannabinoidi ad uso veterinario

L'utilizzo della cannabis sull'uomo ha portato a risultati terapeutici positivi. Grazie a questo successo, negli ultimi anni sta aumentando l'interesse per l'impiego dei principali cannabinoidi anche in medicina veterinaria, in quanto possono essere proposti per la gestione del dolore, le crisi epilettiche e un miglioramento generale della qualità di vita degli animali domestici. Gli studi clinici al momento disponibili sugli animali sono limitati e di breve durata. Tuttavia, per una maggior chiarezza sugli aspetti farmacocinetici e di tollerabilità dei cannabinoidi in ambito veterinario sono necessari ulteriori approfondimenti [Di Salvo *et al.*, 2023].

La via di somministrazione orale è quella maggiormente esplorata in medicina veterinaria. Sono stati condotti degli studi che hanno previsto la somministrazione di CBD sotto forma di gomme morbide, capsule *softgel*, compresse e infusi [Di Salvo *et al.*, 2023]. Un olio contenente CBD è stato somministrato *per os* nei cani per il trattamento del dolore da osteoartrite (OA). I risultati sul livello del dolore sono stati misurati tramite questionari validati (*Canine Brief Pain Inventory*). Al termine del trattamento è stato registrando un significativo miglioramento della qualità della vita dell'animale con un punteggio del dolore diminuito [Gamble *et al.*, 2018].

È stato pubblicato uno studio sui benefici della somministrazione dei cannabinoidi anche su equini per il trattamento di stereotipie: atteggiamenti non naturali e ripetitivi che danneggiano la salute dell'animale. La somministrazione orale di CBD a esemplari da corsa soggetti a stereotipie causate da allenamenti intensivi ha portato rapidamente a un miglioramento dei livelli di salute dell'animale [Cunha *et al.*, 2023].

Sono stati condotti degli studi sugli animali per valutare l'efficacia dei cannabinoidi somministrati in modalità diverse da quella orale. Il CBD è stato somministrato a cani per via orale sotto forma di compressa, per via intranasale mediante una soluzione e per la via rettale sotto forma di supposte. Queste vie di somministrazione sono state selezionate per evitare il metabolismo di primo passaggio e ottenere così concentrazioni plasmatiche di CBD più elevate. Tuttavia, dai risultati ottenuti, la via di somministrazione orale si è confermata la migliore tra le tre alternative, con concentrazioni plasmatiche di CBD più alte [Polidoro *et al.*, 2022].

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DEL LAVORO

Nel corso degli anni è cresciuto molto l'interesse scientifico verso i fitocannabinoidi come il CBD, il THC e il CBG, metaboliti secondari della pianta di *Cannabis sativa* L. Gli effetti anticonvulsivanti, antinfiammatori e analgesici dei principali fitocannabinoidi, che trovano applicazione nel trattamento del dolore, sono stati descritti in numerosi studi.

La via di somministrazione maggiormente esplorata per i cannabinoidi è quella orale; tuttavia, l'assunzione per *os* dei cannabinoidi presenta degli ostacoli legati principalmente alla loro scarsa solubilità in acqua e a un elevato metabolismo di primo passaggio epatico cui sono soggetti.

Il potenziale utilizzo terapeutico dei fitocannabinoidi per il trattamento di patologie che colpiscono l'apparato tegumentario, come la psoriasi, la dermatite atopica e l'acne *vulgaris*, ha recentemente dato impulso allo sviluppo di formulazioni topiche a base di fitocannabinoidi, che permettono di esercitare l'effetto terapeutico direttamente sul sito di applicazione, evitando sia l'effetto del metabolismo di primo passaggio sia gli effetti indesiderati conseguenti alla somministrazione sistemica [Tijani *et al.*, 2021].

Oggetto di questo lavoro è stato lo studio di diversi fitoestratti di canapa industriale in vista del loro potenziale impiego in preparazioni farmaceutiche o cosmetiche. I fitoestratti, forniti da un'azienda locale, sono stati ottenuti mediante un processo brevettato che ha previsto il ricorso a solventi di estrazione a polarità differente.

Sulla base della composizione quali-quantitativa, sono stati selezionati tre fitoestratti, AC12.3, AC2 e AC3.3, per condurre uno studio di permeazione *in-vitro* attraverso membrana sintetica biomimetica. La determinazione quantitativa dei principali fitocannabinoidi, CBD e CBDA, presenti in ciascuna delle frazioni derivanti dagli esperimenti di permeazione è stata effettuata mediante HPLC.

Il fitoestratto più promettente è stato utilizzato per la messa a punto di una formulazione preliminare di supposte ad uso veterinario, le quali sono state caratterizzate e sottoposte a studio di stabilità.

Lo stesso estratto è stato inoltre impiegato in un altro lavoro sperimentale, condotto in parallelo a questo nel laboratorio di tecnologia farmaceutica e cosmetica del Dipartimento di Scienze del

Farmaco (UPO), inerente allo sviluppo di preparazioni topiche a base di cannabinoidi [Guala, 2024].

MATERIALI

1. Solventi

ETANOLO (Sigma-Aldrich S.r.l.)

È un liquido incolore, dall'odore caratteristico e pungente, miscibile con l'acqua.

METANOLO (Honeywell Riedel-de Haën™)

È un liquido incolore, miscibile con l'acqua, molto volatile e facilmente infiammabile.

GLICOLE PROPILENICO (Sigma-Aldrich S.r.l.)

È un liquido inodore, incolore, viscoso e altamente igroscopico. Miscibile con acqua, acetone e cloroformio.

Nella Tabella 2 sono riportate le caratteristiche dei solventi utilizzati per l'esperimento di permeazione.

Tabella 2. Caratteristiche e proprietà dei solventi utilizzati.

Solvente	Formula bruta	Massa molecolare [g/mol]	Temperatura di ebollizione [°C]	Densità [g/cm³]	Tensione di vapore [hPa, 19,6 °C]
Etanolo	C ₂ H ₆ O	46,07	78,40	0,79	57,20
Metanolo	CH ₃ OH	32,04	64,70	0,79	128,00
Glicole propilenico	C ₃ H ₈ O ₂	76,09	188,20	1,04	0,20

2. Cannabinoidi

CANNABIDILOLO (CBD)

Cannabinoide non psicoattivo fornito dal Laboratorio di Fitochimica del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università del Piemonte Orientale. Si presenta come una polvere inodore di colore giallo pallido. Ha peso molecolare di 314,47 g/mol; è un acido debole con pKa 9,13. Presenta una natura lipofila (logP 6) che ne determina una buona solubilità in oli e solventi organici e solubilità in acqua molto bassa (circa 0,10 µg/mL) [Vanti *et al.*, 2021].

ACIDO CANNABIDIOLICO (CBDA)

Cannabinoide non psicoattivo fornito dal "Laboratorio chimico Extracta Srl". Si presenta come una polvere biancastra, inodore e di granulometria fine. Il CBDA ha peso molecolare di 358,48 g/mol, presenta maggiore acidità e lipofilia del CBD di cui è precursore, con pKa 3,41 e logP 6,43. Ne consegue una buona solubilità in solventi organici e una solubilità in acqua superiore a quella del CBD (2-10 µg/mL) [Formato *et al.*, 2020].

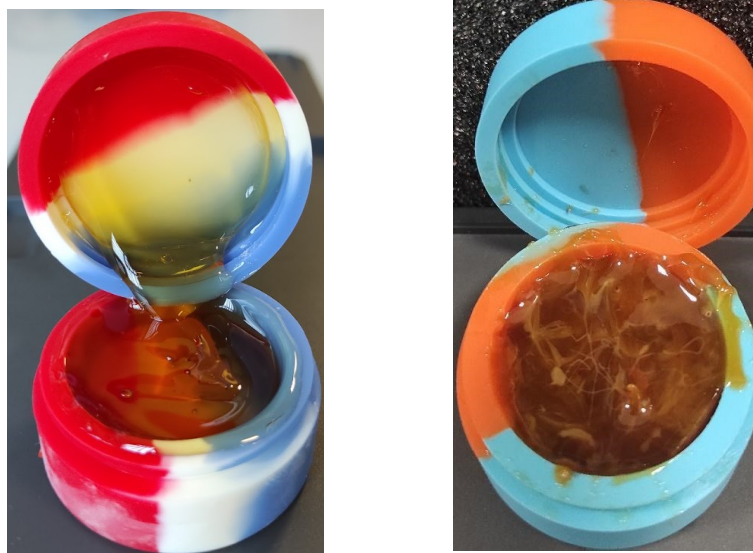
3. Estratti di canapa industriale

Gli estratti utilizzati in questo lavoro sono stati forniti dal "Laboratorio chimico Extracta Srl".

Tutti gli estratti si presentavano come resine dense di colore giallo-arancio, con odore caratteristico.

Sono stati identificati con le seguenti sigle: AC10.6; AC10.8; AC10.11; AC27.6; AC2; AC3.3; AC12.3.

Gli estratti sono stati conservati in un contenitore ermetico, al riparo dalla luce e in frigorifero (4 °C). In Figura 13 a titolo di esempio sono stati riportati gli estratti AC2 (a) e AC12.3 (b).



a *b*
Figura 13. Estratti AC2 (a) e AC 12.3 (b).

4. Eccipienti utilizzati per la preparazione di supposte a uso veterinario

WITEPSOL® H15 (Farmalabor)

È una miscela di origine vegetale di mono-, di- e trigliceridi costituita principalmente da acidi grassi C12-C18. Si presenta sotto forma di *pellets* cerosi, biancastri e insolubili in acqua. Il materiale fonde nell'intervallo di temperatura 30 °C÷45 °C e ha punto di gocciolamento a 33,5 °C÷35,5 °C. Questo eccipiente è caratterizzato da indice di ossidrilico di 5÷15 mg KOH/g.

Il principale ambito di applicazione di questo ingrediente è quello della formulazione di supposte.

SUPPOCIRE® AM (Farmalabor)

È una miscela di origine vegetale di mono-, di- e trigliceridi costituita soprattutto da acidi grassi C10-C18 e C12-C18. Si presenta sotto forma di *pellets* cerosi, bianchi e insolubili in acqua.

Il materiale fonde nell'intervallo di temperatura 30 °C÷45 °C e ha punto di gocciolamento a 35,0 °C÷36,5 °C. Questa base può essere utilizzata per la preparazione di supposte che includono principi attivi acidi in quanto presenta un basso indice di ossidrilico (4 mg KOH/g) e garantisce una buona stabilità alle formulazioni che la contengono.

STRUMENTI

- Suppostiera in metallo.
- Bilancia analitica XB 220A, Precisa.
- Bilancia tecnica BP 510S, Sartorius.
- Agitatore magnetico TK22, Tecnokartell.
- Bagno a ultrasuoni F30 ultratemp 2000, Julabo.
- Celle di diffusione di Franz, Colaver.
- Membrana sintetica per test di permeazione *in-vitro* Strat-M[®], Merck.
- Nastro adesivo per tape stripping 3M, Transpore[®].
- Camera climatica, modello HPP110, Memmert.
- Termogravimetro TGA 4000, Perkin Elmer.
- Evaporatore rotante Laborota 4002 – digital, Heidolph.
- Sistema HPLC, Shimadzu:
 - 2 Pompe: LC – 10 AD Vp
 - Controller: SCL – 10 A Vp
 - Campionatore automatico: SIL-10 AD Vp
 - Degasatore: DGU-14-A
 - Rivelatore a matrice di fotodiodi SPD-M10A Vp
 - Colonna: Thermo Synchronis aQ C18, 150 mm × 4,6 mm, (5 μm) protetta con un SecurityGuard[®] (Phenomenex).

METODI

1. Metodo estrattivo

Gli estratti di canapa industriale utilizzati in questo lavoro sono stati forniti da un'azienda locale, il "Laboratorio chimico Extracta Srl". I diversi fitocomplessi sono stati denominati AC27.6, AC12.3, AC2, AC3.3, AC10.6, AC10.8 e AC10.11. Ciascun estratto è stato ottenuto seguendo una procedura brevettata che prevede come prima operazione quella di produrre un estratto acetone primario ottenuto da *kief* e infiorescenze di canapa industriale, chemotipo IV [Cuadari, 2023].

Dopo l'estrazione il prodotto è stato filtrato per l'eliminazione della parte vegetale, così da ottenere un liquido viscoso (*raw extract*, RE). Il RE oltre ai principali cannabinoidi contiene anche elementi non desiderati come le cere e acidi grassi, i quali devono essere rimossi in quanto facilmente ossidabili.

Questo prodotto è stato quindi sottoposto a "winterizzazione", tecnica che consiste nella dispersione del RE in un solvente adatto, in genere metanolo o etanolo. La dispersione così ottenuta è stata messa in un maceratore a contatto con un'opportuna fase stazionaria, per 12 ore, sotto costante agitazione. Successivamente si è proceduto con l'incubazione del prodotto per altre 12 ore a -20 °C, fino a flocculazione, compattazione e separazione di cere e acidi grassi.

Il prodotto "winterizzato" è stato successivamente filtrato tramite filtro Büchner, per effettuare l'eliminazione delle molecole psicoattive e contemporaneamente del materiale lipidico depositatosi sul fondo del maceratore pre-refrigerando gli strumenti utilizzati. Queste cere rappresentano un prodotto di scarto.

L'estratto "winterizzato" è stato sottoposto a decolorazione mediante eliminazione della clorofilla in modo da evitare processi ossidativi associati alle sue proprietà sensibilizzanti nei confronti dell'ossigeno, con il conseguente cambio di colore; in seguito, è stato eliminato il solvente utilizzando un rotavapor impostato a 55 °C e 60 mBar.

