

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

Nuovi chemotipi di Cannabis sativa L.

Relatore

Prof.ssa Federica Pollastro

Candidato

Domenico Nucera

Correlatore

Dott. Stefano Salamone

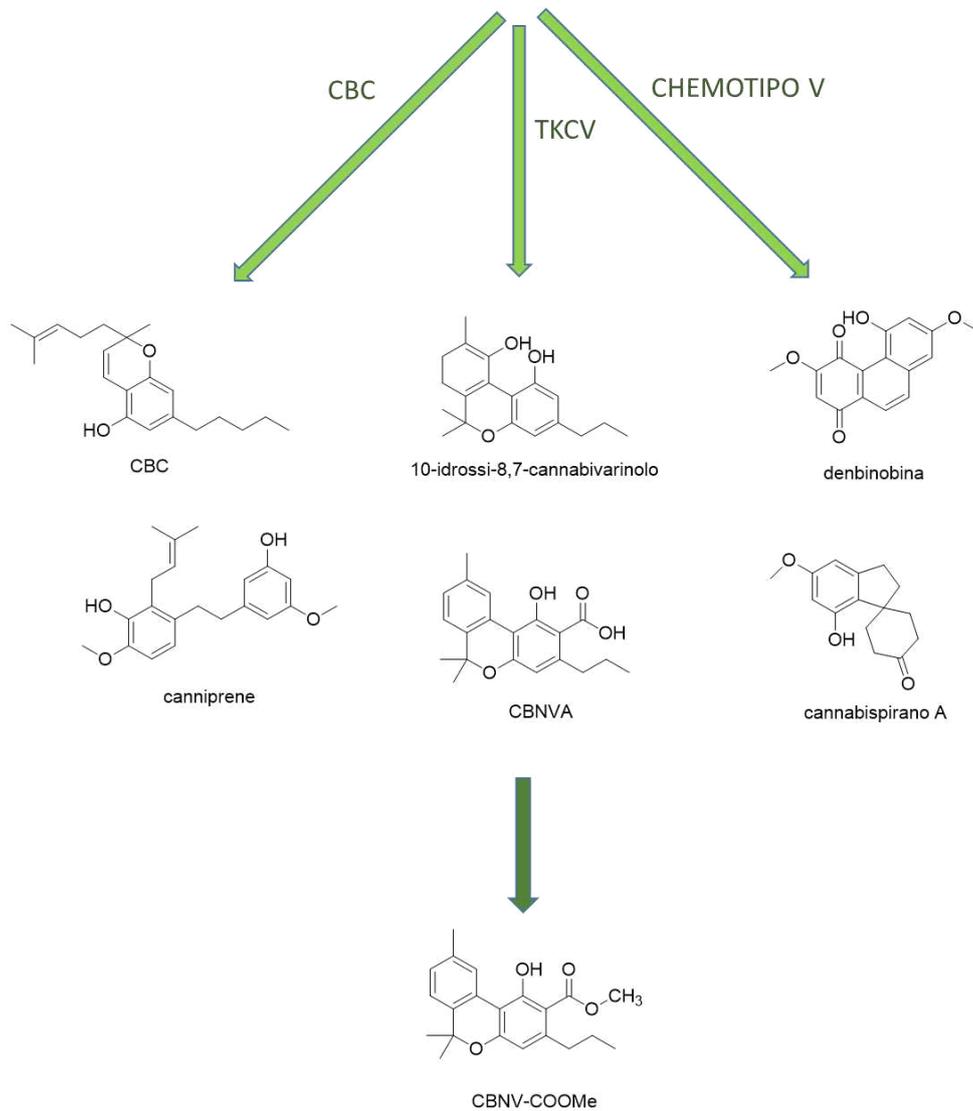
Anno Accademico 2023-2024

Sessione autunnale

A mio fratello

Graphical abstract

Cannabis sativa L.



Abbreviazioni

CBC	cannabicromene
CBCA	cannabicromene acido
CBCVA	cannabicromene viridinico acido
CBD	cannabidiolo
CBDA	cannabidiolo acido
CBDV	cannabidiolo viridinico
CBDVA	cannabidiolo viridinico acido
CBG	cannabigerolo
CBGA	cannabigerolo acido
CBN	cannabinolo
CBNV	cannabinolo viridinico
CBNVA	cannabinolo viridinico acido
CCG	colonna cromatografica a gravimetria
CoA	coenzima A
DCM	diclorometano
EAP	estratto acetone primario
EtOAc	etilacetato
EtOH	etanolo
GOT	geranil transferasi olivetolica
GPP	geranilpirofosfato
HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazione
IPP	isopentenilpirofosfato

MeOH	metanolo
NMR	risonanza magnetica nucleare
Pe	petroletere
RP-C18	reverse phase
SiO ₂	silice
THC	tetraidrocannabinolo
THCA	tetraidrocannabinolo acido
THCV	tetraidrocannabinolo viridinico
THCVA	tetraidrocannabinolo viridinico acido
THF	tetraidrofurano
TLC	cromatografia su strato sottile

Indice

1: Introduzione	2
1.1 <i>Cannabis sativa</i> L.	2
1.2 Target farmacologici dei cannabinoidi maggiori:	3
1.3 Biosintesi dei cannabinoidi:	5
1.4 Decarbossilazione dei cannabinoidi:	7
1.5 Cannabinoidi viridini:	8
1.6 Attività dei composti viridini:.....	9
1.7 Composti non cannabinoidi nella <i>Cannabis sativa</i> :	10
1.8 Effetto entourage:	12
2: Scopo del lavoro	14
3: Risultati e discussione	16
3.1 Step: estrazione chemotipi di <i>Cannabis sativa</i>	16
3.2 Analisi chemotipo a TKCV	16
3.3 Analisi chemotipo CBC (2022)	22
3.4 Analisi del chemotipo zero cannabinoidi (2020).....	23
4: Parte sperimentale	26
4.0 Chemotipo TKCV	26
5.0 Chemotipo CBC	48
6.0 Chemotipo zero cannabinoidi	57
5: Conclusione e sviluppi futuri	66
6: Dati spettroscopici	68
7: Bibliografia	76
Ringraziamenti	80

1: Introduzione

1.1 Cannabis sativa L.



Figura 1 Cannabis sativa L.

La *Cannabis sativa* L. (Figura 1) appartiene alla famiglia della Cannabacee, è una pianta annuale e dioica, distinta in piante maschio, produttrici di polline e piante femmina, con fiori e semi. Esistono tre specie: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis*. La famiglia delle

Cannabacee è costituita da diverse varietà di piante, la cui foglia è caratterizzata da una struttura simmetrica a 7 punte con margini seghettati (Chandra et al., 2017). La pianta possiede steli la cui altezza varia in base alla varietà, alle condizioni e all'ambiente di crescita, ma generalmente sono alte da 0,2 fino a 6 metri. Solitamente le piante maschio sono alte e sottili mentre quelle femmina tendono ad essere più robuste. Entrambe sono caratterizzate da foglie palmate, composte da 3 a 13 foglioline a livello basale e 1-3 foglioline a livello apicale. Queste foglioline possiedono una colorazione che varia dal verde chiaro al verde scuro¹. È originaria di una regione dell'Asia centrale che si estende dall'Himalaya fino alla Cina nord-occidentale, e successivamente si è estesa in molte altre regioni. La droga è rappresentata dalle infiorescenze dei fiori femminili situate principalmente in tre punti: alla base, nel centro e all'apice della pianta (Namdar et al., 2018).

Stando alla classificazione basata sul chemotipo, possono essere distinti 5 gruppi:

- Tipo I (THC dominante): si tratta di piante in cui le concentrazioni di THC (1), sono nettamente maggiori rispetto a quelle di CBD (2). Il THC (1) è presente con una concentrazione maggiore dello 0,3% e può arrivare fino al 30%, mentre la presenza di CBD (2) è molto più ridotta (minore dello 0,5%).
- Tipo II: è un chemotipo con un rapporto 1:1 di CBD (2) e THC (1).
- Tipo III (CBD dominante): si tratta di piante con basso contenuto di THC (1) presente in quantità minori dello 0,3%, mentre la quantità di CBD (2) supera lo 0,5%.
- Tipo IV: profilo ricco di cannabigerolo (CBG) (3), caratterizzato da un basso contenuto di THC (1) e da alte concentrazioni di CBG (3) (maggiori dello 0,3%).

¹ <https://www.dinafem.org/it/blog/cannabis-parti-fondamentali-pianta/>

- Tipo V: questo chemotipo raggruppa le piante di cannabis con una quantità estremamente minime di cannabinoidi. Il gruppo, infatti, viene anche definito “zero cannabinoidi”².

1.2 Target farmacologici dei cannabinoidi maggiori:

Tra gli oltre 150 cannabinoidi identificati nella cannabis, i maggioritari (per concentrazione) sono il THC, il CBD, il CBG, il CBC ed il CBN.

Il tetraidrocannabinolo (THC) (1) può interagire con i recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2 nel sistema endocannabinoide umano e ha una serie di proprietà farmacologiche note, come la modulazione del dolore, della spasticità, della sedazione, dell'appetito e dell'umore, inoltre ha azione broncodilatatoria, antiossidante, antinfiammatoria e neuroprotettiva. Tuttavia, i suoi effetti psicoattivi ne limitano notevolmente l'uso. La forma acida del THC (THCA) (4) è in grado di modulare il rilascio di citochine infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale-C (TNF-C) ed allo stesso tempo causa il rilascio di citochine antinfiammatorie, in particolare l'interleuchina 10, con effetti analgesici ed antinfiammatori sfruttabili soprattutto in pazienti con artrite reumatoide (De Petrocellis et al., 2011).

Il cannabidiolo (CBD) (2) non ha attività psicoattiva e ha proprietà neuroprotettive con azione antiossidante, antinfiammatoria, anticonvulsivante e antipsicotica. Ha un'affinità molto bassa per i recettori CB, infatti si ritiene che abbia meccanismi d'azione indipendenti da CB1 e CB2.

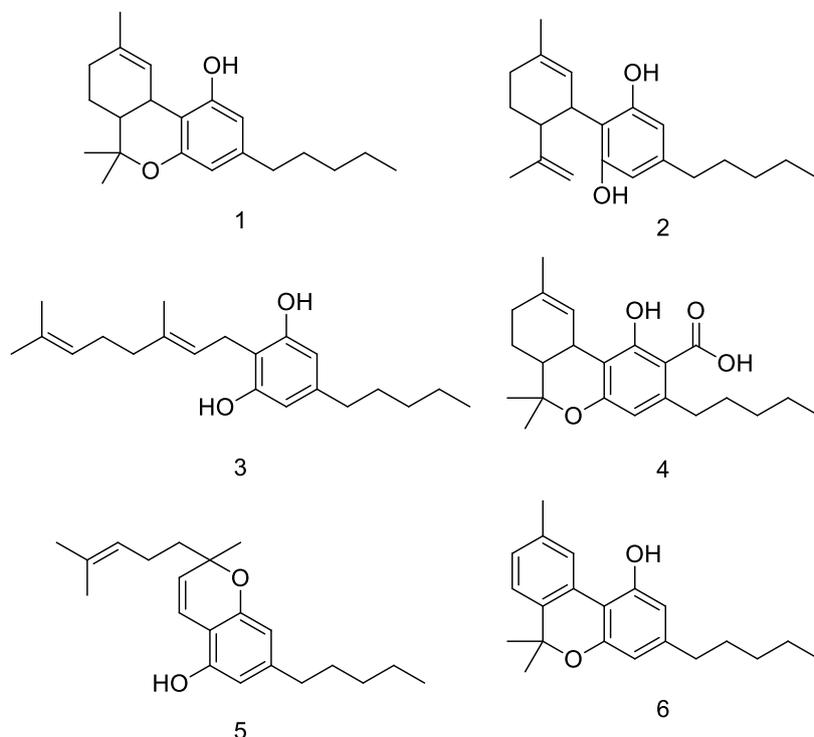
Il cannabicromene (CBC) (5) è stato isolato per la prima volta dalla *C. sativa* nel 1966, ha azione antiinfiammatoria (Wirth et al., 1991-1995). Inoltre è un potente agonista del recettore canale TRPA1, è in grado di attivare TRPV3 e TRPV4 e bloccare TRPM8 (De Petrocellis et al., 2011).