Le concentrazioni di THC e THCA presenti nell'estratto devono essere in linea con quelle della "Convenzione Unica sugli Stupefacenti" [<https://antidroga.interno.gov.it>]. Per questo motivo,

per ridurre il tenore delle molecole psicoattive presenti nel fitoestratto, durante il processo di “winterizzazione” è stata utilizzata un’opportuna fase stazionaria.

Dal prodotto iniziale trattato con questa tecnica estrattiva è stato possibile ottenere un estratto, denominato *purified hemp extract*, con una resa di processo compresa tra il 60% e il 70%.

In particolare, per l’ottenimento dei fitocomplessi AC12.3, AC3.3, AC10.6, AC10.8, AC10.11 e AC27.6 l’estrazione primaria è stata condotta con acetone mentre l’estrazione secondaria è stata effettuata con metanolo per l’estratto AC12.3 e acetone per tutti gli altri estratti.

Nel caso del fitocomplesso AC2 invece l’estrazione primaria è stata effettuata con un fluido supercritico e quella secondaria con etanolo.

2. Analisi termogravimetrica dei fitoestratti

L'analisi termogravimetrica (TGA) fa parte di un gruppo di metodi di analisi che consente di misurare la perdita di massa di un campione sottoposto ad un programma termico in una specifica atmosfera. Inoltre, il profilo del termogramma di un campione analizzato mediante TGA permette di determinare la temperatura a cui inizia a decomporre (*Tonset*) [European Pharmacopoeia, 2023].

Il termogravimetro permette di misurare la variazione di massa di un campione in funzione della temperatura (da temperatura ambiente fino a 1000 °C - 1600 °C) con elevata accuratezza grazie alla presenza di una termobilancia che presenta sensibilità dell'ordine del µg, permettendo di ottenere risultati affidabili anche utilizzando quantitativi di campione molto piccoli, dell'ordine di pochi mg. La TGA permette di determinare la presenza di eventuali solventi organici residui in campioni ottenuti ad esempio per estrazione con solvente, così come i livelli di umidità delle polveri ottenute mediante processo di essiccamento. La TGA è di rilevante importanza sia nell'ambito della ricerca di base sia in quello della ricerca applicata: viene impiegata per studiare il comportamento di decomposizione di materie plastiche e per i processi fisici come la vaporizzazione di molecole volatili all'interno di estratti naturali [Holler *et al.*, 2009].

In questo lavoro di tesi l'analisi termica è stata effettuata per studiare il comportamento termico delle molecole di CBD e CBDA e dei fitoestratti ottenuti per estrazione da infiorescenze di canapa. Sono stati analizzati i seguenti campioni:

- CBD
- CBDA
- AC10.6
- AC10.8
- AC10.11
- AC27.6
- AC2
- AC3.3
- AC12.3

Le analisi sono state effettuate impiegando il termogravimetro TGA 4000 (Perkin-Elmer) alle seguenti condizioni: circa 10-20 mg di ciascun campione sono stati posti in un crogiolo di ceramica posto nella fornace del termogravimetro; l'analisi è stata condotta mediante flusso di azoto (20 mL/min) con velocità di riscaldamento di 10 °C/min, in un *range* di temperatura compresa tra 30 °C e 500 °C.

3. Esperimenti di permeazione

Gli esperimenti di permeazione offrono la possibilità di studiare l'assorbimento cutaneo di molecole attive incorporate in formulazioni farmaceutiche liquide o semisolide attraverso l'uso di membrane sintetiche o biologiche: possono essere condotti studi *in-vitro* ed *ex-vivo*. Le celle di diffusione di Franz a modello verticale sono usate come strumento di prima scelta per la sperimentazione *in-vitro* in ambito farmaceutico e cosmetico. Come membrane possono essere adoperate quelle di sintesi principalmente costituite da polidimetilsilossano, acetato di cellulosa e polisulfone, oppure membrane biologiche di origine umana o animale [Haq *et al.*, 2018].

3.1. Preparazione delle soluzioni degli esperimenti di permeazione

Per gli esperimenti di permeazione degli estratti attraverso membrane biomimetiche sono state preparate due soluzioni, la “soluzione ricevente” e la “soluzione donatrice”. Per quanto riguarda la fase donatrice al fine di valutarne l'influenza del tipo di estrazione sul comportamento di permeazione sono stati selezionati gli estratti AC2, A12.3 e AC3.3, ottenuti attraverso processo di estrazione con solventi differenti. Lo studio è stato condotto anche con CBD e CBDA per valutare l'eventuale influenza di componenti non-CBs sulla permeazione cutanea.

SOLUZIONE RICEVENTE

Per gli esperimenti di permeazione nel compartimento ricevente della cella di diffusione di Franz è stata utilizzata una miscela etanolo/acqua 50/50 p/p, così preparata: etanolo assoluto e acqua deionizzata sono stati pesati su bilancia analitica e successivamente uniti e miscelati. La miscela è stata conservata in contenitore ermetico per evitare l'evaporazione dell'etanolo.

SOLUZIONE DONATRICE

I fitoestratti AC2, AC12.3 e AC3.3 sono stati dispersi in una miscela di glicole propilenico/acqua 80/20 p/p, veicolo già utilizzato in precedenti lavori per lo studio di permeazione del CBD e considerato più adatto di altri solventi come, per esempio, l'olio di oliva o il glicole polietilenico (PEG 400) [Casiraghi *et al.*, 2020; Picco *et al.*, 2023].

Per ogni esperimento sono state preparate dispersioni di ciascuno dei fitocomplessi AC2, AC12.3 e AC3.3 e soluzioni di CBD e CBDA: a questo scopo in *vials* di vetro sono stati pesati circa 13 mg, 17 mg e 11 mg rispettivamente dei fitoestratti (quantitativi equivalenti a 1% p/p di CBD+CBDA) e circa 10 mg di CBD e CBDA (1% p/p).

Successivamente mediante pipetta automatica è stata aggiunta la miscela di glicole propilenico/acqua 80/20 p/p fino al volume di 1 mL. I *vials* con le dispersioni sono stati posizionati su agitatore magnetico e agitati per due ore, al buio, fino a omogenea dispersione degli estratti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati ottenuti sono stati espressi come la media di tre esperimenti.

3.2. Procedimento dello studio di permeazione

La cella di Franz utilizzata in questo studio è costituita da una camera donatrice, nella quale è stata posta la soluzione donatrice (1 mL), e una camera ricevente della capacità di 14 mL, riempita con la soluzione ricevente di etanolo/acqua (Figura 14). All'interno della camera ricevente è stata inserita un'ancoretta magnetica in modo da mantenere omogenea la soluzione. Interposta tra le due camere è stata posizionata una membrana sintetica, Strat-M[®] (Millipore), con la parte lucida rivolta verso la camera donatrice. L'area di diffusione tra i compartimenti donatore e ricevente era pari a 1,77 cm².

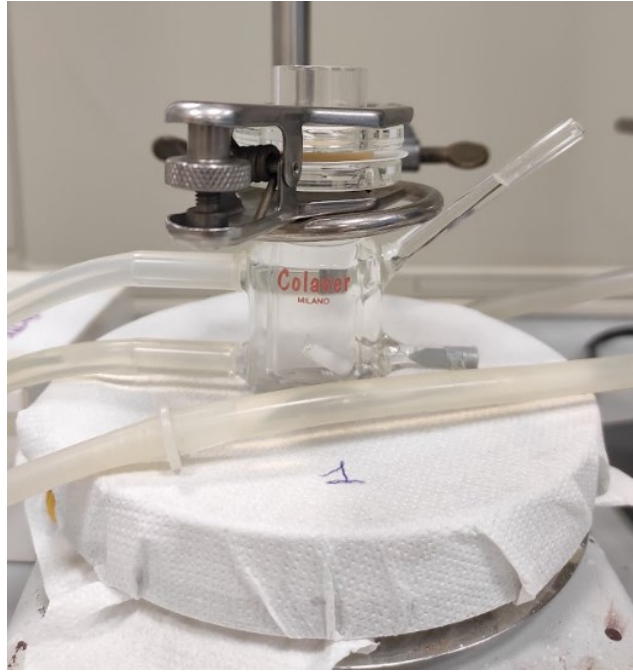


Figura 14. Cella di diffusione utilizzata nei test di permeazione.

Prima di caricare la soluzione donatrice, i due compartimenti sono stati fissati tramite una pinza metallica con chiusura a vite così da evitare perdite di prodotto. Inoltre, per evitare l'evaporazione della soluzione donatrice la relativa camera è stata sigillata con Parafilm®.

L'intera apparecchiatura è stata posizionata su un agitatore magnetico impostato alla velocità di 300 rpm. Per tutta la durata dell'esperimento la camera ricevente presentava una camicia esterna collegata ad un bagno ad acqua termostata a 37 °C: in questo modo è stato possibile simulare a livello della membrana una temperatura di circa 33 °C ÷ 37 °C, temperatura media della cute umana [Lan *et al.*, 2019].

Aliquote di 200 µL di soluzione ricevente sono state prelevate tramite siringa dal braccio di campionamento della camera ricevente a tempi prestabiliti: dopo 1 ora, 3 ore, 4 ore, 5 ore e 24 ore dall'avviamento dell'esperimento.

Per mantenere il volume di 14 mL all'interno della camera ricevente, dopo ogni prelievo è stato effettuato un rabbocco con la miscela etanolo/acqua. Tutte le aliquote prelevate sono state poste in *vials* e conservate in freezer (-18 °C) fino al momento della determinazione quantitativa effettuata mediante analisi cromatografica HPLC.

Al termine degli esperimenti sono state recuperate e poste in apposite provette la fase donatrice e quella ricevente. La membrana biomimetica è stata lavata con 10 mL di acqua deionizzata per

eliminare il residuo di soluzione donatrice, successivamente è stata lasciata ad asciugare su piastra Petri per 30 minuti per poi essere sottoposta a tecnica di *tape stripping*. Per questa procedura è stato usato un segmento di 3 cm di nastro microforato 3M™ Transpore™, maneggiato con pinze metalliche per evitare contaminazioni. Tramite una spatola la membrana è stata tenuta ferma appoggiata su una piastra Petri. L'operazione di *stripping* è stata ripetuta per 35 volte, in linea con quanto descritto in letteratura per la rimozione completa dello strato corneo [Olesen *et al.*, 2019].

Membrana e nastro microforato sono stati riposti in opportune provette Falcon contenenti rispettivamente 30 mL e 10 mL di metanolo. Le provette sono state poste in un bagno ad ultrasuoni per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, membrana e nastro adesivo sono stati allontanati e le soluzioni di metanolo sono state conservate in freezer (-18 °C) fino al momento dell'analisi cromatografica.

4. Analisi cromatografica

La determinazione quantitativa di CBD e CBDA nei campioni derivanti dagli esperimenti di permeazione è stata effettuata mediante analisi cromatografica (HPLC). L'analisi è stata condotta in collaborazione con il laboratorio di Analisi dei Farmaci del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università del Piemonte Orientale.

Sono stati analizzati i seguenti campioni:

- “donatrice”: l'aliquota di soluzione donatrice residua sulla membrana biomimetica al termine dell'esperimento di permeazione; questo campione contiene i cannabinoidi che non sono penetrati nella membrana;
- “ricevente 24 ore”: la soluzione prelevata dal compartimento ricevente al termine dell'esperimento di permeazione. La concentrazione di cannabinoidi in questa frazione è associabile a quella che, teoricamente, potrebbe raggiungere la circolazione sistemica;
- “lavaggio membrana”: il campione di acqua utilizzato per lavare la membrana al termine dell'esperimento. Questo campione contiene i cannabinoidi che sono rimasti sulla membrana, senza riuscire a oltrepassarla;
- “estrazione nastro adesivo”: il metanolo impiegato per estrarre i cannabinoidi ritenuti nel nastro microforato 3M™ Transpore™ a seguito dell'operazione di *stripping*. Questo campione rappresenta i cannabinoidi che hanno abbandonato la fase donatrice e che sono rimasti adesi alla membrana;
- “estrazione membrana”: il metanolo adoperato per estrarre i cannabinoidi ritenuti nella membrana. I cannabinoidi in questa frazione sono associabili a quelli che, teoricamente, nella pelle potrebbero dare origine a un effetto locale;
- “fase ricevente”: aliquote prelevate dal compartimento ricevente dopo 1 ora, 3 ore, 4 ore, 5 ore; questi campioni permettono di studiare l'andamento nel tempo della permeazione dei cannabinoidi attraverso la membrana biomimetica.

Per l'analisi HPLC sono state costruite due rette di taratura, una per il CBD e l'altra per il CBDA. Le soluzioni madre di CBDA e CBD sono state preparate solubilizzando circa 10,0 mg di CBD e di CBDA esattamente pesati in 10 mL di metanolo.

Le soluzioni “ricevente a 24 ore” di tutti gli esperimenti di permeazione sono state analizzate dopo diluizione 1:100 con la miscela di glicole propilenico/acqua 80/20 p/p.

Per le soluzioni “estrazione membrana” di tutti gli esperimenti è stato eseguito il seguente trattamento: dopo aver allontanato il metanolo tramite evaporatore rotante, per risalire alla quantità di cannabinoidi presenti nella membrana, il soluto residuo è stato solubilizzato con 10 mL metanolo.

La determinazione quantitativa dei cannabinoidi presenti nel nastro adesivo (“estrazione nastro adesivo”), e quindi rimasti adesi sulla superficie della membrana al termine degli esperimenti, il residuo ottenuto dopo evaporazione del metanolo è stato solubilizzato con 5 mL di metanolo.