Il cannabinolo (CBN) (6) è un costituente relativamente minore nel materiale vegetale fresco, poiché è un prodotto di ossidazione del THC (1). Il contenuto di CBN (6) aumenta man mano che il THC (1) si degrada durante la conservazione ed è solitamente considerato un marcatore chimico per condizioni di conservazione prolungate. Il CBN (6) ha una bassa azione psicoattiva, mostra una maggiore affinità per il recettore CB2, mentre è un debole agonista CB1; inoltre è un potente agonista del recettore TRPA1 e antagonista del recettore canale TRPM8 (De Petrocellis et al., 2011). Il CBN (6) possiede un'attività antiossidante che si manifesta nella sua

² <https://www.clinn.it/it/chemiotipi-cannabis.html>

capacità di eliminare i radicali liberi, di prevenire il processo di ossidazione e di ridurre gli ioni metallici (Dawidowicz et al., 2021).

Il CBG (3) non è un composto psicoattivo, presenta effetti antibatterici, antifungini ed è in grado anche di modificare i processi infiammatori, riducendo la fosforilazione di I κ B- α , riducendo così l'attività trascrizionale del fattore nucleare NF κ B, responsabile della trascrizione di molte citochine proinfiammatorie, tra cui TNF α e IL-1 β . Similmente agli endocannabinoidi, il CBG (3) attiva i recettori CB1 e CB2 ma ha una bassa affinità per questi recettori (circa 5 volte e 27 volte inferiore al THC (1)). La minore affinità del CBG (3) per il CB1 rispetto ad altri fitocannabinoidi spiega la mancanza di effetto psicotropo. Il CBG (3) mostra un'attività contro diversi recettori della famiglia TRP, inclusa l'azione come un forte agonista del TRPA1 e un debole agonista del TRPV1. È anche un potente inibitore del TRPM8. Inoltre, è stato dimostrato che agisce come un potente agonista del recettore adrenergico α 2 e blocca moderatamente i recettori 5-HT1A. Il CBG (3) e i suoi derivati (sia naturali che sintetici) sono stati testati negli ultimi anni come aiuto nell'alleviare gli effetti negativi della chemioterapia, nel trattamento dei disturbi dell'umore (compresa la depressione) e delle malattie neurodegenerative (Jastrzab et al., 2022).



1.3 Biosintesi dei cannabinoidi:

Nella *Cannabis sativa* sono stati identificati oltre 150 fitocannabinoidi i quali sono in grado di attivare i recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2 (Brenneisen et al., 2007).

Tutti i cannabinoidi derivano da un precursore comune: il cannabigerolo acido (CBGA) (7), il quale si genera dalla reazione tra acido olivetolico (8) e geranil pirofosfato (GPP) (9). Essi sono ottenuti da due diverse vie biosintetiche: la via del mevalonato, dalla quale si forma il GPP (9), ottenuto per condensazione tra l'isopentil pirofosfato (IPP) (10) ed il dimetilallil pirofosfato (DMAPP) (11), mediata dall'enzima geranil pirofosfato sintetasi, e dalla via del malonato, la quale porta alla formazione dell'acido olivetolico (8), la cui sintesi parte dall'esanoil-CoA (12) (Luo et al., 2019), (Korthout et al., 2010).

La condensazione tra il geranil pirofosfato (9) e l'acido olivetolico (8) è catalizzata dall'enzima geranil transferasi olivetolica (GOT), e porta alla formazione del precursore CBGA (7). Da questo composto, mediante l'azione degli enzimi CBDA, THCA e CBCA sintasi, si formano: il cannabidiolo acido (CBDA) (13), il cannabicromene acido (CBCA) (14) e il tetraidrocannabinolo acido (THCA) (4) (*Figura 2*).

In natura, tutti i cannabinoidi acidi non sono stabili, poiché tendono a decarbossilare naturalmente con il tempo, in seguito a riscaldamento o per esposizione alla luce, questo fenomeno inizia spontaneamente, anche se non in modo intensivo, durante la vita vegetativa della pianta.

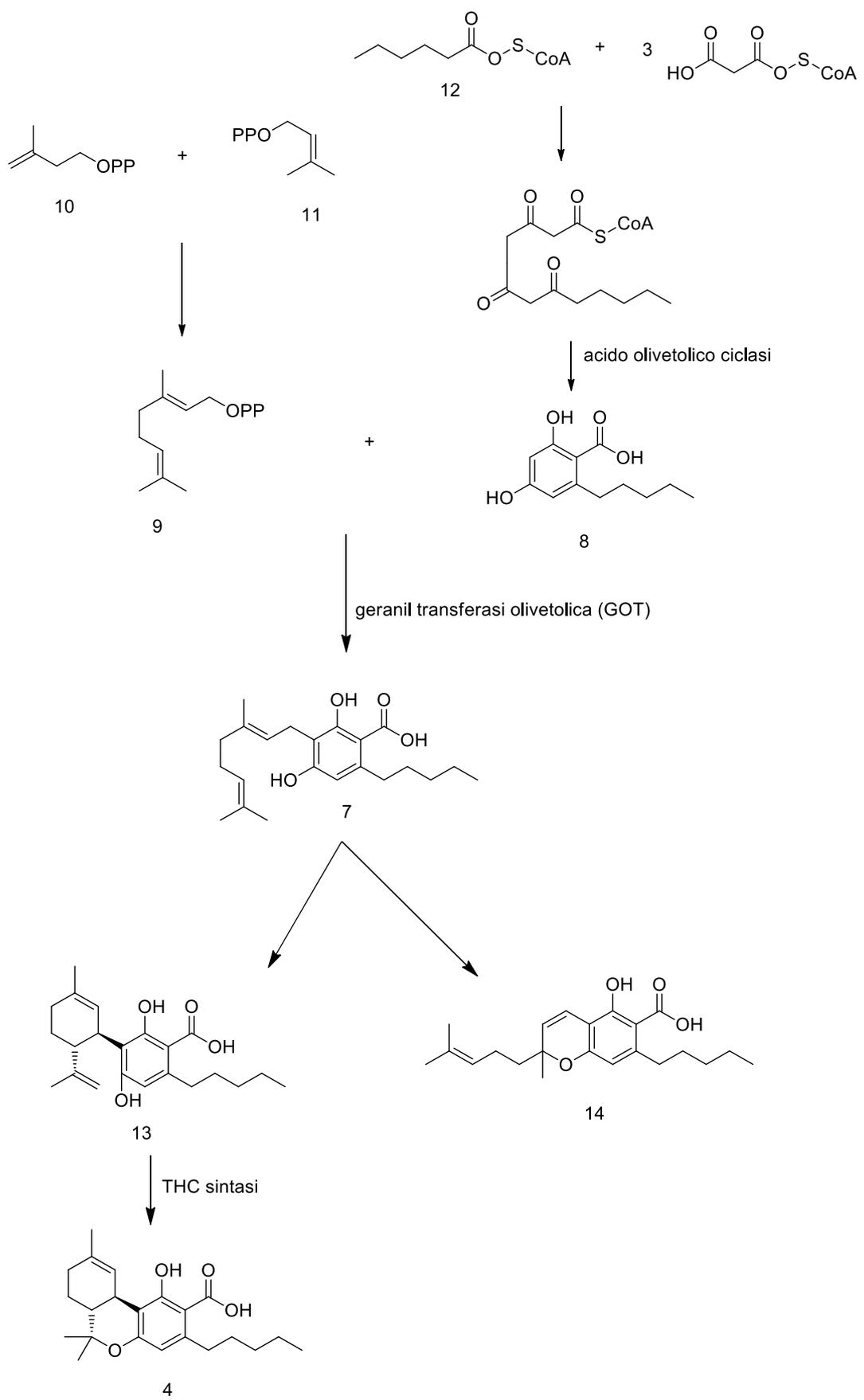


Figura 2 sintesi cannabinoidi acidi

1.4 Decarbossilazione dei cannabinoidi:

La forma naturale dei cannabinoidi è acida caratterizzata dalla presenza di un gruppo carbossilico, il quale, grazie alla presenza dei due gruppi ossidrilici rispettivamente in orto e para, risulta essere molto labile (*Figura 3*).

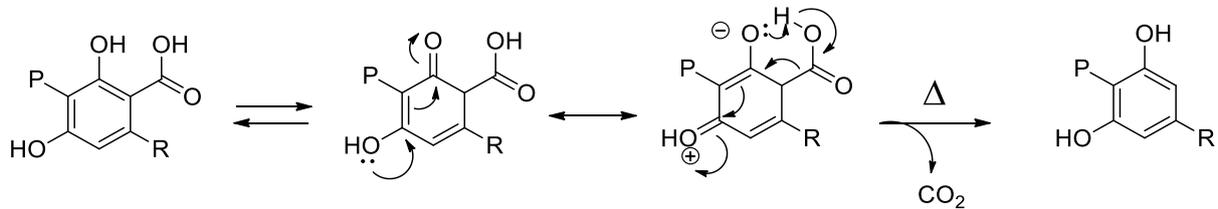


Figura 3 meccanismo di decarbossilazione dei cannabinoidi acidi

Le forme acide subiscono una decarbossilazione non enzimatica, dove viene eliminato il gruppo carbossilico, questo processo è accelerato da fattori ambientali come temperatura, luce e ossigeno. Sebbene molto più lenta, la decarbossilazione avviene anche a temperatura ambiente, in questo modo si formano i composti neutri (*Figura 4*).

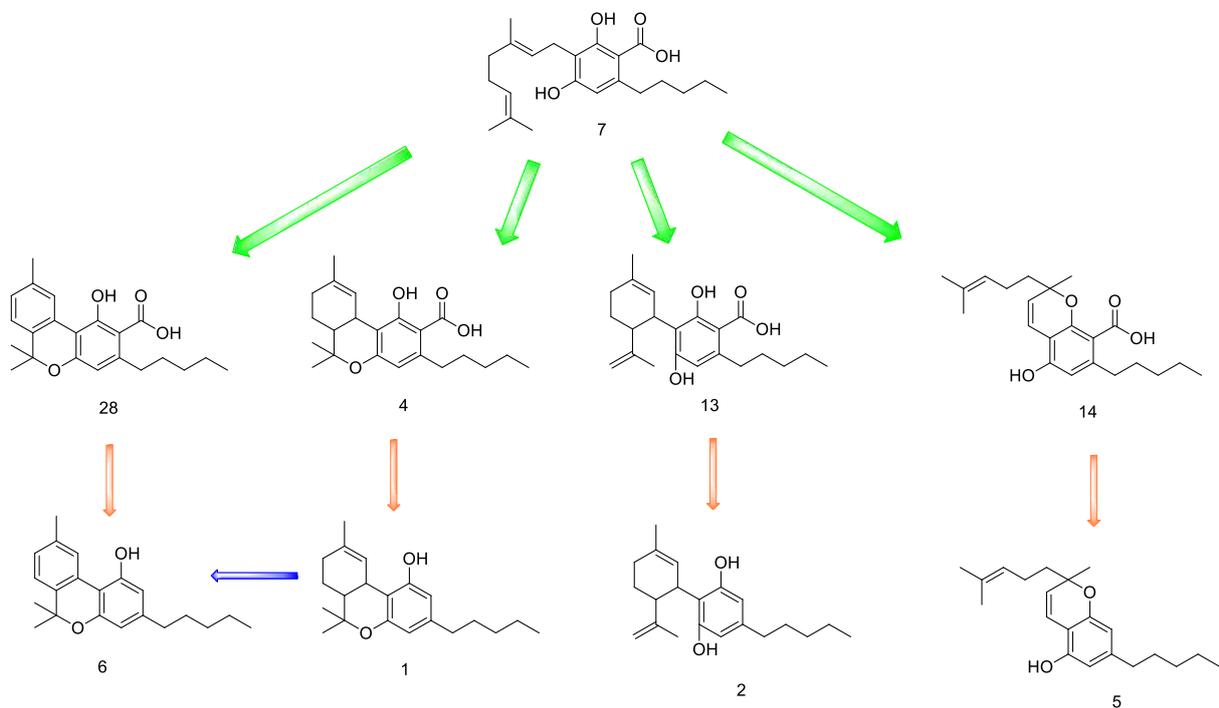


Figura 4 forme acide e neutre dei cannabinoidi maggiori

1.5 Cannabinoidi viridinici:

Gli enzimi sono molecole di natura proteica capaci di catalizzare e quindi accelerare reazioni chimiche con un'alta capacità discriminatoria, ma a volte, gli enzimi possono agire su un substrato diverso da quello che normalmente utilizzano per catalizzare una reazione, e ciò prende la definizione di promiscuità enzimatica. Da una parte, questo legame accidentale, con substrati diversi può provocare problemi, in quanto si potrebbe avere un'attività meno efficiente, ma dall'altra favorisce la biodiversità. Anche nella pianta di *Cannabis sativa* si può parlare di promiscuità enzimatica, in particolare, la capacità dell'enzima geranil-transferasi di riconoscere substrati diversi dall'acido olivetolico (8), come ad esempio l'acido divarinolico (15), questo enzima infatti non discrimina tra molecole aventi una catena alchilica di lunghezza differente rispetto a quella normale a 5 atomi di carbonio. Queste reazioni promiscue permettono la sintesi di cannabinoidi atipici, che presentano una catena alchilica a lunghezza variabile sul nucleo resorcinolico, come i composti viridinici, ciò ha permesso di poter studiare molecole che interagiscono in modo diverso con i recettori del sistema endocannabinoide e che di conseguenza presentano una differente attività rispetto ai cannabinoidi classici.

I cannabinoidi viridinici sono dei cannabinoidi minori (presenti in concentrazione minore rispetto ai maggiori) biosintetizzati a partire dal cannabigerolo viridinico acido (CBGVA) (16). Questi composti si differenziano dai cannabinoidi perché possiedono una catena propilica sul nucleo resorcinolico, anziché una catena pentilica.

L'enzima geranil-transferasi, non essendo completamente specifico per l'acido olivetolico (8), riconosce l'acido divarinolico (15) (Shoyama et al., 1984), (Bow et al., 2016). In questo modo, seguendo le stesse vie biosintetiche dei cannabinoidi C₅, si ottengono: CBDVA (17), THCVA (18) e CBCVA (19) (*Figura 5*) (De Meijer et al., 2016).

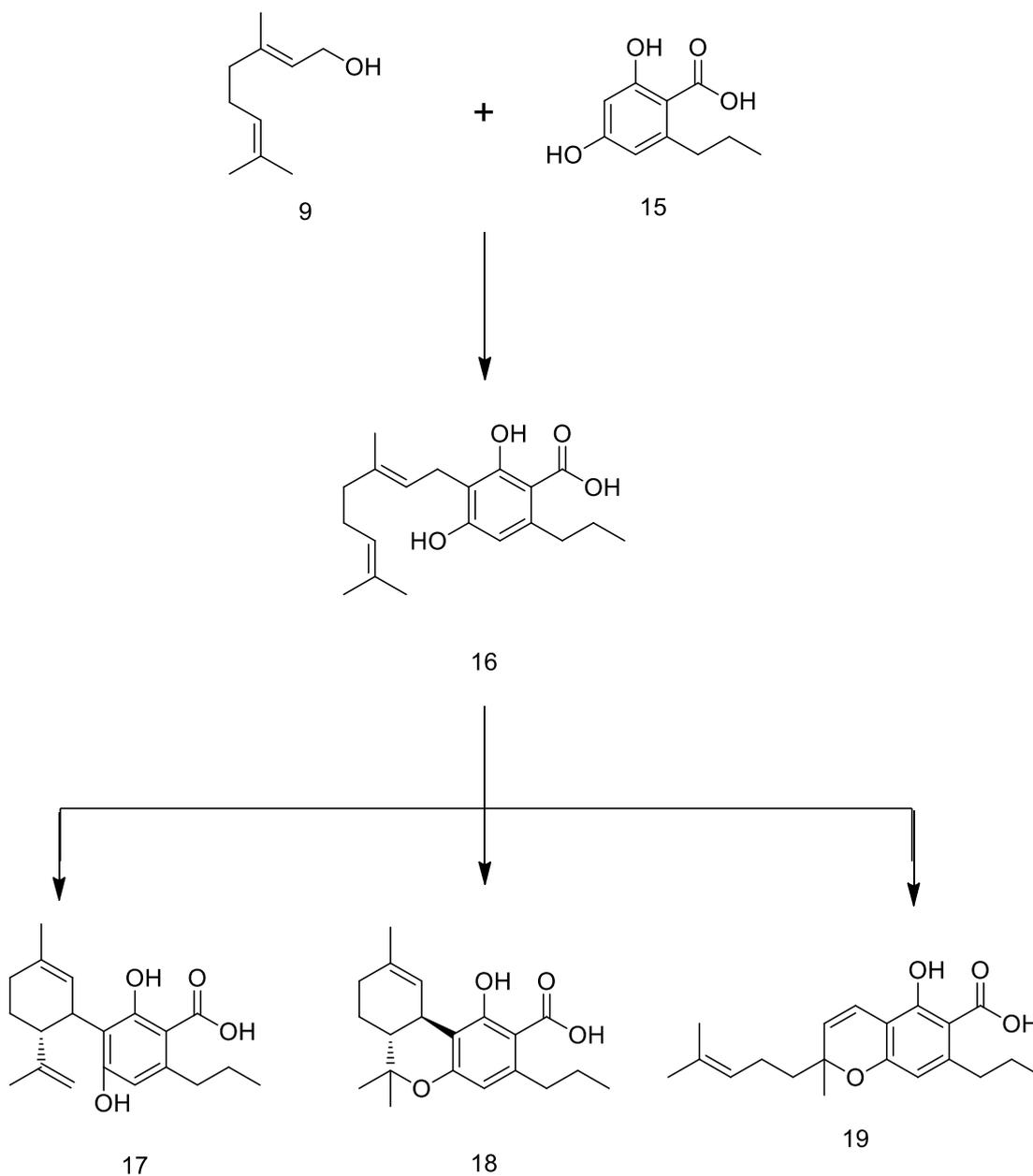


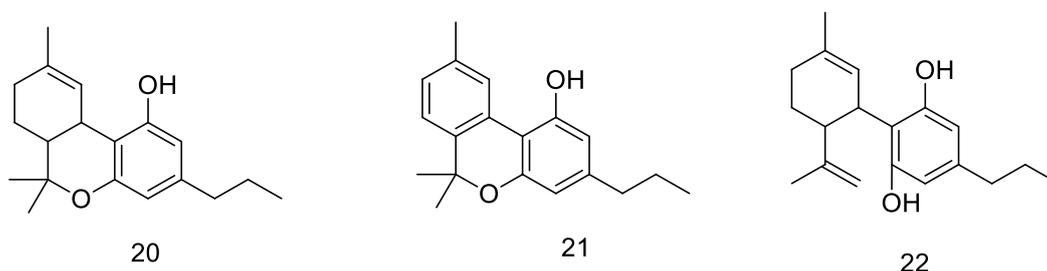
Figura 5: sintesi cannabinoidi viridinici

1.6 Attività dei composti viridinici:

Il THCV (20) è l'analogo *n*-propilico del THC (1), ma possiede un profilo farmacologico diverso su alcuni bersagli molecolari. Infatti, è un agonista parziale del CB2 (Bolognini et al., 2010) e di GPR55, è anche in grado di inibire l'attività dell'agonista completo LPI (Anavi-Goffer et al., 2012), attiva i recettori 5HT1A (Cascio et al., 2015) così come diversi sottotipi dei canali TRP (De Petrocellis et al., 2011).

Il cannabinolo viridinicco (CBNV) (21) è un cannabinoide non psicoattivo e si ottiene dall'ossidazione del THCV (20). L'attività farmacologica di CBNV (21) è stata poco studiata a causa delle basse concentrazioni del composto nella pianta (Merkus et al., 1971), (Merkus et al., 1971), (Bailey et al. 1975).

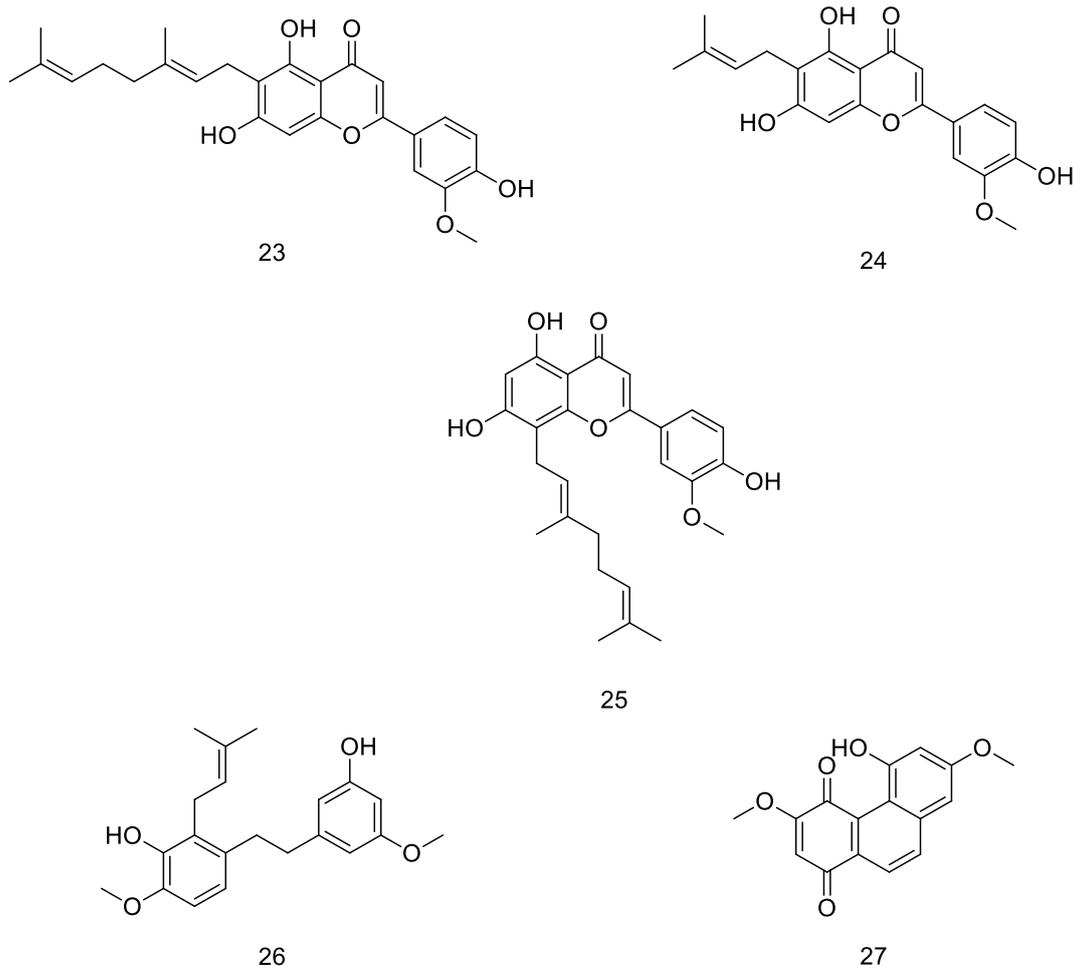
IL cannabidiolo viridinicco (CBDV) (22) agisce da agonista per i recettori TRPA1, TRPV1, TRPV2 e CB2, mentre è un agonista parziale dei recettori D2. Al contrario è un antagonista per i recettori TRPM8, GPR6 e GPR55, inoltre è un inibitore degli enzimi DAGL α e del citocromo CYP1A1.