I risultati ottenuti dell’analisi cromatografica (HPLC) di tutti i campioni derivanti dagli esperimenti di permeazione sono stati elaborati per quantificare i CBs nelle diverse frazioni.

Il quantitativo di “totale diffuso” è stato calcolato come la somma cumulativa delle quantità di CBD e CBDA nelle frazioni “ricevente 24 ore”, “estrazione membrana”, “estrazione nastro adesivo” e “lavaggio membrana”, ad esclusione della frazione “donatrice”.

Le percentuali di CBD, di ogni esperimento, nelle frazioni “estrazione membrana”, “estrazione nastro adesivo”, “lavaggio membrana” e “ricevente a 24 ore” sono state calcolate rispetto al quantitativo “totale diffuso” di CBD, con la seguente equazione generale:

$$\% \text{ CBD nella frazione} = \frac{\text{quantità di CBD nella frazione}}{\text{quantità di CBD "totale diffuso"}} \times 100 \quad \text{Equazione 1}$$

Lo stesso procedimento è stato seguito per il calcolo delle percentuali di CBDA nelle frazioni “estrazione membrana”, “estrazione nastro adesivo”, “lavaggio membrana” e “ricevente a 24 ore”.

$$\% \text{ CBDA nella frazione} = \frac{\text{quantità di CBDA nella frazione}}{\text{quantità di CBDA "totale diffuso"}} \times 100 \quad \text{Equazione 2}$$

5. Preparazioni rettali a base di fitoestratto di canapa

Le preparazioni rettali, destinate alla somministrazione all'interno del retto, sono impiegate per indurre un effetto sistemico o locale, oppure a scopo diagnostico. Si possono presentare sotto forma di liquidi, semisolidi e solidi. La Farmacopea europea riporta che “le supposte sono preparazioni rettali solide monodose di dimensioni, forma e consistenza adatte all'uso rettale. Contengono uno o più principi attivi dispersi o disciolto in una base adatta che può essere solubile o disperdibile in acqua o potrebbero fondersi a temperatura corporea” [European Pharmacopoeia, 2023].

In questo lavoro come eccipiente per la formulazione di supposte a base di cannabinoidi non psicoattivi sono state adoperate due differenti miscele commerciali lipofile di trigliceridi semisintetici: Witepsol[®] H15 e Suppocire[®] AM, costituite da mono, di- e trigliceridi di origine naturale, che presentano punto di gocciolamento intorno a 33,5÷35,5 °C e 35,0÷36,5 °C rispettivamente e punto di fusione nell'intervallo compreso tra 30 °C e 45 °C per entrambe le miscele.

Sono state preparate differenti formulazioni di supposte ad uso veterinario. In un primo momento sono state formulate supposte prive di estratto (formulazioni di riferimento). Successivamente sono state preparate supposte contenenti il fitoestratto di canapa industriale AC3.3. Le diverse preparazioni formulate con l'estratto differivano sia per la composizione delle miscele di trigliceridi sia per la percentuale di estratto incorporato.

5.1. Preparazione di supposte a uso veterinario

Witepsol[®] H15 e Suppocire[®] AM, da soli o in miscela tra loro, sono stati posti in una capsula di ceramica e portati a fusione su bagnomaria, impostato a 70 °C. A fusione completa e sotto agitazione con bacchetta di vetro, nel caso delle formulazioni a base di cannabinoidi non psicoattivi è stato incorporato il fitoestratto AC3.3. La massa fusa è stata successivamente colata in una suppostiera metallica costituita da sei alvei del volume di 3 mL. La suppostiera è stata riposta al buio per il periodo necessario per la solidificazione della massa (circa tre ore), al termine del quale si è proceduto alla raschiatura del materiale in eccesso e infine all'apertura dello stampo per l'estrazione e il controllo delle supposte.

5.1. Controllo di qualità delle supposte

Le caratteristiche organolettiche delle supposte, tra cui forma, consistenza e colore, sono state valutate tramite osservazione diretta immediatamente dopo la loro estrazione dai rispettivi alvei della suppostiera.

Al fine di determinare il tempo impiegato per raggiungere il punto di rammollimento delle supposte, le stesse sono state introdotte in una camera climatica a 39 °C, valore selezionato per simulare la temperatura corporea interna di specie animali come bovini [Scanavez *et al.*, 2018], suini [Zakari *et al.*, 2021] ed equini [Kang *et al.*, 2023].

Le supposte sono state quindi introdotte in una provetta di vetro posizionata sul ripiano inferiore di una camera climatica (T=39 °C, 75% UR). È stato quindi annotato il tempo di rammollimento, ossia il primo istante in cui la supposta ha perso la propria integrità. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con una preparazione commerciale (Voltaren® supposte 100 mg).

5.2. Test di stabilità

La migliore formulazione di supposte è stata sottoposta a studio di stabilità; a questo scopo, sono state conservate in differenti condizioni: a temperatura ambiente ed esposte alla luce naturale oppure al buio, in un contenitore oscurato.

Dopo cinque giorni (t = 5gg) e dopo tre mesi (t = 3m) dalla preparazione delle supposte sono state valutate le modifiche riguardanti l'aspetto, ovvero la forma, consistenza e il colore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Estrazione

Gli estratti utilizzati in questo lavoro sono stati ottenuti a partire da infiorescenze di canapa industriale appartenenti al fenotipo CBDA predominante, varietà comunemente impiegata per la produzione di fibra e di semi [De Meijer *et al.*, 2014].

Tutti gli estratti sono stati analizzati per HPLC dal “Laboratorio chimico Extracta Srl”.

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati relativi alla composizione quali-quantitativa degli estratti AC12.3, AC3.3 e AC2.

Tabella 3. Composizione quali-quantitativa dei fitoestratti AC12.3, AC3.3 e AC2.

Abbreviazione	CANNABINOIDI	Percentuale (% p/p)		
		AC12.3	AC3.3	AC2
T-CBD	Totale cannabidiolo	57,50	87,43	77,30
CBD	Cannabidiolo	36,51	44,27	23,07
CBDA	Acido cannabidiolico	23,93	49,21	61,84
T-THC	Totale tetraidrocannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Δ^9 -THC	Delta-9-tetraidrocannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ
THCA	Acido tetraidrocannabinolico	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Δ^8 -THC	Delta-8-tetraidrocannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ
T-CBG	Totale cannabigerolo	0,11	0,45	0,58
CBG	Cannabigerolo	0,11	0,45	0,32
CBGA	Acido cannabigerolico	<LOQ	<LOQ	0,30
CBN	Cannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CBC	Cannabicromene	0,08	1,12	0,72
CBDV	Cannabidivarina	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CBDVA	Acido cannabidivarinico	0,06	<LOQ	<LOQ
THCV	Tetraidrocannabivarina	<LOQ	<LOQ	<LOQ

<LOQ = inferiore al limite di quantificazione.
I valori misurati erano inferiori al limite di rilevamento di 0,01% o 100 mg/Kg.
% p/p = percentuale di peso dell'analita/peso del prodotto come tale.
Per il calcolo delle quantità equivalenti delle forme neutre, le rispettive forme acide sono state moltiplicate per il fattore 0,877.
T-CBD = CBD+(CBDAx0,877)
T-CBG = CBG+(CBGAx0,877)
T-THC = THC+(THCAx0,877)

Come descritto nel brevetto di proprietà dell'azienda che ha fornito i fitoestratti, la tipologia di solvente impiegato nel processo estrattivo ha influenzato non soltanto le rese di processo e la consistenza dei tre fitoestratti ma anche la loro composizione quali-quantitativa in termini di fitocannabinoidi (CBs), ossia CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBC e CBDVA [Cuadari, 2023].

Nel caso di AC3.3, ottenuto con acetone sia in fase di estrazione primaria sia in quella secondaria, si è riscontrata la resa maggiore, espressa come “totale cannabidiolo” (T-CBD), di 87,43%, ripartito circa a metà tra CBD (44,27%) e CBDA (49,21%). L'estratto conteneva inoltre 0,45% di “totale cannabigerolo” (T-CBG) e 1,12% di CBC.

L'estratto AC12.3, prodotto con l'impiego di acetone e successivamente metanolo, ha presentato un T-CBD di 57,50%, di cui il 36,51% di CBD e 23,93% di CBDA. Sono state inoltre riscontrate tracce di T-CBG (0,11%), CBDVA (0,06%) e CBC (0,08%).

L'estratto AC2, ottenuto con fluido supercritico ed etanolo, è risultato avere un T-CBD di 77,30%, frazionato principalmente in CBD (23,07%) e CBDA (61,84%). Anche questo estratto ha mostrato tracce di CBC (0,72%) e T-CBG (0,58%).

In linea con quanto richiesto dalla normativa vigente, tutti e tre gli estratti hanno presentato concentrazioni irrilevanti di THC, con un “totale tetraidrocannabinolo” (T-THC) inferiore al limite di quantificazione (LOQ).

L'acetone, solvente caratterizzato da media polarità ($\epsilon = 21,0$, Tabella 1) è in grado di estrarre con ottime rese i CBs, contraddistinti da bassa polarità [Ciolino *et al.*, 2018]. L'estratto AC3.3 ha presentato infatti il quantitativo totale di fitocannabinoidi maggiore (87,83%), seguito dagli estratti AC2 (77,30%) e AC12.3 (57,50%).

Per il processo estrattivo di AC2 e AC12.3, per i quali sono stati utilizzati rispettivamente etanolo e metanolo, solventi a polarità superiore dell'acetone ($\epsilon = 25,3$ e $\epsilon = 33,0$ rispettivamente, Tabella 1), sono stati invece estratti quantitativi maggiori di composti diversi dai fitocannabinoidi, i non fitocannabinoidi (non-CBs).

L'estratto con il quantitativo maggiore di non-CBs è risultato essere AC12.3 (39,31%), seguito da AC2 (13,75%) e AC3.3 (4,95%) (Figura 15).

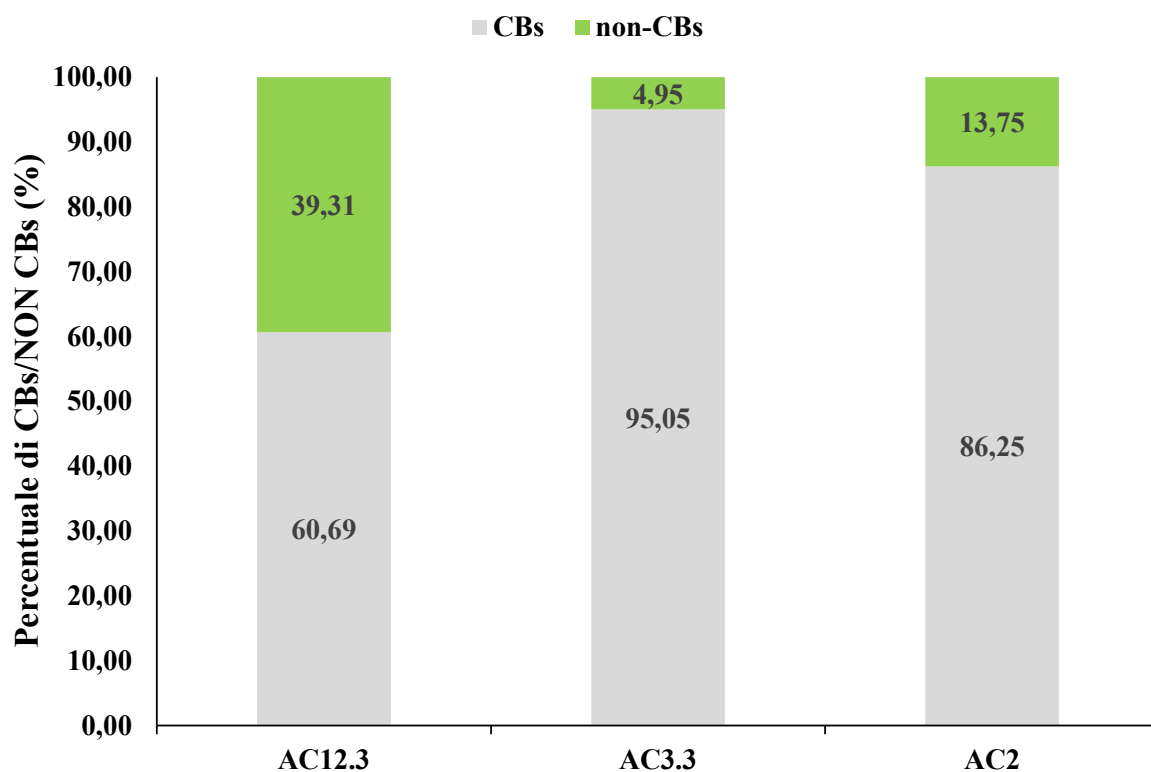


Figura 15. Istogramma raffigurante la percentuale di CBs e non-CBs negli estratti AC12.3, AC3.3 e AC2.

Sulla base della composizione quali-quantitativa dei fitoestratti AC12.3, AC3.3 e AC2, viene confermato che l'acetone è il solvente più efficace per ottenere un estratto caratterizzato da percentuali elevate di fitocannabinoidi e ridotte di non-CBs.

I risultati della composizione degli estratti AC27.6, AC10.6, AC10.8 e AC10.11 sono riportati nella Tabella 4.

Il processo estrattivo utilizzato per gli estratti AC10.6, AC10.8, AC10.11 e AC27.6, che ha previsto l'acetone sia per l'estrazione primaria che secondaria, ha dimostrato elevate prestazioni, come nel caso di AC3.3 (Tabella 3) ottenuto con lo stesso solvente. L'estrazione ha infatti portato a un prodotto caratterizzato da un T-CBD rispettivamente di 83,66%, 81,14%,

76,81% e 79,00%; questi valori sono considerati non significativamente differenti, a dimostrare la riproducibilità del metodo estrattivo impiegato partendo da infiorescenze appartenenti alla stessa varietà.

Tabella 4. Composizione quali-quantitativa degli estratti AC27.6, AC10.6, AC10.8 e AC10.11.

Abbreviazione	CANNABINOIDI	Percentuale (% p/p)			
		AC27.6	AC10.6	AC10.8	AC10.11
T-CBD	Totale cannabidiolo	79,00	83,66	81,14	76,81
CBD	Cannabidiolo	10,88	37,35	30,34	27,66
CBDA	Acido cannabidiolico	77,67	52,80	57,92	56,04
T-THC	Totale tetraidrocannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Δ^9 -THC	Delta-9-tetraidrocannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
THCA	Acido tetraidrocannabinolico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Δ^8 -THC	Delta-8-tetraidrocannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
T-CBG	Totale cannabigerolo	<LOQ	0,58	0,61	0,57
CBG	Cannabigerolo	<LOQ	0,48	0,47	0,42
CBGA	Acido cannabigerolico	<LOQ	0,12	0,16	0,17
CBN	Cannabinolo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CBC	Cannabicromene	<LOQ	0,91	0,70	0,61
CBDV	Cannabidivarina	<LOQ	0,07	0,06	0,07
CBDVA	Acido cannabidivarinico	<LOQ	0,11	0,13	0,16
THCV	Tetraidrocannabivarina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<LOQ = inferiore al limite di quantificazione.					
I valori misurati erano inferiori al limite di rilevamento di 0,01% o 100 mg/Kg.					
% p/p = percentuale di peso dell'analita/peso del prodotto come tale.					
Per il calcolo delle quantità equivalenti delle forme neutre, le rispettive forme acide sono state moltiplicate per il fattore 0,877.					
T-CBD = CBD+(CBDAx0,877)					
T-CBG = CBG+(CBGAx0,877)					
T-THC = THC+(THCAx0,877)					

Anche questi estratti erano contraddistinti da un T-THC inferiore al limite di quantificazione (LOQ).

L'estratto AC27.6 è risultato costituito principalmente da CBDA (77,67%) e CBD (10,88%): tale composizione è verosimilmente attribuibile alla minore decarbossilazione delle infiorescenze di canapa effettuata prima dell'estrazione. In questo estratto non sono state rinvenute tracce di metaboliti minori.

Le percentuali di CBD negli estratti AC10.6, AC10.8 e AC10.11 variavano tra 27,66% e 37,35%, mentre i quantitativi di CBDA sono risultati più elevati, rispetto al cannabinoide neutro, compresi tra 52,80% e 57,92%. Il T-CBG nei tre estratti è risultato prossimo a 0,60%.

In AC10.6 sono stati riscontrati quantitativi di CBD più elevati rispetto agli estratti AC10.8 e AC10.11, pari a 37,35% ma più bassi di CBDA (52,80%). AC10.8 ha mostrato le percentuali più elevate di CBDA (57,92%) e T-CBG (0,61%), mentre AC10.11 quelle più basse di CBD (27,66%) e T-CBG (0,57%).

Per quanto riguarda i costituenti minori degli estratti AC10.6, AC10.8 e AC10.11, come generalmente si riscontra nel caso di piante con fenotipo CBDA predominante, CBDV, CBDVA e CBC sono stati ritrovati in tracce. L'estratto AC10.6 ha presentato quantità più elevate di CBC (0,91%) rispetto a AC10.8 e AC10.11; pari quantità di CBDV (0,07%) sono state ritrovate negli estratti AC10.6 e AC10.11. L'estratto AC10.11 è risultato quello con il quantitativo maggiore di CBDVA (0,16%), seguito dagli estratti AC10.8 (0,13%) e AC10.6 (0,11%).

2. Esperimenti di permeazione

Per valutare le potenziali differenze di assorbimento cutaneo tra CBD e CBDA come tali e CBD e CBDA contenuti nei fitocomplessi sono stati condotti degli esperimenti di permeazione *in-vitro* attraverso le membrane biomimetiche Strat-M®.

In questo lavoro sono stati selezionati gli estratti AC2, AC3.3 e AC12.3 tra quelli resi disponibili dal “Laboratorio chimico Extracta Srl”, in ragione dei loro profili quali-quantitativi caratterizzati da differenti frazioni di non-CBs.

I risultati derivanti dall’analisi cromatografica (HPLC) di tutti i campioni degli esperimenti di permeazione condotti con i tre estratti sono stati confrontati tra loro al fine di selezionare quello più adatto alla somministrazione topica con effetto locale.

I risultati relativi alla determinazione quantitativa di CBD e CBDA sono stati elaborati e riportati in Tabella 5, espressi come la media di tre esperimenti.

Il “totale diffuso” percentuale è stato calcolato come la somma cumulativa delle quantità di CBD e CBDA nelle frazioni “ricevente 24 ore”, “estrazione membrana”, “estrazione nastro adesivo”, “lavaggio membrana” rispetto al totale di CBs caricato nella dispersione costituente la fase donatrice. Le quantità, espresse in percentuale, di CBD e di CBDA 1% p/p diffuse dalle soluzioni donatrici e dalle dispersioni preparate con 1% p/p di AC2, AC3.3 e AC12.3 sono risultate prossime al 25% ($24,8 \pm 2,5\%$) (Tabella 5, Figura 16).

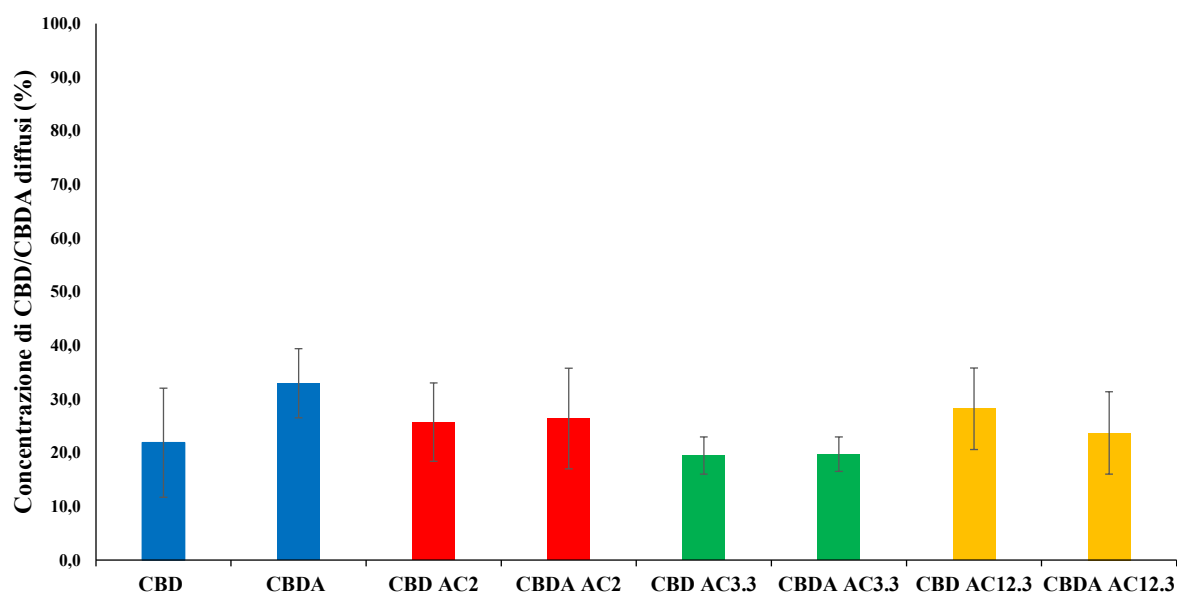


Figura 16. *Quantitativi cumulativi medi, espressi in percentuale, di CBD e di CBDA diffusi dalle soluzioni donatrici (DS: deviazione standard; n esperimenti = 3).*

Al termine di tutti gli esperimenti, la frazione “donatrice” conteneva quantitativi di CBD, espressi in percentuale rispetto al totale di CBs presenti nelle soluzioni/dispersioni caricate nella camera donatrice della cella di diffusione, che variavano tra circa 26% e 60%, mentre le percentuali di CBDA sono risultate più elevate, comprese tra circa 30% e 66%.

Una cospicua frazione di cannabinoidi, indipendentemente dall’inclusione nel fitoestratto, non è quindi diffusa dalla camera donatrice.

Questo risultato è in linea con quanto atteso nel caso di preparazioni topiche, per le quali il rilascio e la diffusione degli attivi in esse incorporati non sono completi.

Le percentuali relative alle frazioni “ricevente 24 ore”, “lavaggio membrana”, “estrazione membrana” ed “estrazione nastro adesivo” riportate nella Tabella 5 sono state calcolate sulla base del “totale diffuso”.

Tabella 5. Distribuzione percentuale di CBD e CBDA nelle diverse frazioni degli esperimenti di permeazione (DS: Deviazione Standard).

	Soluzione di CBD (%) ± DS	Soluzione di CBDA (%) ± DS	AC2		AC3.3		AC12.3	
			CBD (%) ± DS	CBDA (%) ± DS	CBD (%) ± DS	CBDA (%) ± DS	CBD (%) ± DS	CBDA (%) ± DS
“donatrice”	47,3	58,6	25,9	30,5	44,7	49,7	59,8	65,8
	± 3,3	± 2,5	± 13,2	± 16,1	± 17,1	± 20,5	± 0,1	± 1,6
“totale diffuso”	21,9	33,0	25,7	26,4	19,5	19,8	28,2	23,7
	± 10,2	± 6,4	± 7,3	± 9,4	± 3,5	± 3,2	± 7,6	± 7,7
“ricevente 24 ore”*	63,0	55,3	35,0	27,2	11,3	7,0	57,5	58,9
	± 2,6	± 23,1	± 4,0	± 5,0	± 0,1	± 0,1	± 11,6	± 14,5
“lavaggio membrana”*	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	1,1	0,8	2,1
				± 0,1		± 0,4	± 0,1	± 0,7
“estrazione membrana”*	34,1	33,8	55,6	56,4	89,5	91,2	41,6	38,6
	± 1,1	± 10,5	± 0,9	± 5,3	± 0,7	± 0,9	± 11,1	± 13,4
“estrazione nastro adesivo”*	0,3	0,0	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	± 0,1		± 4,8					
“recovery totale”	74,7	91,6	51,7	57,0	64,2	69,4	88,0	89,5
	± 10,0	± 3,8	± 5,9	± 6,8	± 13,7	± 17,3	± 7,5	± 9,3

*Le percentuali di CBD e CBDA sono state calcolate sulla base del “totale diffuso”.

Nei liquidi di lavaggio delle membrane (“lavaggio membrana”) e nelle soluzioni derivanti dall’estrazione dei CBs dal nastro adesivo impiegato per effettuare lo *stripping* delle membrane (“estrazione nastro adesivo”) sono stati riscontrati quantitativi di CBD e CBDA molto bassi. Nel “lavaggio membrana” sono stati ritrovati quantitativi di CBs molto bassi solo nel caso degli esperimenti condotti con gli estratti: le percentuali di CBDA negli estratti AC2, AC3.3 e AC12.3 variavano infatti tra 0,3% e 2,1%, mentre erano di 0,8% quelle del CBD nel caso di AC12.3.

Esclusivamente in AC2 nella frazione “estrazione nastro adesivo” si è riscontrata una significativa percentuale di CBD, pari al 9,5%. Questo risultato anomalo può essere imputato ad una possibile contaminazione del nastro adesivo durante l’esperimento.

In Figura 17 sono riportate le percentuali di CBD e CBDA presenti nella membrana biomimetica (“estrazione membrana”) e nella fase ricevente (“ricevente 24 ore”) degli esperimenti condotti con CBD, CBDA e con gli estratti AC2, AC3.3 e AC12.3.

Nelle soluzioni derivanti dall'estrazione dei CBs dalle membrane biomimetiche e nelle soluzioni delle frazioni “ricevente 24 ore” sono stati riscontrati quantitativi di CBD e CBDA significativamente maggiori rispetto a quelli delle frazioni “lavaggio membrana” e “estrazione nastro adesivo”.