1.7 Composti non cannabinoidi nella *Cannabis sativa*:

La *C. sativa* è una pianta complessa, capace di produrre più di 480 molecole e molte di queste non fanno parte del gruppo dei cannabinoidi come terpenoidi, carboidrati, acidi grassi saturi, insaturi e i loro esteri e ammidi, fitosteroli, lignani, diidrostilbeni, derivati diidrofenantrenici e stilbenoidi. Oltre a questi composti, nella *C. sativa* sono stati identificati i flavonoidi di cui fanno parte: la cannflavina A (23) che è un geranil-flavone (gruppo geranile legato al C-6), la cannflavina B (24) che è un prenil-flavone e la cannflavina C (25), anch'essa un geranil-flavone (gruppo geranile legato al C-8). La prenilazione avviene sui composti agliconici, quando lo scheletro flavonoico è già stato formato, avviene prevalentemente nel C-8 e nel C-6 dell'anello A e il sostituito più comune è il 3,3-dimetilallile (Pollastro et al., 2018), (Barrett et al., 1985). Le cannflavine A (23) e B (24) sono entrambe inibitori della 5-lipossigenasi, bloccano la produzione della prostaglandina E2, e inibiscono gli enzimi COX, quindi hanno attività antinfiammatoria (Werz et al., 2014), (Barrett et al., 1985). Inoltre i flavonoidi contenuti nella *C. sativa* hanno un'elevata affinità per il recettore degli estrogeni comportandosi come fitoestrogeni (Wang et al., 1997). Nella *C. sativa* sono stati identificati diversi diidrostilbeni come il canniprene (26), cannabistilbene e diidroresveratrolo, ed è stata rilevata anche la presenza dei diidrofenantreni. Il canniprene (26) è un bibenzile isoprenilato in grado di inibire

l'attività della 5-lipossigenasi, la produzione di eicosanoidi infiammatori e influenza anche la generazione di prostaglandine attraverso la via della cicloossigenasi. La concentrazione di canniprene (26) è stata studiata in foglie di diversi ceppi di *C. sativa*, mostrando ampie variazioni, da tracce a > 0,2%, ma non è stata trovata alcuna correlazione tra il suo accumulo e uno specifico chemotipo di pianta (Allegrone et al., 2017). La denbinobina (27) è una molecola derivante dai fenantreni, isolata sia dalla canapa che da varie famiglie del genere *Dendrobium* (orchidee), in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule di adenocarcinoma polmonare umano, inattivando la protein-chinasi B e attivando il promotore della morte cellulare Bcl-2, attraverso l'attivazione della caspasi 3 e del fattore che induce l'apoptosi (AIF) (Kuo et al., 2008). Inoltre agisce su NF- κ B, inibendolo e in questo modo promuove l'apoptosi nelle linee cellulari coinvolte nella leucemia umana ed è in grado di inibire l'attività trascrizionale del virus HIV (Sanchez-Duffhues et al., 2008).



1.8 Effetto entourage:

Gli estratti o fitocomplessi sono delle realtà chimiche molto complesse in cui tutti i composti presenti possono concorrere influenzando un target biologico. Questa modulazione prende il nome di effetto entourage ed è il meccanismo mediante il quale le sostanze contenute in un estratto agiscono in sinergia generando un effetto maggiore di quello che avrebbero da sole. Il risultato potrebbe essere un potenziamento dell'effetto farmacologico atteso, o una sua variazione da quanto atteso. Gli estratti di cannabis non sono esenti da questo fenomeno ed in particolare si possono manifestare effetti del tipo intra-entourage: effetto sinergico mediato esclusivamente da differenti fitocannabinoidi o da differenti terpeni, oppure inter-entourage: effetto di modulazione attribuibile all'interazione tra fitocannabinoidi e terpeni. Il meccanismo biologico con il quale avviene questa sinergia è tutt'ora sconosciuto, la teoria più attendibile riguarda l'attivazione, da parte delle diverse molecole, di diversi pathway biologici, che a loro volta porterebbero all'espressione di geni differenti e quindi a cambiamenti nella bioattività delle cellule (Koltai et al., 2020).

2: Scopo del lavoro

Lo scopo di questo studio fitochimico è quello di determinare il profilo fitochimico di nuovi chemotipi di cannabis: una a viridine e una in cui è stata incrementata la sintesi di CBC tramite l'inibizione della THCA sintasi e della CBDA sintasi. Inoltre è stata analizzata una pianta appartenente al chemotipo V, a zero cannabinoidi al fine di identificare ed isolare composti non appartenenti alla famiglia dei cannabinoidi che normalmente sono poco espressi dalla *C. sativa*.

Il lavoro di ricerca e identificazione di questi composti rari, potrà consentire, una loro valutazione come marker biologici e standard analitici.

3: Risultati e discussione

3.1 Step: estrazione chemotipi di *Cannabis sativa*

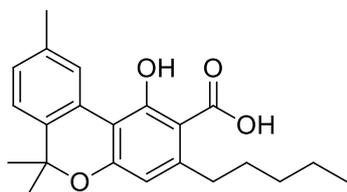
In questo lavoro di tesi sono stati presi in considerazione dei chemotipi o varietà di cannabis di ultima “generazione”: un chemotipo definito TKCV, uno definito CBC e l’ultimo a cannabinoidi zero. Le metodiche che hanno portato alla selezione di tali chemotipi restano riservate.

I protocolli applicati a tutti questi chemotipi al fine di identificare correttamente il loro profilo fitochimico si suddividono in vari step:

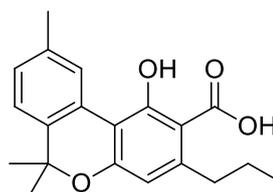
1. Preparazione: il materiale vegetale è controllato per verificare l’assenza di materiale estraneo e poi polverizzato per aumentare la superficie di contatto solido/liquido.
2. Estrazione: avvenuta con acetone e percolazione in modo da esaurire la droga ottenendo un estratto acetone secco tramite evaporazione a pressione ridotta.
3. Rimozione di trigliceridi, acidi grassi, cere e clorofille.
4. Isolamento solido/liquido tramite tecniche cromatografiche in fase diretta e in fase inversa dei metaboliti.
5. Purificazione con HPLC dei metaboliti isolati.
6. Caratterizzazione strutturale tramite analisi NMR.

3.2 Analisi chemotipo a TKCV

L’analisi del profilo fitochimico del chemotipo a TKCV ha messo in evidenza la massiccia presenza di CBN (6) e del suo analogo viridinico CBNV (21) quest’ultimo identificato anche nella sua forma acida (CBNVA (29)).



28



29

Il CBN (6) è dato dall’aromatizzazione del THC (1). Questa aromatizzazione può avvenire per esposizione alla luce, all’ossigeno o dovuta ad un intervallo considerevole di stoccaggio della pianta.

La conversione del THC (1) in CBN (6) procede attraverso la formazione di intermedi idrossilati poco stabili tanto che alcuni non sono mai stati rilevati. E' stato ipotizzato un possibile meccanismo di conversione del THC (1) in CBN (6), sulla base degli intermedi (1a-1f) estratti in uno studio su un campione di pianta conservato per 5 anni (Carbone et al., 2010) (Figura 7).

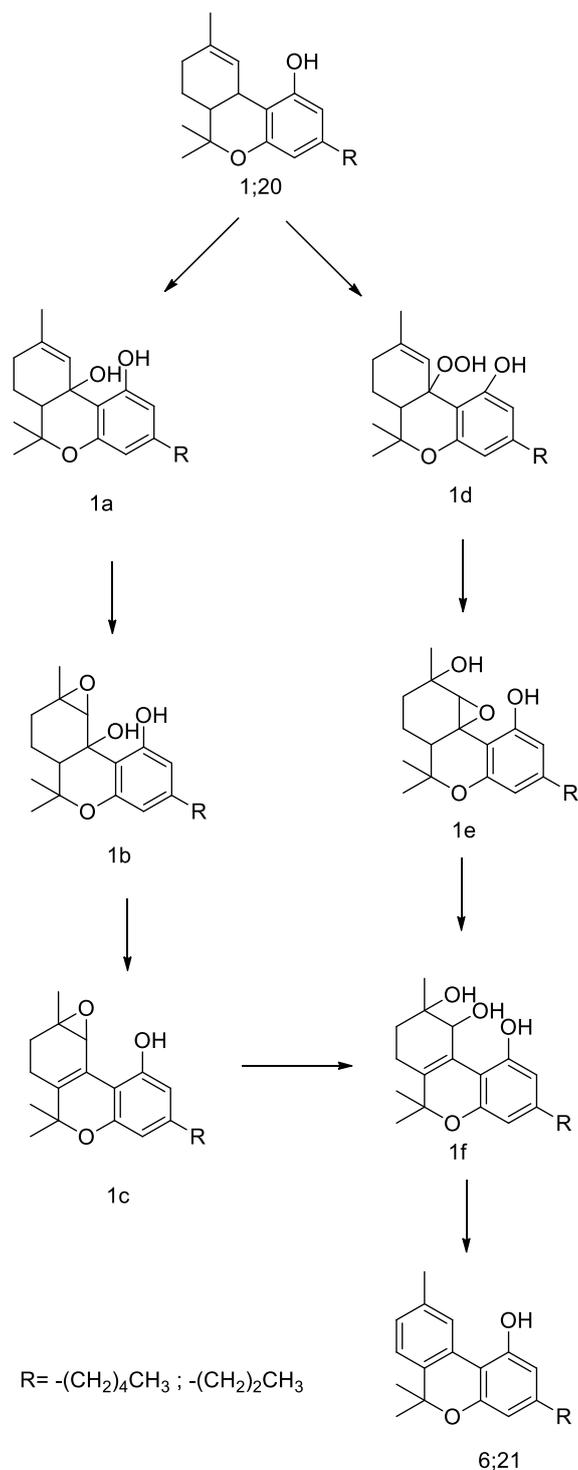


Figura 7 meccanismo di conversione del THC in CBN

Nel campione *Cannabis sativa* L. chemotipo TKCV, oltre al CBNV (21), è stato isolato il 10-idrossi-8,7-diidrocanbivarinolo (30), che potrebbe essere un precursore del CBNV (6). Il 10-idrossi-8,7-diidrocanbivarinolo (30), che nel meccanismo proposto, si formerebbe ragionevolmente nell'ultimo step, quello precedente alla formazione del CBNV (6) (Figura 8).