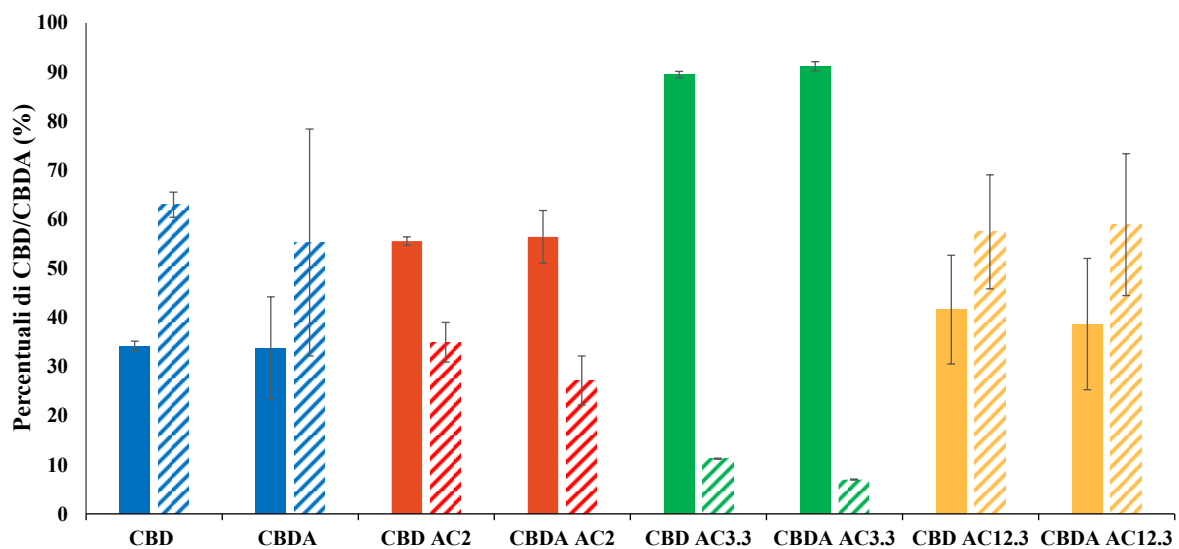


Figura 17. *Quantitativi di CBD e CBDA nella frazione “ricevente 24 ore” (colonna tratteggiata) e nella frazione “estrazione membrana” (colonna piena); (DS: deviazione standard; n esperimenti = 3).*

Sulla base dei risultati dell'istogramma sopra riportato è possibile affermare che il comportamento di permeazione attraverso la membrana biomimetica delle molecole di CBD e CBDA come tali è differente rispetto a quello delle stesse molecole incluse nei fitoestratti. La “ricevente 24 ore” rappresenta la frazione di cannabinoidi che ha permeato la membrana, oltrepassandola, fino ad arrivare nella camera ricevente. Le soluzioni di CBD e CBDA hanno mostrato percentuali di CBs permeati rispettivamente di 63,0% e 55,3%, mentre nel caso degli estratti AC2 e AC3.3 sono state riscontrate percentuali di CBD pari a 35,0% e 11,3% rispettivamente e di CBDA di 27,2% (AC2) e 7,0% (AC3.3).

AC12.3 ha mostrato le percentuali di CBD e di CBDA permeati maggiori, pari a 57,5% e 58,9%.

La frazione “estrazione membrana” esprime la quantità di CBs estratta dai diversi strati della membrana Strat-M[®] utilizzata nei diversi esperimenti di permeazione. Le percentuali maggiori di cannabinoidi ritenuti in membrana sono state ritrovate con l’estratto AC3.3 (91,2% di CBDA e 89,5% di CBD), seguito dall’estratto AC2 (56,4% di CBDA e 55,6% di CBD) e in ultimo l’estratto AC12.3 (38,7% di CBDA e 41,6% di CBD).

Al contrario, nel caso delle soluzioni di CBD e CBDA sono state riscontrate percentuali di CBs ritenuti nella membrana di 34,1% e 33,8% rispettivamente, pari a circa un terzo di quelle osservate con l’estratto AC3.3.

I risultati relativi alla frazione “estrazione membrana” degli esperimenti condotti con le dispersioni di fitoestratti hanno quindi dimostrato che si depositano quantitativi maggiori di CBs nella membrana rispetto a quanto osservato con le soluzioni di CBD e di CBDA, comportamento opposto a quello descritto per i quantitativi di CBs permeati attraverso e oltre la membrana biomimetica.

Emerge quindi che l’applicazione topica di CBD e CBDA dovrebbe prevederne la formulazione in forma di estratto, soprattutto se si desidera ottenere un effetto terapeutico locale.

La maggiore concentrazione di CBs in membrana è stata imputata alla presenza di componenti non-cannabinoidi, rispettivamente di 13,8%, 4,9% e 39,3% per gli estratti AC2, AC3.3 e AC12.3 (Figura 15). Le molecole incluse nella frazione di non-CBs, come i terpenoidi tra cui i monoterpeni e i sesquiterpeni, sono di natura lipofila e presentano quindi affinità per i lipidi presenti nella membrana Strat-M.

Il “recovery totale” percentuale di CBD e quello di CBDA è stato calcolato considerando i quantitativi cumulativi dei cannabinoidi presenti in tutte le frazioni dell’esperimento di permeazione rispetto al quantitativo di CBs presente nella soluzione/dispersione posta nella camera donatrice. Le percentuali di “recovery totale” riscontrate in questo lavoro sono in linea con quelle attese nel caso di esperimenti di permeazione condotti impiegando celle di diffusione di Franz. I quantitativi maggiori di CBs sono stati osservati per le soluzioni di CBDA (91,6%), CBD (74,7%) e per l’estratto AC12.3 che ha mostrato un elevato “recovery totale” sia per il CBD (88,0%) che per il CBDA (89,5%). Invece, per quanto riguarda gli estratti AC2 e AC3.3,

è stata registrata una perdita maggiore dei cannabinoidi, con “recovery totale” di CBD di circa 52% e 64% e del CBDA di 57% e 70% rispettivamente.

Alla luce dei risultati descritti, si può affermare che il comportamento di permeazione di CBs *in-vitro* dei fitoestratti AC2, AC3.3 e AC12.3 è influenzato in modo significativo dalla composizione quali-quantitativa e dalla polarità degli estratti, caratteristiche che dipendono dal solvente utilizzato per l'estrazione dalla pianta di cannabis.

Il metanolo utilizzato per l'ottenimento di AC12.3 ha costante dielettrica elevata ($\epsilon = 33,0$, Tabella 1) e ha quindi conferito caratteristiche polari all'estratto, costituito da una frazione di non-CBs contenente composti fenolici diversi dai cannabinoidi, come i flavonoidi, gli spiroindani, gli stilbenoidi e i fenantreni, tipici della pianta di canapa. Il carattere polare dell'estratto ha complicato la ritenzione dei CBs nella membrana, come dimostrato dalla DS elevata registrata per la frazione “estrazione membrana” (Tabella 5). In vista di un'eventuale applicazione topica, questo estratto risulterebbe poco efficiente qualora se ne ricercasse un'azione locale.

L'impiego di solventi meno polari del metanolo, come l'acetone ($\epsilon = 21,0$, Tabella 1) e l'etanolo ($\epsilon = 25,3$, Tabella 1) utilizzati rispettivamente per l'estratto AC3.3 e AC2, ha contribuito maggiormente all'estrazione di fitocannabinoidi e probabilmente di composti non-CBs di carattere apolare, come i terpenoidi, che presentano affinità per le membrane idrofobiche, come la membrana Strat-M[®], arricchita di una miscela di lipidi [Haq *et al.*, 2018].

La minore polarità degli estratti AC2 e AC3.3, rispetto a AC12.3, ha comportato l'accumulo di quantitativi di CBs nella membrana elevati. Le percentuali di AC3.3. (91,2% di CBDA e 89,5% di CBD) sono risultate superiori a quelle di AC2 (56,4% di CBDA e 55,6% di CBD).

Dai risultati ottenuti emerge quindi che al diminuire della polarità del solvente utilizzato per il processo estrattivo aumenta la ritenzione in membrana dei fitocannabinoidi.

3. Analisi termogravimetrica

Al fine di confrontarne il comportamento termico, CBD, CBDA e i fitoestratti AC10.6, AC10.8, AC10.11, AC27.6, AC2, AC3.3 e AC12.3 sono stati analizzati mediante analisi termogravimetrica (TGA). Nei profili termogravimetrici dei fitoestratti è stato possibile indentificare diversi *step*, il primo dei quali, a temperature comprese tra 30°C e 100°C, relativo all'evaporazione di solventi non completamente allontanati durante il processo estrattivo.

Lo *step* successivo è stato attribuito alla decarbossilazione dei fitocannabinoidi acidi che a temperature prossime a 100 °C perdono il residuo carbossilico sotto forma di CO₂, convertendosi quindi nella corrispondente forma neutra (Figura 18).

La temperatura alla quale inizia la decarbossilazione (*Tonset*) dei cannabinoidi acidi è stata estrapolata dalla funzione derivata (DTG) delle curve TGA dei diversi estratti.

Come ultimo *step*, a temperature superiori a 160 °C - 190 °C, si osserva la decomposizione del campione.

Ad esclusione del CBD, sono stati considerati due o più intervalli di temperatura.

Le percentuali sperimentali di perdita di peso, relative alla decarbossilazione dei fitocannabinoidi acidi, sono state confrontate con quelle teoriche calcolate tenendo conto del peso dell'anidride carbonica nelle molecole acide presenti nei diversi estratti (CBDA e CBGA).

I risultati sono riportati nella seguente Tabella 6. Come atteso, le perdite di peso registrate dallo strumento sono variate in funzione della composizione quali-quantitativa dei diversi estratti analizzati.

Tabella 6. Risultati dell'analisi termica di CBD, CBDA e fitoestratti.

Campione	CBD (%)	CBDA (%)	CBGA (%)	Intervallo di temperatura (°C)	Perdita di peso teorica (%)	Perdita di peso sperimentale (%)
CBD	98,0	---	---	30 ÷ 500	100	99,8
CBDA	---	98,0	---	30 ÷ 160	12,0	12,9
				160 ÷ 500	87,9	86,4
AC3.3	44,3	49,2	---	30 ÷ 160	6,4	6,7
				160 ÷ 500	93,6	91,9
AC2	23,1	61,8	0,3	30 ÷ 160	8,9	11,0
				160 ÷ 500	91,1	88,2
AC12.3	36,5	23,9	---	30 ÷ 100	---	0,9
				100 ÷ 190	4,8	11,6
				190 ÷ 500	95,2	87,3
AC10.6	37,3	52,8	0,1	30 ÷ 160	7,2	7,4
				160 ÷ 500	92,8	90,4
AC10.8	30,3	57,9	0,2	30 ÷ 160	8,0	8,8
				160 ÷ 500	91,0	89,2
AC10.11	27,7	56,0	0,2	30 ÷ 160	8,2	8,9
				160 ÷ 500	91,8	89,1
AC27.6	10,9	77,7	---	30 ÷ 190	10,8	14,6
				190 ÷ 500	89,2	84,2

Nelle Figure 18÷22 sono state riportate le curve termiche di tutti i prodotti analizzati.

La polvere di CBD da 30 °C a 500 °C mostra una perdita di peso di 99,8%, prossima a quella teorica di 100%, corrispondente alla decomposizione della molecola, con *Tonset* di 140 °C (Figura 18).

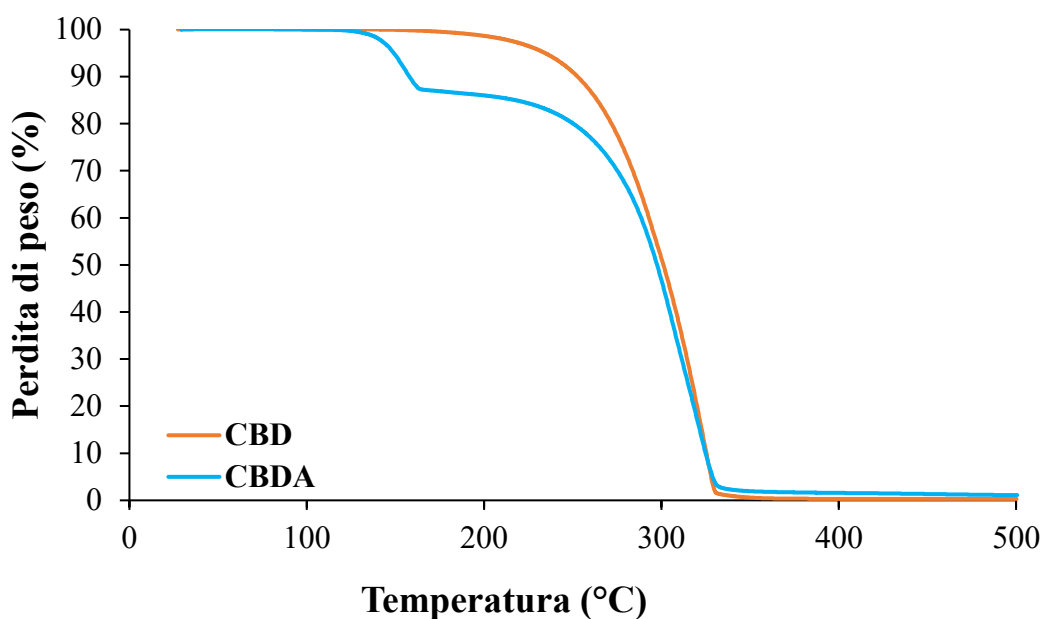


Figura 18. Profili termogravimetrici sovrapposti di CBD e CBDA.

Per quanto riguarda il CBDA, dalla curva termogravimetrica emerge che la decarbossilazione avviene tra 30 °C e 160 °C, con una perdita di peso di 12,9%, simile a quella teorica di 12,0%. La *Tonset* della decarbossilazione del CBDA è di circa 110 °C. La decomposizione del CBDA, ormai decarbossilato, prosegue quindi in modo simile a quanto osservato con il CBD (Figura 18).

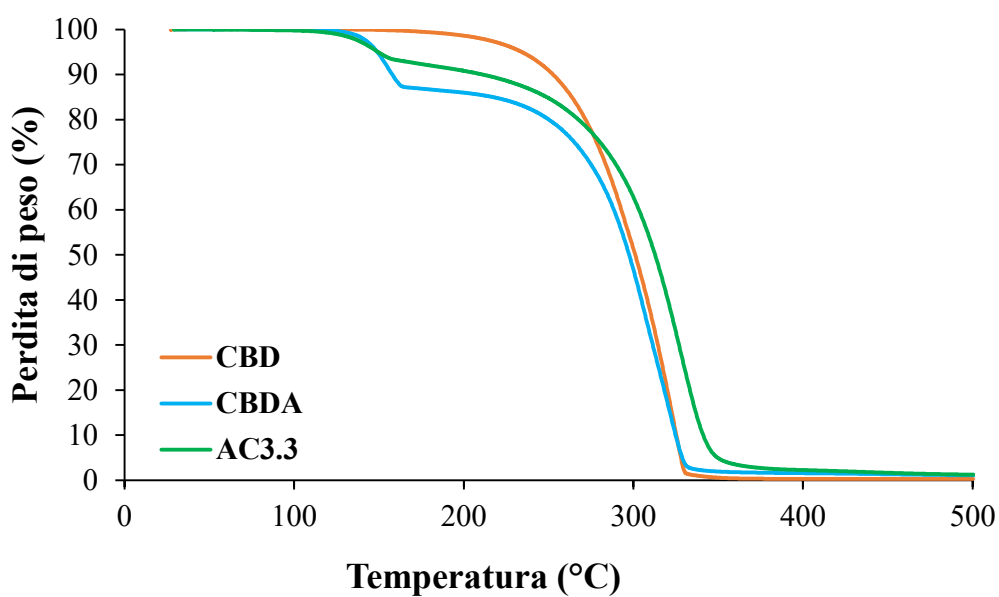


Figura 19. Profili termogravimetrici sovrapposti di CBD, CBDA e AC3.3.

Come si può osservare nella Figura 19, l'estratto AC3.3 presenta una perdita di peso nell'intervallo 30÷160 °C di 6,7%, simile a quella teorica di 6,4%. La *Tonset* della decarbossilazione delle molecole acide avviene a circa 100 °C, ovvero 10 °C in meno rispetto a quella del CBDA (110 °C).

La curva di AC3.3, nella sua parte terminale, risulta traslata a temperature maggiori rispetto a quelle di CBD e CBDA. Le differenze di temperatura, sia per quanto riguarda l'inizio della decarbossilazione che la fine della decomposizione di AC3.3 sono da imputare alla presenza, nel fitoestratto, della frazione di non-CBs (4,95% del peso totale di fitoestratto) contenente molecole, come i terpenoidi e flavonoidi i quali, a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche, degradano a temperature differenti.

Nella Figura 20 sono riportate le curve TGA di CBD, CBDA e AC2.

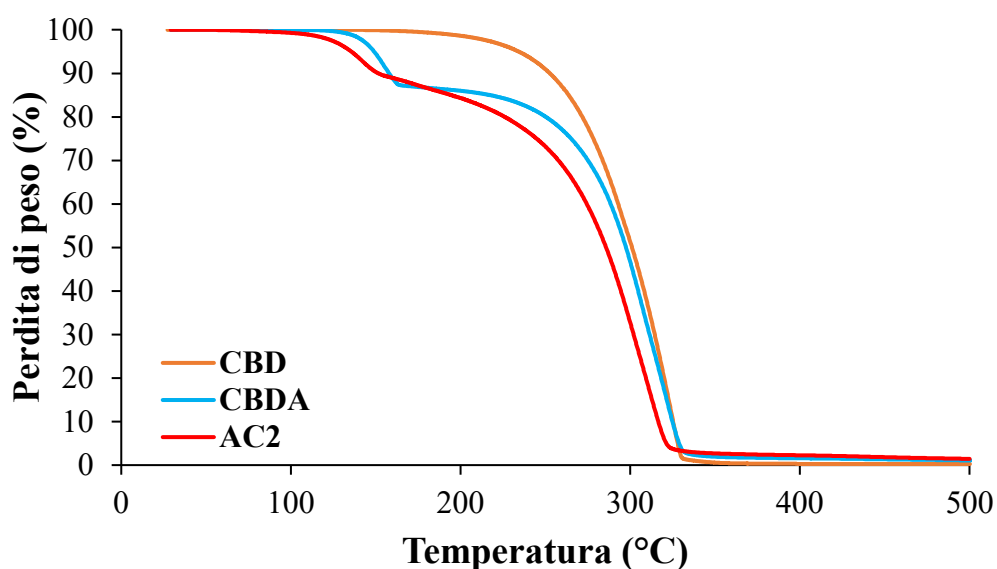


Figura 20. Profili termogravimetrici sovrapposti di CBD, CBDA e AC2.

L'estratto AC2 mostra una perdita di peso di 11% nell'intervallo 30÷160 °C, superiore a quella teorica di 8,9% (Figura 20). La decarbossilazione delle molecole acide presenti nell'estratto inizia a 90 °C, temperatura più bassa rispetto a quella di AC3.3 e CBDA, rispettivamente di 10 °C e 20 °C.

La curva termogravimetrica di AC2 risulta spostata a temperature inferiori a quelle di CBD e CBDA: questa variazione è da attribuire alla frazione di non-CBs (13,75% del peso totale di fitoestratto). Anche le maggiori percentuali di perdita di peso sperimentale registrate (11% vs 8,9%) sono da imputare alla decomposizione delle molecole presenti nella frazione di non-CBs.

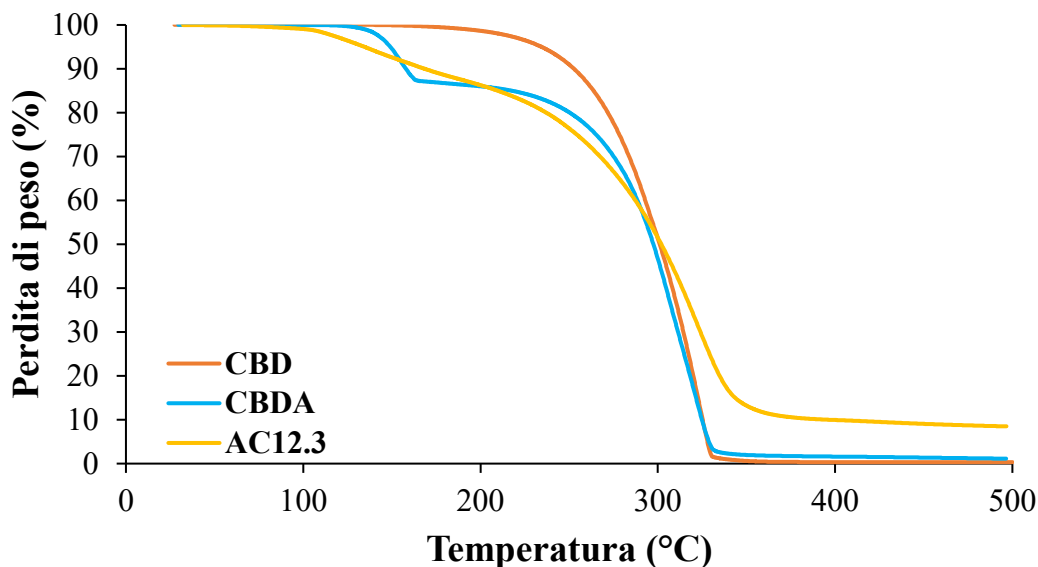


Figura 21. Profili termogravimetrici sovrapposti di CBD, CBDA e AC12.3.

Come evidente dalla Figura 21, l'estratto AC12.3 presenta una prima perdita di peso (0,9%), tra 30÷100 °C, imputata all'evaporazione di solventi (acetone e metanolo) residui al termine del processo estrattivo. Nell'intervallo 30÷190 °C, l'estratto mostra una perdita di peso di 11%, valore significativamente differente rispetto al teorico (4,8%). La decarbossilazione delle molecole acide incorporate nell'estratto AC12.3 avviene a 100 °C, come per l'estratto AC3.3. La fine della decomposizione del campione AC12.3 ricade a temperature superiori a quelle di CBD, CBDA e di AC2 (360 °C), ma a temperature inferiori a quelle di AC3.3 (390 °C).

L'evento di decomposizione della cospicua frazione di non-CBs di AC12.3 (39,31% del peso totale di fitoestratto) si è sommato a quello della perdita di peso della CO₂ (11%).

Lo *step* di decarbossilazione delle molecole acide presenti negli estratti AC3.3 (100 °C), AC2 (90 °C) e AC12.3 (100 °C) inizia a temperature minori rispetto a quelle del CBDA come tale (110 °C), ad indicare una minore stabilità termica dei cannabinoidi acidi inclusi nei fitoestratti.

Nella Figura 22 sono riportate le curve TGA di AC10.6, AC10.8, AC10.11 e AC27.6.

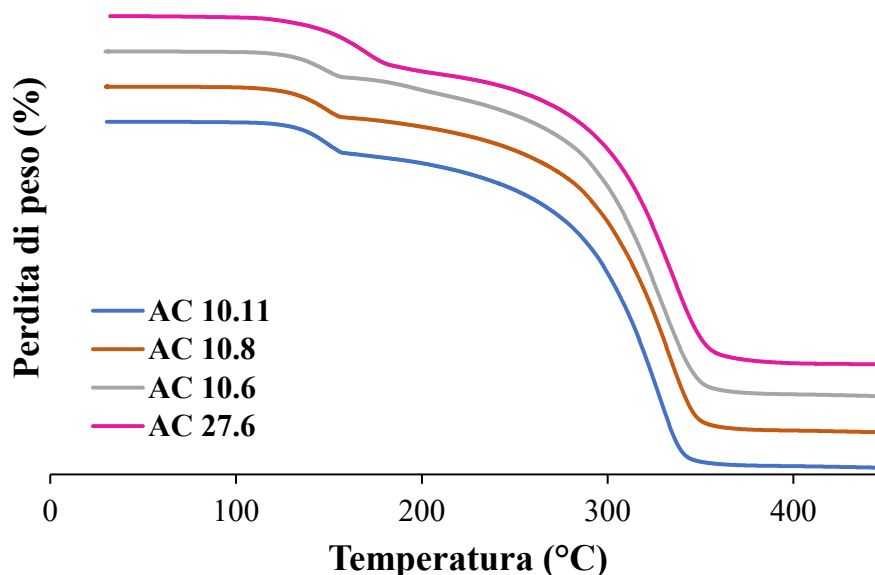


Figura 22. Profili termogravimetrici di AC10.6, AC10.8, AC10.11 e AC27.6.

Le curve termiche relative agli estratti AC10.6, AC10.8 e AC10.11 evidenziano una somiglianza nel profilo di degradazione, con un primo *step* nell'intervallo 30÷160 °C (Figura 22). Questi fitoestratti, caratterizzati da simili quantitativi di cannabinoidi acidi (52,80%, 57,92% e 56,04%), mostrano un comportamento termico entro 160 °C paragonabile, con valori di perdite di peso di 7,2%, 8,0% e 8,2% rispettivamente, prossimi a quelli teorici (Tabella 6).

AC27.6 mostra invece una curva termica traslata verso temperature maggiori (Figura 22). Questo risultato è probabilmente dovuto alla differente composizione della componente non-CBs di questo fitoestratto rispetto a quella degli altri. Anche la maggiore perdita di peso sperimentale riscontrata nell'intervallo 30÷190 °C rispetto a quella teorica (14,6% vs 10,8%) è da attribuire alla decomposizione delle molecole presenti nella frazione di non-CBs.

Le curve termogravimetriche dei diversi estratti hanno quindi mostrato i risultati attesi per quanto riguarda la decarbossilazione della componente acida del profilo dei cannabinoidi degli estratti stessi. Tuttavia, anche gli altri componenti non identificati sembrerebbero giocare un ruolo non trascurabile sulla stabilità termica degli estratti.

4. Supposte a base di fitoestratto AC3.3

Nella Tabella 7 è riportata la composizione quali-quantitativa delle supposte allestite in questo lavoro. Per ognuna delle 6 formulazioni sono state prodotte 6 unità.

Tabella 7. Composizione delle diverse formulazioni di supposte.

Preparazione	Suppocire® AM (%)	Witepsol® H15 (%)	Fitoestratto AC3.3 (%)
1	100,0	----	----
2	----	100,0	----
3	50,0	50,0	----
4	----	80,0	20,0
5	37,5	37,5	25,0
6	43,5	43,5	13,0

Le formulazioni 1, 2 e 3, prive di fitoestratto (formulazioni di riferimento), sono state prodotte rispettivamente con il 100% di Suppocire® AM, di Witepsol® H15 e di una miscela 1:1 di Witepsol® H15 e Suppocire® AM. La formulazione 4 è stata preparata con la base di Witepsol® H15 (80%) e il 20% di fitoestratto AC3.3. Le formulazioni 5 e 6 sono state formulate con la stessa miscela 1:1 delle due basi di trigliceridi semisintetici Witepsol® H15 e Suppocire® AM ma con due differenti percentuali di estratto incorporato, 25% e 13%.

Le formulazioni 1, 2 e 3 hanno portato all'ottenimento di supposte di colore bianco e caratterizzate da una struttura uniforme, prive di crepe (Figura 23). La consistenza delle supposte era tale da consentirne la manipolazione senza alterarne la struttura.

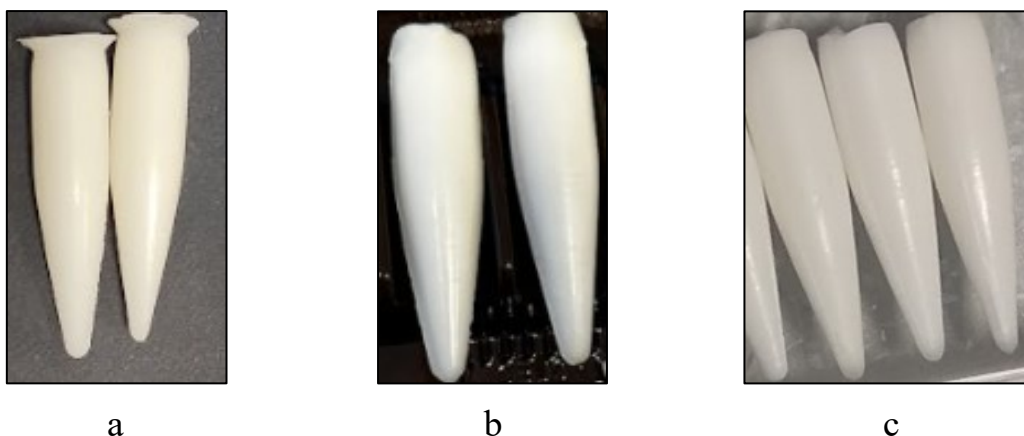


Figura 23. Supposte prive di fitoestratto formulazioni 1 (a), 2 (b) e 3 (c).