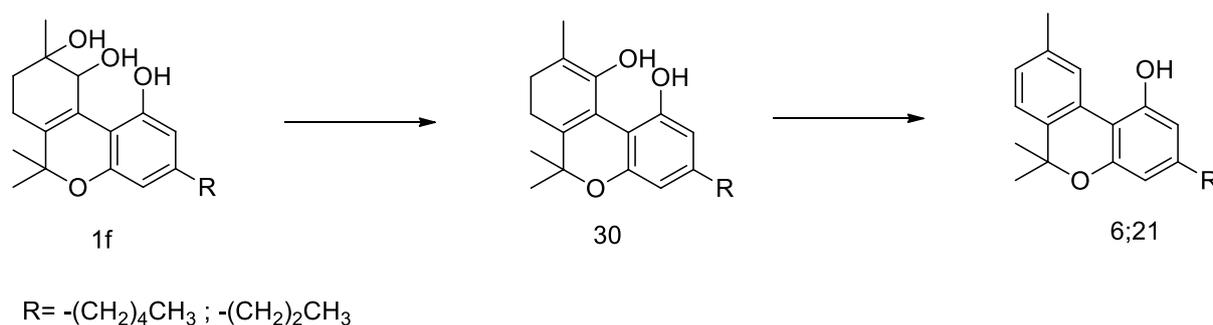


Figura 8 ultimo step della conversione del THC in CBN

Oltre a questi metaboliti secondari, sono stati riscontrati anche tracce di THCA (4) (confermando quindi l'origine di CBN (6)) ma non il suo analogo viridinicco, il THCVA (18). Sorprendentemente l'isolamento di CBNVA (29), suggerisce che la decarbossilazione, seppur spontanea e seppur iniziata a livello vegetativo nella pianta, sia avvenuta in minor entità rispetto all'ossidazione di THCVA (18) al rispettivo aromatico CBNV (29) (Figura 9).



Figura 9 ossidazione e decarbossilazione di THCVA

Questi dati sono in accordo con l'analisi $^1\text{H-NMR}$ di CBNVA (29) rispetto a CBNV (21) in cui si nota la mancanza di un protone aromatico a 6.31 ppm (*Figura 10_a*) e la variazione del segnale da 2.51 ppm a 2.99 ppm dei protoni in 1' (*Figura 10_b*)

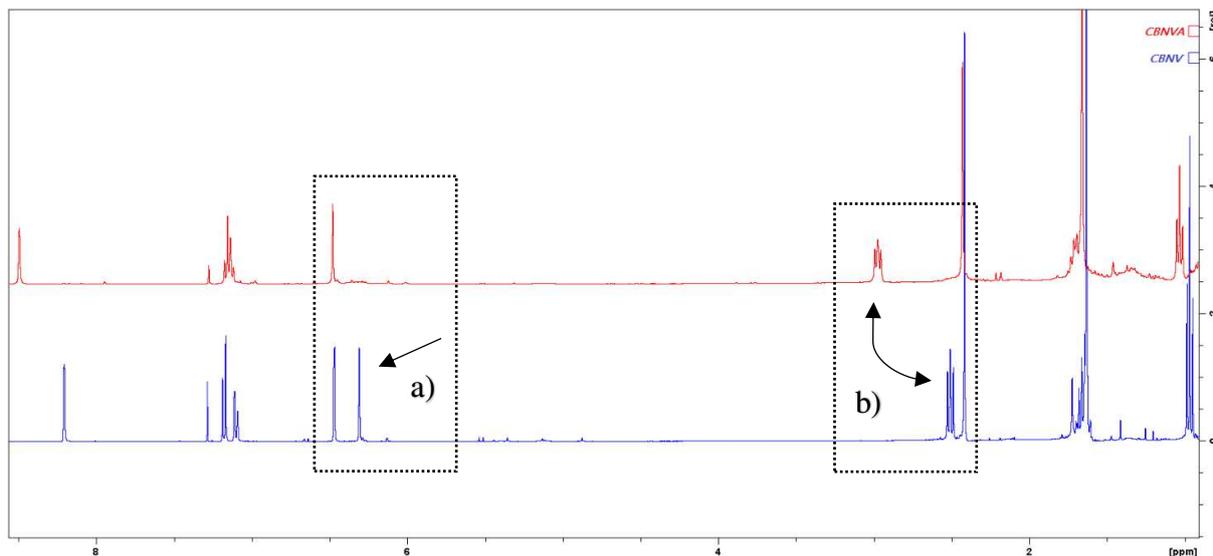


Figura 10 NMR di CBNVA e CBNV

Da studi fitochimici risulta che la decarbossilazione spontanea dei cannabinoidi acidi si completa dopo 3 mesi nell'estratto o nella pianta opportunamente conservata (non esposta a luce e a calore o ossigeno) e che un cannabinoide acido sia stabile conservato a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ per tre mesi, a $5\text{ }^\circ\text{C}$ per due settimane, solo per 4 giorni se isolato e tenuto a RT.

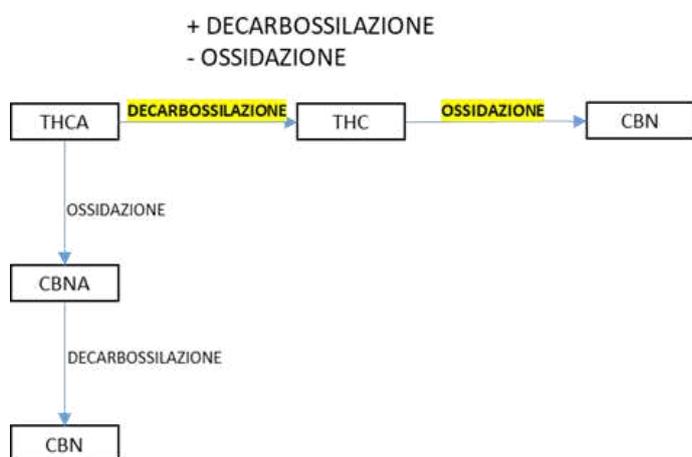


Figura 11 ossidazione e decarbossilazione di THCA

Si stima invece, che nel materiale vegetale opportunamente conservato, la conversione di THC (1) a CBN (6) sia di 5 %/mese nella pianta e di circa 10 %/mese per composto puro. Tutto questo fa supporre che la decarbossilazione possa avvenire più rapidamente rispetto all'aromatizzazione di THC (1) in CBN (6). Tuttavia, alcuni dati possono essere discordanti con quanto presente in

letteratura: infatti si può riportare un evento registrato nel laboratorio di Fitochimica di Novara: a distanza di 10 anni in un campione di canapa stoccato al buio e a temperatura ambiente si è registrata una decarbossilazione minima dei cannabinoidi mentre l'aromatizzazione è stata completa. Inoltre, considerando l'assenza di CBNA (28), si può ipotizzare che la decarbossilazione di THCA (4) in THC (1), sia più veloce di THCVA (18) in THCV (20) (Figura 11). Non è irragionevole supporre che la catena alifatica pentilica influisca sulla velocità di decarbossilazione tramite un maggior effetto elettron donatore.

Nonostante queste osservazioni, CBNVA (29) resta un composto instabile, per ovviare alla sua decarbossilazione il composto è stato quindi esterificato ottenendo il relativo estere metilico: CBNV-metil estere (31). L'esterificazione è stata condotta in presenza di DMAP e *p*-TSA in metanolo poiché la reazione con DMAP e DCC non forniva una resa soddisfacente.

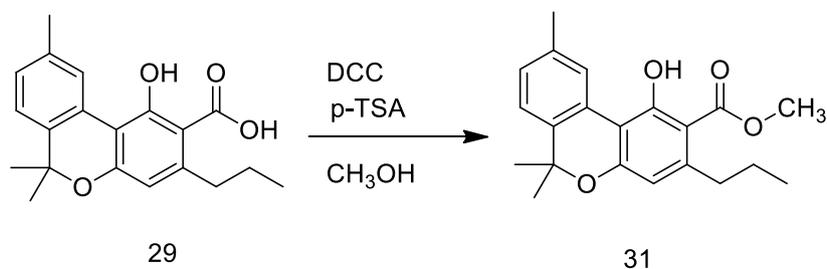


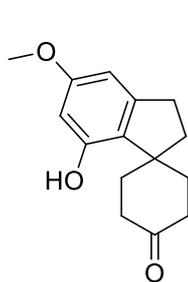
Figura 9 sintesi dell'estere di CBNVA

I composti CBN (6), CBNV (21), CBNV-metil estere (31) così ottenuti sono stati inviati al prof. Andreas Koeberle dell'Università di Innsbruck per una valutazione biologica e struttura-attività.

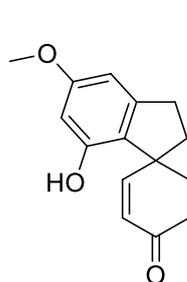
Oltre ai cannabinoidi, nel materiale vegetale sono stati identificati anche composti fenolici non-cannabinoidi tipici di *Cannabis sativa* ma non ubiquitari in tutte le varietà. Tali composti sono i cannabispirani ed in particolare il cannabispirano A (32) ed il cannabispirenone A (33). Altro composto fenolico identificato è stato il canniprene (26), mentre il triterpene lupeolo (34) appartiene alla famiglia dei composti terpenici e non è tipico di cannabis ma identificato in numerose altre piante.

Il profilo fitochimico del chemotipo TKCV è riassunto nella tabella sottostante.

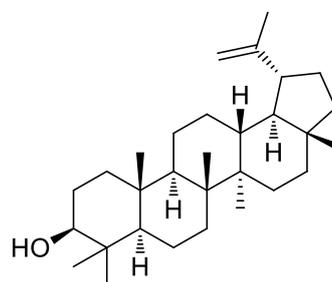
PROFILO FITOCHIMICO DEI METABOLITI SECONDARI CHEMOTIPO TKCV	
CBNVA	0.0895 %
10-idrossi-8,7- diidrocannabivarinolo	0.051 %
CBNV	0.721 %
THC	0.012 %
CBN	0.811 %
Cannabispirenone A	0.0064 %
Canniprene	0.0094 %
Cannabspirano A	0.0377 %
Lupeolo	0.0627 %



32



33



34

3.3 Analisi chemotipo CBC (2022)

Il cannabichromene o CBC (5) è sempre stato considerato un cannabinoide minore a causa della sua esigua concentrazione in chemotipi di cannabis. Tuttavia le sue interessanti proprietà biologiche (vedere introduzione) e le moderne tecniche di ibridazione, selezione e manipolazione genetica hanno recentemente permesso la coltivazione e stabilizzazione di chemotipi in cui il CBC (5) sia presente come cannabinoide maggioritario, come si può notare nella tabella sottostante in cui sono indicati i metaboliti secondari isolati nel chemotipo a CBC fornito da Canvasalus srl.

Come si può notare, è presente una traccia di CBG (3), precursore di CBC (5) ma non si nota formazione di CBD (2) o di THC (1). Questo lascia presupporre che gli enzimi CBDA e THCA sintasi siano stati silenziati al fine di favorire una over-biosintesi di CBC (5).

Altri composti presenti sono il diidrostilbenoide canniprene (26), il flavonoide C-monoprenilato cannflavina B (24) mentre è assente l'analogo superiore, il C-geranil derivato cannflavina A (23). Si riscontrano anche tracce di lupeolo (34).

PROFILO FITOCHIMICO DEI METABOLITI SECONDARI	
CBC	2.42 %
Lupeolo	0.0026 %
CBG	0.25 %
Canniprene	0.096 %
Cannflavina B	0.0026 %

3.4 Analisi del chemotipo zero cannabinoidi (2020)

La selezione del chemotipo a zero cannabinoidi è resa possibile dal silenziamento delle prenil-transferasi aromatiche responsabili dell'unione dell'unità terpenica con quella polichetidica. Un altro meccanismo che rende possibile l'esistenza di questa varietà è la selezione di piante con tricomi ghiandolari (spazio in cui si accumulano i cannabinoidi) disfunzionali.

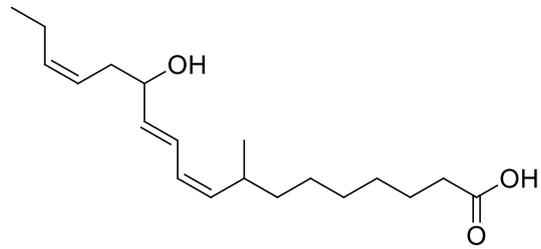
L'analisi fitochimica di questo chemotipo ha infatti evidenziato la totale assenza di cannabinoidi e la presenza di alcuni metaboliti secondari tra cui l'ossilipina (35), derivante dal metabolismo degli acidi grassi, ed i composti fenolici cannabispirano A (32) e denbinobina (27). Quest'ultima merita particolare attenzione.

La denbinobina (27) è un derivato del fenantrene, appartenente alla classe degli stilbeni, isolata per la prima volta da piante del genere *Dendrobium* ma isolata anche in un chemotipo ad alto contenuto di CBG di cannabis. La molecola è particolare soprattutto per il suo profilo biologico poiché possiede un effetto citotossico contro diversi tipi di linee cellulari tumorali umane, come il carcinoma polmonare e la linea cellulare di leucemia HL-60 (Lee et al., 1995). Inoltre è stato valutato l'effetto antitumorale mediato su una linea cellulare di leucemia mieloide K562 umana, dove la denbinobina ha inibito la vitalità cellulare in modo concentrazione dipendente, mostrando effetti antitumorali nelle cellule K562 attraverso l'aumento dei livelli di polimerizzazione della tubulina e la deregolamentazione della segnalazione di Bcr-Abl.

L'analisi del ciclo cellulare ha illustrato che l'esposizione alla denbinobina (27) ha causato un accumulo di fase G2/M in modo dipendente dal tempo, inoltre la polimerizzazione della tubulina nelle cellule è stata apparentemente potenziata dalla denbinobina (27), la quale ha anche soppresso significativamente l'espressione della proteina adattatrice Bcr-Abl e la fosforilazione della tirosina chinasi CrkL.

Quindi la denbinobina (27) induce meccanismi antiproliferativi e apoptotici nelle cellule della leucemia cronica umana inducendo l'arresto mitotico e l'apoptosi nelle cellule K562 attraverso il potenziamento dei livelli di tubulina polimerizzata e la deregolamentazione della segnalazione Bcr-Abl (Huang et al., 2005).

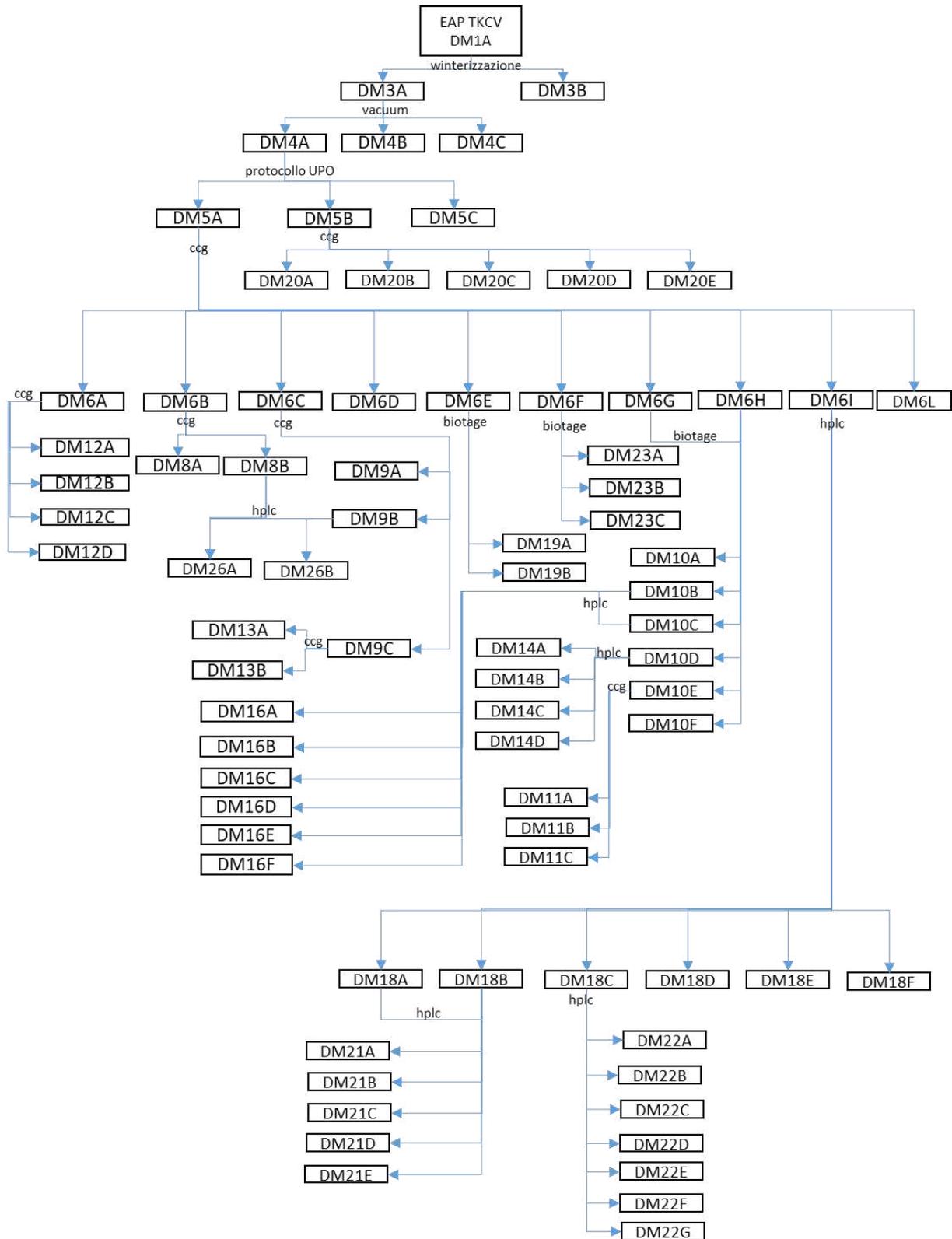
PROFILO FITOCHIMICO DEI METABOLITI SECONDARI	
Cannabispirano A	0.0068 %
Denbinobina	0.00164 %
Ossilipina	0.0066 %



35

4: Parte sperimentale

4.0 Chemotipo TKCV



4.1 Estratto acetónico primario da *Cannabis sativa* L. chemotipo TKCV (2014)

Materiale e vetreria: pallone 1 L, imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtri di carta, pompa a vuoto, acetone.

Procedimento: 318.90 g di materiale vegetale (infiorescenze) di *Cannabis sativa* L. chemotipo TKCV fornita da Canvasalus SRL, finemente tritate, sono estratte, (2 x 12 h) con acetone in un percolatore verticale da 10 L in acciaio inox, usando un rapporto droga/solvente 1:10 p/V. Al termine l'estratto è filtrato con un imbuto dotato di sinterizzato e raccordo per il vuoto, protetto da filtro di carta al fine di rimuovere eventuali residui di materiale vegetale. Infine, si evapora il solvente a rotavapor ottenendo un estratto acetónico primario DM1A, 34 g (resa 10.66%), dal colore marrone scuro, molto viscoso.

4.2 Winterizzazione di DM1A

Scopo: eliminare cere, acidi grassi saturi e poliprenoli insolubili in alcoli a freddo.

Materiale e vetreria: pallone da 500 mL, imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per la pompa a vuoto, filtro di carta, pompa a vuoto, celite, metanolo.

Procedimento: Si filtra a vuoto, su un letto di celite, in un imbuto dotato di setto sinterizzato protetto da filtro di carta e raccordo per il vuoto, per ottenere la frazione metanolica (DM3A di 32.49 g) e la frazione insolubile (DM3B di 1.85 g).

4.3 Vacuum chromatography di DM3A

Scopo: eliminare gli acidi grassi insaturi, le clorofille ed i pigmenti che potrebbero portare a foto-ossidazione

Materiale e vetreria: imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtro di carta, imbuto gocciolatore, RP C-18, frazioni da 50 mL, metanolo.

Carico: 32.49 g DM3A

Fase stazionaria: 100 g di silice (1:3 p/p)

Eluente di impaccamento: MeOH/ Acetone / THF

Volume frazioni: 50 mL

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	UV	QUANTITÀ	NOTE
DM4A	1-6	Metanolo	+	30.13 g	Ulteriormente frazionato
DM4B	7-12	Acetone	+/-	2.74 g	Acidi grassi
DM4C	12-13	THF	-	0.16 g	Clorofille

4.4 CCG di DM4A (frazione metanolica)

Procedimento: la frazione metanolica (DM4A) è filtrata a vuoto con solventi a diversa polarità in modo da facilitare le successive purificazioni e caratterizzazioni dei metaboliti secondari.

Carico: DM4A: 30.13 g

Fasi stazionarie: silice (1:3 p/p); celite (1:3 p/p),

Fase mobile: petroliere (1:15 p/v), EtOAc (1:15 p/v)

Volume frazioni: 100 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM5A	1-6	Petroliere	17.89 g	+	CCG
DM5B	7-13	Etilacetato	11.16 g	+	CCG
DM5C	14-16	THF	0.48 g	-	Lavaggio - out

4.5 CCG di prima generazione di DM5A (frazione apolare)

Scopo: Separazione delle molecole in base alla polarità.

Carico: 17.89 g, DM5A

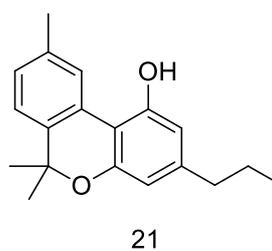
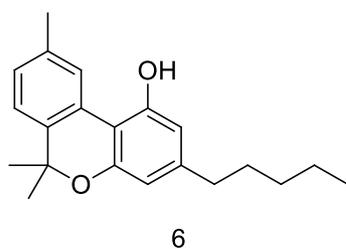
Fase stazionaria: Silice 500 mL

Eluente di carico: Pe

Volume frazioni: 20 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM6A	49-51	8/2	430 mg	+	CCG
DM6B	52-55	8/2	1.02 g	+	CCG
DM6C	56-63	8/2	2.08 g	+	CCG
DM6D	64-70	8/2	1.70 g	+	CBN (6) + CBNV (21)
DM6E	71-102	8/2-7/3	3.88 g	+/-	CCG
DM6F	103-113	7/3	1.19 g	+	CBNVA (30) impuro
DM6G	114-125	6/4	1.15 g	+/-	unito a DM6H
DM6H	126-137	6/4	1.01 g	+/-	BIOTAGE
DM6I	138-166	4/6-2/8	2.83 g	+	BIOTAGE
DM6L	167-177	2/8-EtOAc	1.10 g	-	out



4.5.a CCG di DM6B

Carico: 1.02 g, DM6B

Fase stazionaria: Silice 50 mL

Eluente di carico: 8/2

Volume frazioni: 20 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM8A	2-3	8/2	260 mg	+	miscela poliisopreni
DM8B	4-7	8/2	790 mg	+	CBN (6) + CBNV (21)

4.5.b CCG di DM6C

Carico: 2.08 g, DM6C

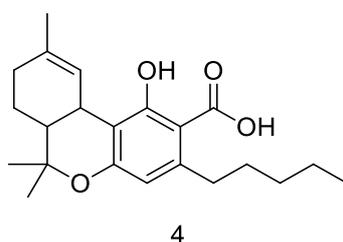
Fase stazionaria: Silice 100 mL

Eluente: 8/2

Volume frazioni: 20 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM9A	3-6	8/2	1.59 g	+	CBN (6) + CBNV (21)
DM9B	7-8	8/2	520 mg	+	CBN (6) + CBNV (21)
DM9C	9-18	7/3	100 mg	+	CBN (6) + THCA (4)



4.5.c Biotage di DM6G + DM6H in RP-C 18

Carico: 2.16 g di DM6G+DM6H adsorbiti su RP C-18 (rapporto p/p 1:2)

Colonna: SNAP Ultra C18 30g

Solventi: A: acqua + 0,3% acido formico; B: metanolo +0,3% acido formico

Metodo: a gradiente

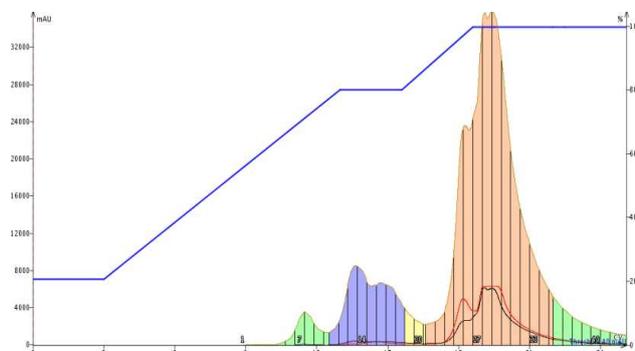
Temperatura: RT

Metodo di rivelazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

Volume max frazioni: 18 mL

Ogni frazione ottenuta con il Biotage, utilizzando RP C-18 ed acqua/metanolo come solvente, è stata ripartita in EtOAc/brine. Dopo aver evaporato il metanolo, segue anidrifcazione con Na₂SO₄, filtrazione ed evaporazione del solvente dalle frazioni organiche.