Il fitoestratto utilizzato per la preparazione della formulazione 4 ha conferito alle supposte una colorazione gialla e una consistenza non dura. La composizione con il 20% di AC3.3 non ha infatti permesso di ottenere supposte integre: tutte le unità sono risultate molto fragili e frammentate in diversi punti (Figura 24). Poiché la perdita della struttura conica della supposta non ne permette la corretta applicazione né la somministrazione completa della dose di attivo incorporato, le supposte della formulazione 4 sono state escluse.



Figura 24. Supposte della formulazione 4.

Per migliorare la struttura delle supposte, come base eccipiente è stata utilizzata una miscela 1:1 di Witepsol[®] H15 e Suppocire[®] AM. In questo modo è stato possibile ottenere supposte di colore giallo chiaro e con struttura conica inalterata, prive di frammentazioni (Figura 25). Tuttavia, la più alta percentuale di estratto rispetto a quella della formulazione 4 (25% vs 20%) ha reso le supposte morbide al tatto. La mancanza di rigidità delle supposte non garantisce un'efficiente somministrazione rettale quindi anche questa formulazione è stata esclusa.



Figura 25. *Supposte della formulazione 5.*

Le supposte della formulazione 6 sono state realizzate impiegando la stessa miscela 1:1 di Witepsol[®] H15 e Suppocire[®] AM ma una percentuale minore di estratto AC3.3, pari al 13%, ha conferito alle supposte soltanto una leggera colorazione gialla. Le supposte ottenute sono risultate integre, prive di frammentazioni e di consistenza adeguata alla somministrazione rettale (Figura 26).



Figura 26. *Supposte della formulazione 6.*

4.1. Tempo di rammollimento delle supposte

Dopo esposizione all'interno di una camera climatica alla temperatura di 39 °C e ad umidità relativa del 75%, le supposte delle formulazioni 3, 5 e 6 sono state analizzate relativamente al loro tempo di rammollimento (TR). Il TR è un parametro utile per identificare quanto tempo una supposta è in grado di mantenere consistenza e rigidità adatte alla sua somministrazione per via rettale.

La formulazione 3 (supposta bianca) è stata studiata al fine di determinare l'influenza dell'estratto AC3.3 nelle formulazioni 5 e 6 sul TR.

I TR delle supposte delle formulazioni 5 e 6 sono stati confrontati, oltre che con quelli della formulazione di riferimento (3), anche con quelli di supposte commerciali (Voltaren® supposte 100 mg) (Tabella 8).

Tabella 8. Tempo di rammollimento della preparazione commerciale e dei lotti 3, 5 e 6.

Formulazioni	Tempo di rammollimento (min)
3	5
5	2
6	4
Voltaren®	7

Il TR per le supposte della formulazione 3, prive di estratto, è stato raggiunto in circa 5 min, mentre per le supposte contenenti l'estratto si è verificata una diminuzione del TR. Le supposte della formulazione 5 hanno presentato TR inferiore a quello ottenuto con le supposte della formulazione 6, rispettivamente 2 min e 4 min. Questi tempi sono inversamente proporzionali alla percentuale di fitoestratto presente nelle formulazioni (25% e 13% rispettivamente). La preparazione commerciale di riferimento ha registrato un TR di 7 min, non significativamente differente da quello della formulazione 6.

4.2. Stabilità delle supposte

Di seguito sono riportati i risultati dello studio di stabilità condotti sulle supposte della formulazione 6. Nella Figura 27 sono riportate le foto delle supposte conservate a temperatura ambiente ed esposte alla luce naturale (Figura 27, b e d) oppure al buio (Figura 27, a e c).

Dopo cinque giorni ($t = 5\text{gg}$, Figura 27, a e b) e dopo tre mesi ($t = 3\text{m}$, Figura 27, c e d) dalla loro preparazione, le supposte sono state valutate per quanto riguarda forma, consistenza e colore.

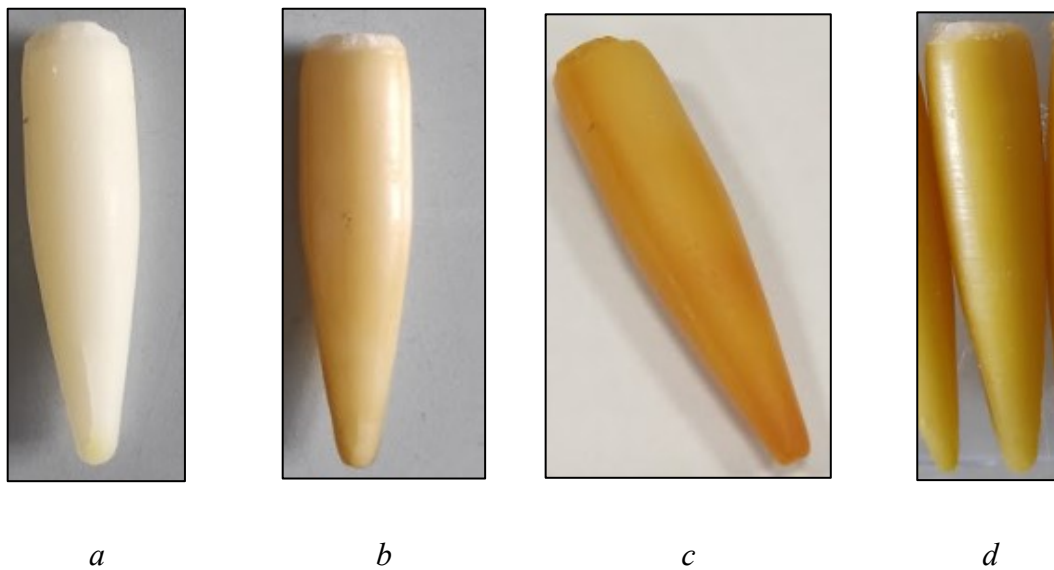


Figura 27. *Supposte della formulazione 6 dopo cinque giorni di conservazione al buio (a) e alla luce (b) e dopo tre mesi al buio (c) e alla luce (d).*

Al $t = 5\text{gg}$ le supposte esposte alla luce rispetto al tempo zero (Figura 26) hanno mostrato una intensificazione della tonalità gialla (Figura 27, b), e l'intensità del colore è aumentata nel tempo, fino ad arrivare a giallo scuro al $t = 3\text{m}$ (Figura 27, d). Non sono state osservate differenze in merito a forma e consistenza delle supposte.

Le supposte conservate al buio al $t = 5\text{gg}$ non hanno presentato un cambiamento significativo del colore (Figura 27, a), a differenza di quanto riscontrato al $t = 3\text{m}$ (Figura 27, c). Anche per queste supposte non sono state evidenziate modifiche relative alla forma e alla consistenza.

Il cambiamento del colore delle supposte osservato dopo soli cinque giorni di conservazione al buio è stato imputato all'ossidazione aerobica dei fitocannabinoidi a cannabinochinoidi presenti nell'estratto AC3.3. Lo sviluppo di una colorazione sempre più intensa fino a tonalità del giallo/arancione nelle supposte oggetto di questo studio è indice dell'ossidazione del CBD contenuto nell'estratto AC3.3. Il prodotto di ossidazione che si viene a formare dal CBD è il cannabidiolchinone (CBDQ) il quale determina una tonalità di colore dell'estratto tendente al rosso [Caprioglio *et al.*, 2020]. Non è quindi sufficiente conservare le supposte al buio per garantire la stabilità dell'estratto.

CONCLUSIONI

La permeazione *in-vitro* dei cannabinoidi non psicoattivi CBD e CBDA attraverso una membrana biomimetica è significativamente influenzata dalla composizione quali-quantitativa e dalla polarità dei fitoestratti che li contengono, a loro volta dipendenti dalla modalità di estrazione dalla biomassa di partenza. L'entità della ritenzione di CBD e CBDA nella membrana biomimetica e la tendenza ad oltrepassarla sono parametri critici per la selezione del fitoestratto di canapa industriale più adatto per la messa a punto di formulazioni dermatologiche e cosmetiche, per le quali si desidera un effetto locale, e di preparazioni farmaceutiche ad azione sistemica.

Infine, le criticità relative a stabilità, compatibilità e colore, che sono emerse a carico delle supposte formulate con uno degli estratti, possono essere superate con la scelta di opportuni eccipienti antiossidanti e di adeguato confezionamento.

BIBLIOGRAFIA

Adams, R., Hunt, M. (1940). *Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp I*. Journal of the American Chemical Society, 62(1), 196-200.

Ali, A., Akhtar, N. (2015). *The safety and efficacy of 3% Cannabis seeds extract cream for reduction of human cheek skin sebum and erythema content*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 28(4), 1389-95.

Andre, C. M., Hausman, J. F., Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules*. Frontiers in Plant Science, 7, 19.

Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). *Structure and function of the epidermis related to barrier properties*. Clinics in Dermatology, 30(3), 257-62.

Barrett, M. L., Gordon, D., Evans, F. J. (1985). *Isolation from cannabis sativa L. of cannflavin-a novel inhibitor of prostaglandin production*. Biochemical Pharmacology, 34(11), 2019-24.

Bíró, T., Tóth, B. I., Haskó, G., Paus, R., Pacher, P. (2009). *The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities*. In Trends in Pharmacological Sciences, 30(8), 411-420.

Booth, J. K., Page, J. E., Bohlmann, J. (2017). *Terpene synthases from Cannabis sativa*. PLoS ONE, 12(3) 0173911.

Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., Benvenuti, S. (2017). *Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L. (hemp)*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 143, 228-236.

Callaway, J., Schwab, U., Harvima, I., Halonen, P., Mykkänen, O., Hyvönen, P., Järvinen, T. (2005). *Efficacy of dietary hempseed oil in patients with atopic dermatitis*. Journal of Dermatological Treatment, 16(2), 87-94.

Caprioglio, D., Mattoteia, D., Pollastro, F., Negri, R., Lopatriello, A., Chianese, G., Minassi, A., Collado, J. A., Munoz, E., Tagliatalata-Scafati, O., Appendino, G. (2020). *The Oxidation of Phytocannabinoids to Cannabinoquinoids*. Journal of Natural Products, 83(5), 1711-1715.

Casiraghi A., Musazzi U.M., Centin G., Franzè S., Minghetti P. (2020). *Topical Administration of Cannabidiol: Influence of Vehicle-Related Aspects on Skin Permeation Process*, International Journal of Pharmaceutical Sciences, 13(11), 337.

Ciolino, L. A., Ranieri, T. L., Taylor, A. M. (2018). *Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids*. Forensic Science International, 289, 438-447.

Colombo, P., Alhaique, F., Caramella, C., Conti, B., Gazzaniga, A., Vidale, E. (2015). *Preparazioni dermiche e transdermiche*. In Principi di tecnologia farmaceutica, capitolo 29, Casa Editrice Ambrosiana, 426- 430.

Cuadari, A., Gambaro, G., (2023). *Aromi solidi a base di cannabidiolo e metodo per la loro produzione*. (Brevetto n. IT202100020762A1). Ufficio Brevetti Italiano.

Cunha, R. Z., Felisardo, L. L., Salamanca, G., Marchioni, G. G., Neto, O. I., Chiocchetti, R. (2023). *The use of cannabidiol as a novel treatment for oral stereotypic behaviour (crib-biting) in a horse*. Veterinary and Animal Science, 19, 100289.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015). *Green solvents for green technologies*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 90(9), 1631-1639.

D.P.R. 9 ottobre 1990, n. 309, Decreto del Presidente della Repubblica 9/1990, n. 309. *Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza*. GU Serie Generale.

De Aguiar, A. C., Vardanega, R., Viganó, J., Silva, E. K. (2023). *Supercritical Carbon Dioxide Technology for Recovering Valuable Phytochemicals from Cannabis sativa L. and Valorization of Its Biomass for Food Applications*. *Molecules*, 28(9), 3849.

De Meijer, E. P. M. (2014). *The Chemical Phenotypes (Chemotypes) of Cannabis*. In: *Handbook of Cannabis*, Pertwee, R., Ed, Oxford University Press, 89-110.

Di Salvo, A., Conti, M. B., Della Rocca, G. (2023). *Pharmacokinetics, efficacy, and safety of cannabidiol in dogs: an update of current knowledge*. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1204526.

DM 23 gennaio 2013, n. 33, Decreto ministeriale 33/2013. *Aggiornamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309 e successive modificazioni e integrazioni. Inserimento nella Tabella II, Sezione B, dei medicinali di origine vegetale a base di Cannabis (sostanze e preparazioni vegetali, inclusi estratti e tinture)*. GU Serie Generale.

DM 27 giugno 2024, n. 157, Decreto ministeriale 27/2024. *Aggiornamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, e successive modificazioni ed integrazioni. Inserimento nella tabella dei medicinali, sezione B, delle composizioni per somministrazione ad uso orale di cannabidiolo ottenuto da estratti di cannabis*. GU Serie Generale.

DM 7 agosto 2023, n. 194, Decreto ministeriale 7/2023. *Revoca del decreto 28 ottobre 2020 di «Sospensione dell'entrata in vigore del decreto 1° ottobre 2020, recante: "Aggiornamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, e successive modificazioni ed integrazioni. Inserimento nella Tabella dei medicinali, sezione B, delle composizioni per somministrazione ad uso orale di cannabidiolo ottenuto da estratti di Cannabis"»*. GU Serie Generale.