VOLUMI DI COLONNA	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
3	80	20
10	20	80
3	0	100
7	0	100



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	QUANTITÀ	NOTE
DM10A	6-9	65.20 mg	Cannabispirano A (33)
DM10B	12-14	142.20 mg	unito a DM10C
DM10C	15-19	219.40 mg	HPLC
DM10D	22-26	206.3 mg	HPLC
DM10E	27-35	1.2366 g	CCG
DM10F	36-40	98.4 mg	out

4.5.d HPLC semipreparativa di DM10B + DM10C

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

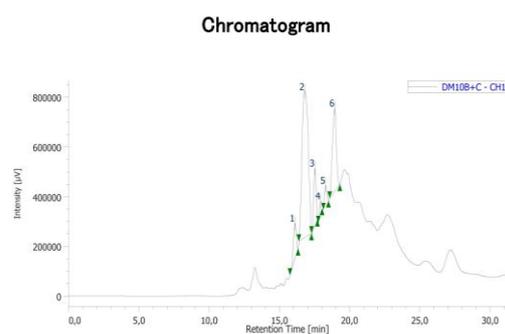
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 316.60 mg di DM10B+DM10C in 3 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 3 iniezioni

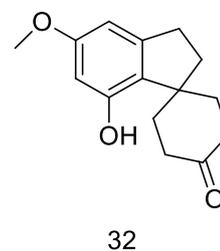
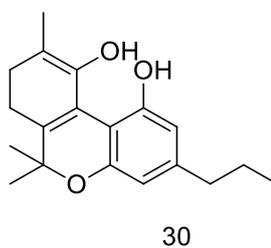
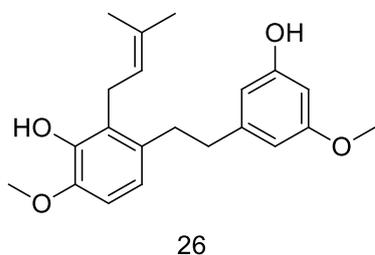
MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
15	60	40
20	30	70
20	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM16A	10.60 mg	derivato diidrofenantrene
DM16B	12.80 mg	out miscela flavonoidi
DM16C	34.60 mg	Canniprene (26) impuro
DM16D	38.40 mg	10-idrossi-8,7-diidrocannabivarino (30)

DM16E	96.90 mg	10-idrossi-8,7-diidrocannabivarinolo (30)
DM16F	34.10 mg	Cannabispirano A (32)



4.5.e HPLC semipreparativa di DM10D

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

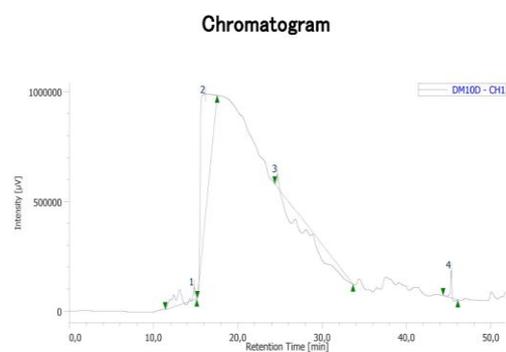
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

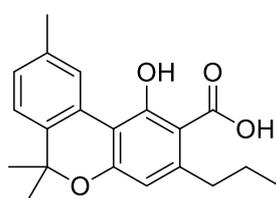
Carico: 206.30 mg di DM10D in 2 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 2 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
20	70	30
20	30	70
15	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM14A	3.40 mg	out
DM14B	72.10 g	CBNVA (29) (unito a DM23B)
DM14C	42.80 g	out
DM14D	23.50 mg	out



29

4.5.f CCG di DM10E

Carico: 1.24 g, DM10E

Fase stazionaria: Silice 50 mL

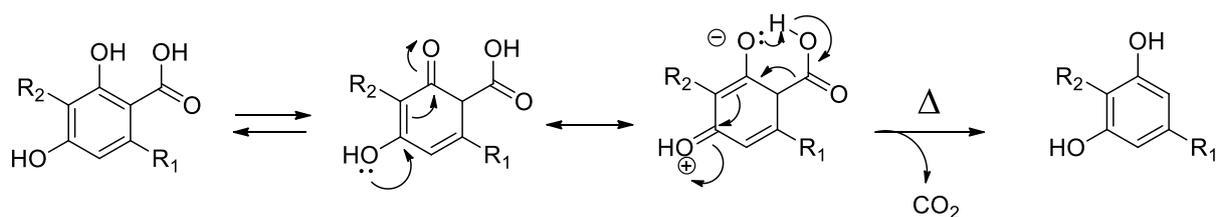
Eluente: 9/1

Volume frazioni: 10 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM11A	11-13	8/2	68.80 mg	+	out
DM11B	14-28	8/2-7/3	344 mg	+	out
DM11C	29-40	7/3-6/4	343.80 mg	+	out

4.5.g decarbossilazione di DM6A e DM9C



Materiale e vetreria: pallone, ancoretta magnetica, agitatore e vetreria standard, bagno ad olio.
Scopo: conversione dei pre-cannabinoidi nei rispettivi cannabinoidi neutri per facilitarne l'isolamento.

Procedimento: La frazione DM6A (430 mg), inserita in un pallone da 25 mL, è posta all'interno di un bagno ad olio di paraffina a 130° per 1 h, durante la reazione si nota la formazione di bolle di CO₂. Il processo è interrotto quando si interrompe il rilascio di CO₂. Al termine della reazione il peso di DM6A è 330.80 mg.

Lo stesso procedimento si applica a DM9C (100 mg) ottenendo un prodotto di 79.70 mg

4.5.h CCG di DM6A

Carico: 330.80 mg, DM6A

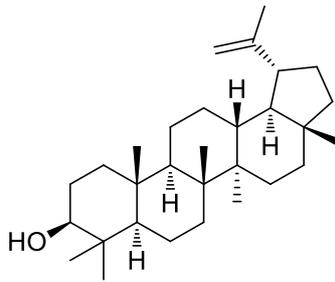
Fase stazionaria: Silice 20 mL

Eluente: Petroletere

Volume frazioni: 10 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM12A	9-12	98/2	180.50 mg	+	Lupeolo (34) impuro
DM12B	13-19	98/2-95/5	100 mg	+	Lupeolo (34)
DM12C	20-32	9/1-8/2	40.30 mg	+	out
DM12D	33-36	8/2	4 mg	+	out miscela fenantreni



34

4.5.i CCG di DM9C

Carico: 79.70 mg, DM9C

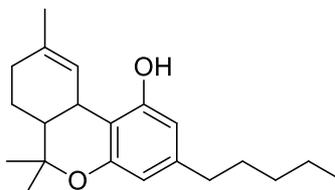
Fase stazionaria: 15 mL

Eluente: 9/1

Volume frazioni: 5 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM13A	1-2	9/1	8.90 mg	+	THC (1)
DM13B	3-6	9/1	61.40 mg	+	THC (1) impuro



1

4.5.1 Biotage di DM6I con RP-C 18

Carico: 2.83 g di DM6I adsorbiti su RP C-18 (rapporto p/p 1:2)

Colonna: SNAP C18 30 g

Solventi: A: acqua + 0,3% acido formico; B: metanolo +0,3% acido formico

Metodo: a gradiente

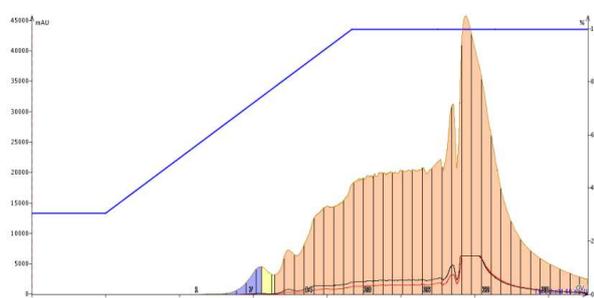
Temperatura: RT

Metodo di rivelazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

Volume max frazioni: 18 mL

Ogni frazione ottenuta con il Biotage utilizzando RP C-18 ed acqua/metanolo come solvente è ripartita in EtOAc/brine dopo aver evaporato il metanolo, segue anidrifcazione con Na₂SO₄, filtrazione ed evaporazione del solvente delle frazioni organiche.

VOLUMI DI COLONNA	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
3	80	20
10	20	80
3	0	100



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	QUANTITÀ	NOTE
DM18A	5-9	71 mg	unito a DM18B
DM18B	10-12	69.30 mg	HPLC
DM18C	13-27	402.40 mg	HPLC

DM18D	28-29	302.20 mg	out
DM18E	30-38	1.40 g	out
DM18F	39-42	152.60 mg	out

Le frazioni DM18A e DM18B sono unite e cristallizzate con etere etilico ottenendo DM18X, cannabispirano A (32) (20.90 mg) e le acque madri che sono state purificate tramite HPLC.