Erb, M., Kliebenstein, D. J. (2020). *Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy*. *Plant Physiology*, 184(1), 39-52.

European Pharmacopoeia (11^a Ed.) (2023).

Farag, S., Kayser, O. (2017). *The Cannabis Plant: Botanical Aspects*. In Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment, Academic Press, capitolo 1, 3-13.

FDA (2018). *FDA Approves First Drug Comprised of an Active Ingredient Derived from Marijuana to Treat Rare, Severe Forms of Epilepsy*.

Filer, C. N. (2022). *Acidic Cannabinoid Decarboxylation*. Cannabis and Cannabinoid Research 7(3), 262-273.

Formato, M., Crescente, G., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Pecoraro, M. T., Piccolella, S., Catauro, M., Pacifico, S. (2020). *(-)-cannabidiolic acid, a still overlooked bioactive compound: An introductory review and preliminary research*. Molecules, 25(11), 2638.

Gamble, L. J., Boesch, J. M., Frye, C. W., Schwark, W. S., Mann, S., Wolfe, L., Brown, H., Berthelsen, E. S., Wakshlag, J. J. (2018). *Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs*. Frontiers in Veterinary Science, 5, 165.

Guala, C. (2024). *Formulazione e caratterizzazione di preparazioni topiche contenenti un fitoestratto di canapa industriale*. Tesi di Laurea.

Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O., Appendino, G. (2016). *Phytocannabinoids: A unified critical inventory*. Natural Product Reports, 33(12), 1357-1392.

Haq, A., Dorrani, M., Goodyear, B., Joshi, V., Michniak-Kohn, B. (2018). *Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes*. International Journal of Pharmaceutics, 539(1–2), 58-64.

Haynes, W. M. (95^a Ed.). (2014). *Fluid Properties, Permittivity (Dielectric Constant) of Liquids*. In Handbook of chemistry and physics, CRC Press, capitolo 6, 6-187.

Holler, F. J., Skoog, D. A., Crouch, S.R. (2^a Ed.) (2009). *Metodi termici*. In Chimica analitica strumentale, EdiSES, capitolo 31, 894-897.

Izzo, L., Castaldo, L., Narváez, A., Graziani, G., Gaspari, A., Rodríguez-Carrasco, Y., Ritieni, A. (2020). *Analysis of Phenolic Compounds in Commercial Cannabis sativa L. Inflorescences using UHPLC-Q-Orbitrap HRMs*. *Molecules*, 25(3), 631.

Jin, D., Dai, K., Xie, Z., Chen, J. (2020). *Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes*. *Scientific Reports*, 10(1), 3309.

Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M., Modrzewska, M., Pierzgalski, A. (2021). *Cannabinoids: characteristics and potential for use in food production*. *Molecules*, 26(21), 6723.

Kang, H., Zsoldos, R. R., Sole-Guitart, A., Narayan, E., Cawdell-Smith, A. J., Gaughan, J. B. (2023). *Heat stress in horses: a literature review*. *International Journal of Biometeorology*, 67(6), 957-973.

Lan, L., Xia, L., Tang, J., Wyon, D. P., Liu, H. (2019). *Mean skin temperature estimated from 3 measuring points can predict sleeping thermal sensation*. *Building and Environment*, 162, 106292.

LaVigne, J. E., Hecksel, R., Keresztes, A., Streicher, J. M. (2021). *Cannabis sativa terpenes are cannabimimetic and selectively enhance cannabinoid activity*. *Scientific Reports*, 11(1), 8232.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., Wu, H. (2020). *The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.

Mahmoudinoodezh, H., Telukutla, S. R., Bhangu, S. K., Bachari, A., Cavalieri, F., Mantri, N. (2022). *The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids*. *Pharmaceutics*, 14(2), 438.

- Martinez Naya, N., Kelly, J., Corna, G., Golino, M., Abbate, A., Toldo, S. (2023). *Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Cannabidiol*. *Molecules*, 28(16), 5980.
- Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., Mondello, L. (2021). *Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization*. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864.
- Mnekin, L., Ripoll, L. (2021). *Topical use of cannabis sativa l. Biochemicals*. *Cosmetics*, 8(3), 85.
- Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., Koltai, H. (2018). *Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods*. *Industrial Crops and Products*, 113, 376-382.
- Nasrin, S., Watson, C. J. W., Perez-Paramo, Y. X., Lazarus, P. (2021). *Cannabinoid Metabolites as Inhibitors of Major Hepatic CYP450 Enzymes, with Implications for Cannabis-Drug Interactions*. *Drug Metabolism and Disposition*, 49(12), 1070-1080.
- Neupane, R., Boddu, S. H. S., Renukuntla, J., Babu, R. J., Tiwari, A. K. (2020). *Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities*. *Pharmaceutics*, 12(2), 152.
- Odieka, A. E., Obuzor, G. U., Oyedeji, O. O., Gondwe, M., Hosu, Y. S., Oyedeji, A. O. (2022). *The Medicinal Natural Products of Cannabis sativa Linn.: A Review*. *Molecules*, 27(5), 1689.
- Olesen, C. M., Fuchs CSK, Philipsen PA, Hædersdal M., Agner T., Clausen M. (2019). *Advancement through epidermis using tape stripping technique and Reflectance Confocal Microscopy*. *Sci. Rep*, 9(1), 12217.
- Onofri, C., de Meijer, E. P. M., Mandolino, G. (2015). *Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in Cannabis sativa L. and its relationship with chemical phenotype*. *Phytochemistry*, 116(1), 57-68.

Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., Mandolino, G. (2008). *Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of Cannabis sativa L. Euphytica*, 160(2), 231-240.

Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., Luo, J. (2022). *A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD)*. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 130(4), 439-456.

Picco, A., Segale, L., Miletto, I., Pollastro, F., Aprile, S., Locatelli, M., Bari, E., Torre, M. L., Giovannelli, L. (2023). *Spray-Dried Powder Containing Cannabigerol: A New Extemporaneous Emulgel for Topical Administration*. *Pharmaceutics*, 15(12), 2747.

Polidoro, D., Temmerman, R., Devreese, M., Charalambous, M., Ham, L. Van, Cornelis, I., Broeckx, B. J. G., Mandigers, P. J. J., Fischer, A., Storch, J., Bhatti, S. F. M. (2022). *Pharmacokinetics of Cannabidiol Following Intranasal, Intrarectal, and Oral Administration in Healthy Dogs*. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 899940.

Pollastro, F., De Petrocellis, L., Schiano-Moriello, A., Chianese, G., Heyman, H., Appendino, G., Taglialatela-Scafati, O. (2017). *Amorfrutin-type phytocannabinoids from Helichrysum umbraculigerum*. *Fitoterapia*, 123, 13-17.

Ponmozhi, J., Dhinakaran, S., Varga-Medveczky, Z., Fónagy, K., Bors, L. A., Iván, K., Erdő, F. (2021). *Development of skin-on-a-chip platforms for different utilizations: Factors to be considered*. *Micromachines*, 12(3), 294.

Prausnitz, M. R., Langer, R. (2008). *Transdermal drug delivery*. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1261-8.

Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., Elsohly, M. A. (2021). *Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis*. *Molecules*, 26(9), 2774.

Roberts, M. S., Cheruvu, H. S., Mangion, S. E., Alinaghi, A., Benson, H. A. E., Mohammed, Y., Holmes, A., van der Hoek, J., Pastore, M., Grice, J. E. (2021). *Topical drug delivery:*

History, percutaneous absorption, and product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 177, 113929.

Rochfort, S., Isbel, A., Ezernieks, V., Elkins, A., Vincent, D., Deseo, M. A., Spangenberg, G. C. (2020). *Utilisation of Design of Experiments Approach to Optimise Supercritical Fluid Extraction of Medicinal Cannabis*. *Scientific Reports*, 10(1) 9124.

Russo, E., Guy, G. W. (2006). *A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol*. *Medical Hypotheses*, 66(2), 234-46.

Russo, E. B., Jiang, H. E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D. J., Zhao, Y. X., Bera, S., Zhang, Y. B., Lü, E. G., Ferguson, D. K., Hueber, F., Zhao, L. C., Liu, C. J., Wang, Y. F., Li, C. S. (2008). *Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia*. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4171-82.

Russo, E. B. (2011). *Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects*. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344-64.

Russo, E. B. (2019). *The case for the entourage effect and conventional breeding of clinical cannabis: No "Strain," no gain*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1969.

Scanavez, A. L. A., Fragomeni, B., Mendonça, L. G. D. (2018). *Animal factors associated with core body temperature of nonlactating dairy cows during summer*. *Journal of Animal Science*, 96(12), 5000-5009.

Schilling, S., Melzer, R., McCabe, P. F. (2020). *Cannabis sativa*. *Current Biology*, 30(1), R8–R9.

Singh, A., Bilichak, A., Kovalchuk, I. (2021). *The genetics of cannabis-genomic variations of key synthases and their effect on cannabinoid content*. *Genome*, 64(4), 490-501.

Sorrentino, G. (2021). *Introduction to emerging industrial applications of cannabis (Cannabis sativa L.)*. *Rendiconti Lincei*, 32(2), 233-243.

Tijani, A. O., Thakur, D., Mishra, D., Frempong, D., Chukwunyere, U. I., Puri, A. (2021). *Delivering therapeutic cannabinoids via skin: Current state and future perspectives*. Journal of Controlled Release, 334, 427-451.

Tzimas, P. S., Petrakis, E. A., Halabalaki, M., Skaltsounis, L. A. (2024). *Extraction solvent selection for Cannabis sativa L. by efficient exploration of cannabinoid selectivity and phytochemical diversity*. Phytochemical Analysis, 35(1), 163-183.

Uchida, T., Kadhum, W. R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., Sugibayashi, K. (2015). *Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-MTM*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 67, 113-118.

Vanti, G., Grifoni, L., Bergonzi, M. C., Antiga, E., Montefusco, F., Caproni, M., Bilia, A. R. (2021). *Development and optimisation of biopharmaceutical properties of a new microemulgel of cannabidiol for locally-acting dermatological delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 607, 121036.

Wang, M., Wang, Y. H., Avula, B., Radwan, M. M., Wanas, A. S., van Antwerp, J., Parcher, J. F., Elsohly, M. A., Khan, I. A. (2016). *Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry*. Cannabis and Cannabinoid Research, 1(1), 262-271.

Wellcome, H. S. (1910). *Agenda Medica Wellcome*. Burroughs Wellcome Co.

Werz, O., Seegers, J., Schaible, A. M., Weinigel, C., Barz, D., Koeberle, A., Allegrone, G., Pollastro, F., Zampieri, L., Grassi, G., Appendino, G. (2014). *Cannflavins from hemp sprouts, a novel cannabinoid-free hemp food product, target microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase*. PharmaNutrition, 2(3), 53-60.

Wester, R. C., Christoffel, J., Hartway, T., Poblete, N., Maibach, H. I., Forsell, J. (1998). *Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: Storage and detrimental effects of heat-separation and freezing*. Pharmaceutical Research, 15(1), 82-4.

Wróbel, T., Dreger, M., Wielgus, K., Słomski, R. (2018). *The application of plant in vitro cultures in cannabinoid production*. *Biotechnology Letters*, 40(3), 445-454.

Zakari, F. O., Akefe, I. O., Uchendu, C. (2021). *Comparison of diurnal rectal and body surface temperatures in large white piglets during the hot-dry season in a tropical Guinea savannah*. *Journal of Thermal Biology*, 99, 102953.

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., Bahadar, K. (2018). *Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens*. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198-202.

SITOGRAFIA

<https://antidroga.interno.gov.it/wp-content/uploads/2019/04/Convenzione-Unica-del-1961.pdf>

<https://cannabiscienza.it/malattie-dermatologiche-e-sistema-endocannabinoide-un-nuovo-potenziale-bersaglio/>

https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C%28R9%29_Guideline_MinorRevision_2024_2024_Approved.pdf

<https://faaat.net/wp-content/uploads/ECDD-cannabis-final-outcome.pdf>

<https://www.canapasativaitalia.org/news-canapa-sativa-italia-il-tar-del-lazio-sospende-il-decreto-che-inserisce-il-cbd-tra-le-sostanze-stupefacenti/>

<https://www.powerblanket.com/blog/cbd-extraction-methods/>

https://www.samorini.it/doc1/alt_aut/ad/dorvau.pdf

https://www.samorini.it/doc1/alt_aut/sz/valieri1.pdf

[https://www.sifap.org/pubblicazioni/newsletter/cbd,-il-tar-del-lazio-mantiene-la-sospensione-del-dm-7-08-2023-fino-al-16-gennaio-](https://www.sifap.org/pubblicazioni/newsletter/cbd,-il-tar-del-lazio-mantiene-la-sospensione-del-dm-7-08-2023-fino-al-16-gennaio-2024#:~:text=07137%20del%2024.10.2023%3B%20chi,note%20anche%20la%20nuova%20)

[2024#:~:text=07137%20del%2024.10.2023%3B%20chi,note%20anche%20la%20nuova%20](https://www.sifap.org/pubblicazioni/newsletter/cbd,-il-tar-del-lazio-mantiene-la-sospensione-del-dm-7-08-2023-fino-al-16-gennaio-2024#:~:text=07137%20del%2024.10.2023%3B%20chi,note%20anche%20la%20nuova%20)

<https://www.terranuova.it/Chiedi-all-esperto/Cannabis-terapeutica-il-punto-sulla-situazione-italiana>