4.5.m HPLC semipreparativa di DM18A + DM18B (acque madri)

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

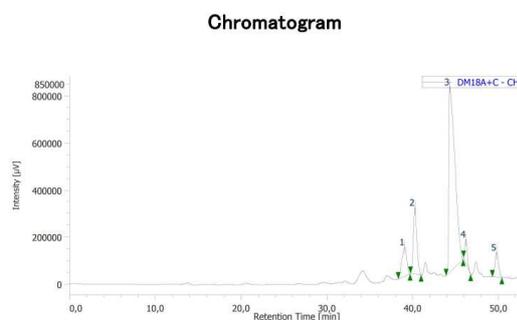
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

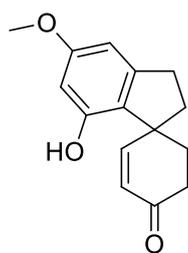
Carico: 140.30 mg in 2 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 2 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
20	70	30
20	30	70
15	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM21A	16.50 mg	out
DM21B	14.50 g	Cannabispirenone A (33)
DM21C	17.50 g	out
DM21D	9.80 g	out
DM21E	2 mg	out



33

4.5.n HPLC semipreparativa di DM18C

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

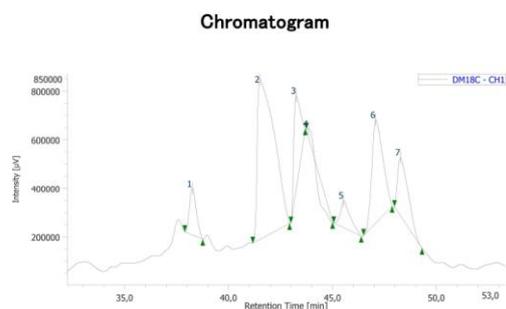
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 200 mg di DM18C in 2 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 2 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
20	70	30
20	30	70
15	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM22A	12.40 mg	Cannabispirenone A (33) impuro
DM22B	28 mg	10-idrossi-8,7-diidrocannabivarinolo (30)
DM22C	17.90 g	out
DM22D	7.40 mg	out
DM22E	14.60 mg	out
DM22F	16.70 mg	Triterpene + CBN (6)
DM22G	13.30 mg	out

4.5.o Biotage di DM6E con RP-C 18

Carico: 3.88 g di DM6E adsorbiti su RP C-18 (rapporto p/p 1:2)

Colonna: SNAP C18 30 g

Solventi: A: acqua + 0,3% acido formico; B: metanolo +0,3% acido formico

Metodo: a gradiente

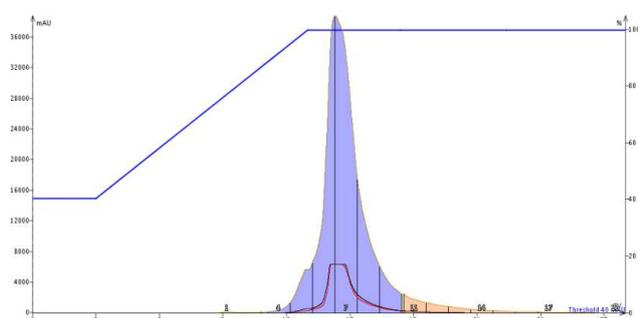
Temperatura: RT

Metodo di rivelazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

Volume max frazioni: 18 mL

Ogni frazione ottenuta con il Biotage utilizzando RP C-18 ed acqua/metanolo come solvente è ripartita in EtOAc/brine dopo aver evaporato il metanolo, segue anidrifcazione con Na₂SO₄, filtrazione ed evaporazione del solvente delle frazioni organiche.

VOLUMI DI COLONNA	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
3	60	40
10	0	100
14	0	100



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	QUANTITÀ	NOTE
DM19A	6-8	426.70 mg	out cere
DM19B	9-11	35.70 mg	out cere

4.5.p Biotage di DM6F con RP-C 18

Carico: 1.19 g di DM6F adsorbiti su RP C-18 (rapporto p/p 1:2)

Colonna: SNAP C18 30g mL

Solventi: A: acqua + 0,3% acido formico; B: metanolo +0,3% acido formico

Metodo: a gradiente

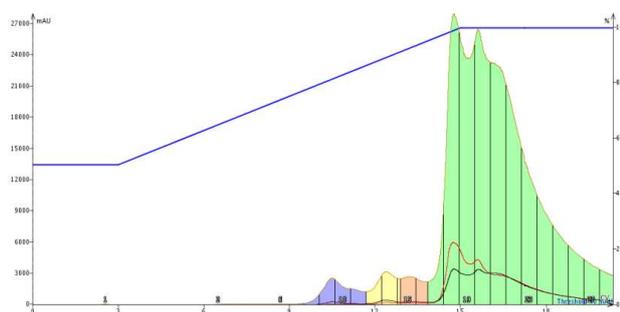
Temperatura: RT

Metodo di rivelazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

Volume max frazioni: 18 mL

Ogni frazione ottenuta con il Biotage utilizzando RP C-18 ed acqua/metanolo come solvente è ripartita in EtOAc/brine dopo aver evaporato il metanolo, segue anidrifcazione con Na₂SO₄, filtrazione ed evaporazione del solvente delle frazioni organiche.

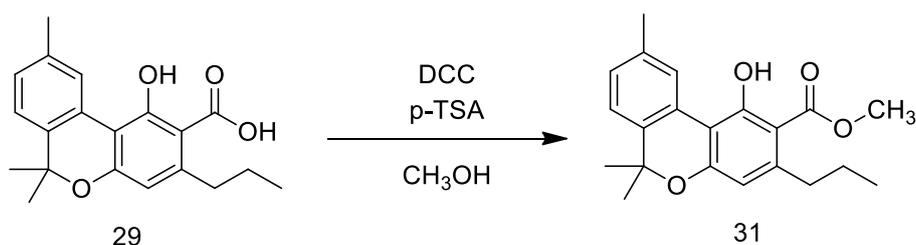
VOLUMI DI COLONNA	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
3	50	50
12	100	0
3	100	0



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	QUANTITÀ	NOTE
DM23A	15-16	28.60 mg	out
DM23B	17-19	213.30 mg	CBNVA (29) (unito a DM14B)
DM23C	20-29	1.03 g	out

4.5.g Esterificazione di DM23B (CBNVA)

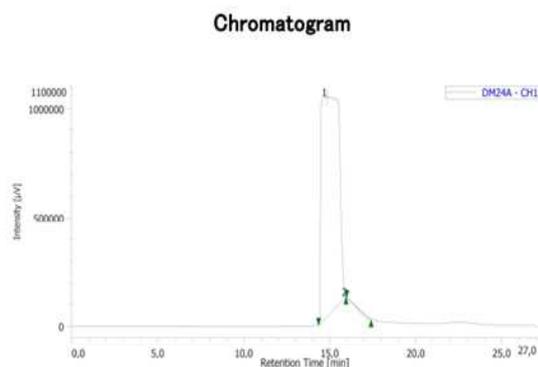


REAGENTE/SOLVENTE	MW	QUANTITÀ	EQ
CBNVA	354.44	50 mg	1
DCC	206.33	60 mg	2
<i>p</i> -TSA	172.20	Punta di spatola	Cat
MeOH	32.04	20 mL	-

Scopo: Proteggere l'acido carbossilico con un metile, per impedire e prevenire la decarbossilazione di CBNVA (29).

Procedimento: 50 mg di CBNVA (29) sono sciolti in 20 mL di MeOH all'interno di un pallone da 25 mL nel quale sono aggiunti 60 mg di DCC ed una punta di spatola di *p*-TSA. La reazione è lasciata procedere a RT in agitazione per 1 h al termine della quale si evapora il MeOH e si aggiunge il toluene posizionando in freezer per 1 ora, e successivamente si filtra su celite per rimuovere la DCU e si evapora il solvente. Il residuo di reazione è purificato con CCG su silice (20 mL) e Pe ed ulteriormente con HPLC (Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco; Solvente: A: Pe, B: EtOAc):

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
20	95	5
5	90	10
5	90	10



Si ottiene la seguente frazione:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM25A	21.60 mg	CBNV-metil estere (31) (resa: 43.20%)

4.6 CCG di prima generazione di DM5B (frazione polare)

Carico: 11.16 g, DM5B

Fase stazionaria: 400 mL

Eluente: 9/1

Volume frazioni: 100 ml

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM20A	3-7	9/1-8/2	262.90 mg	+/-	CBN (6)
DM20B	8-14	8/2-7/3	2.14 g	+	out
DM20C	15-18	6/4	1.68 g	+/-	out
DM20D	19-20	6/4	1.09 g	+	out
DM20E	21-28	4/6-2/8	4.38 g	+	out

4.7 HPLC SEMIPREPARATIVA DI DM6D + DM8B + DM9A + DM9B

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

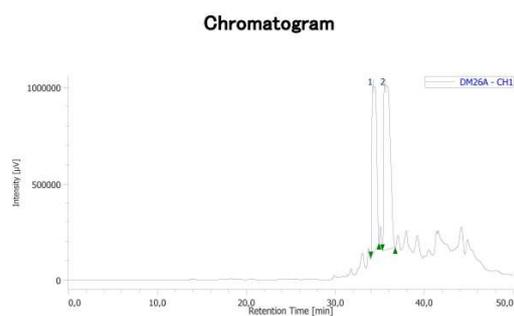
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 200 mg in 2 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 2 iniezioni

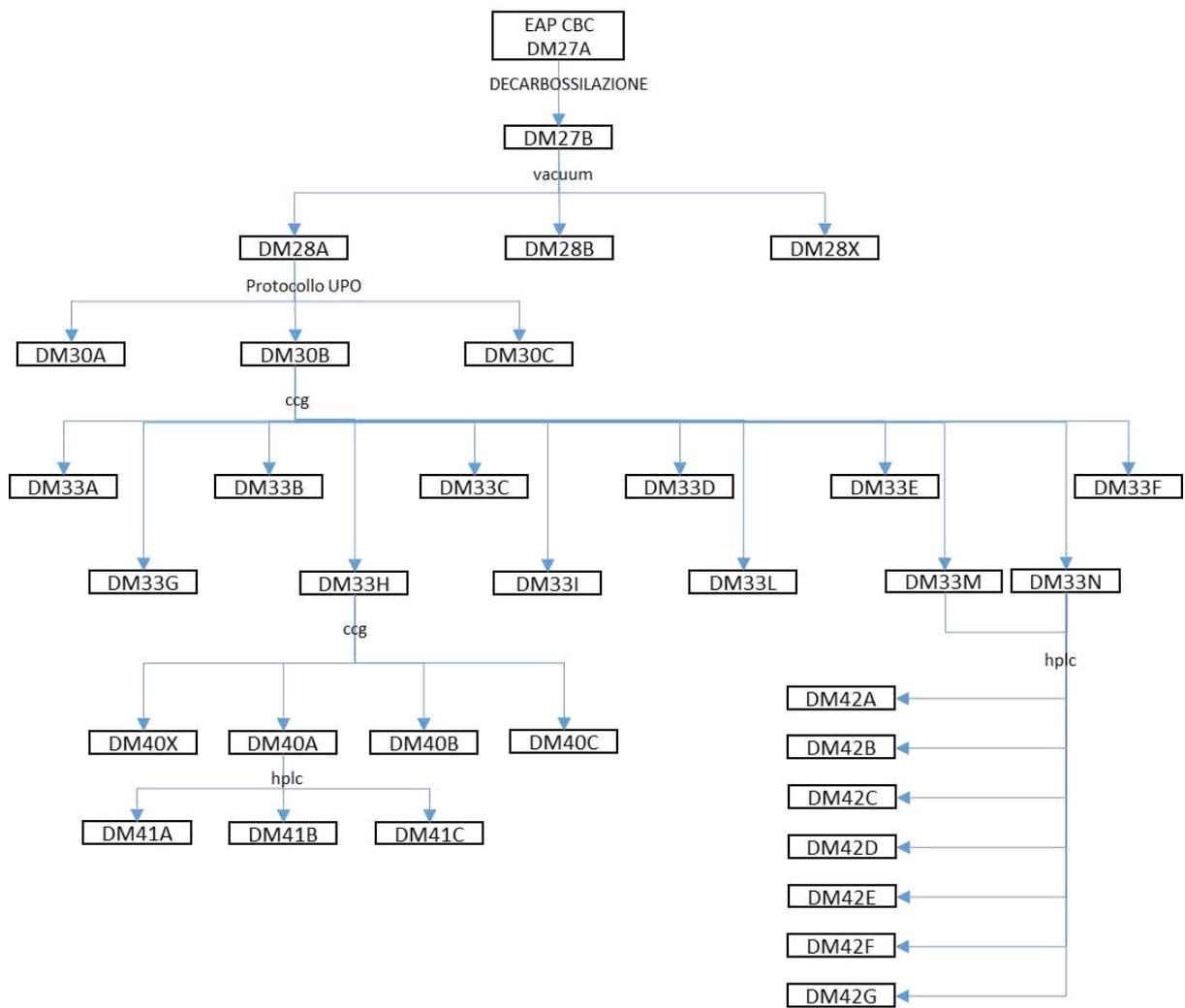
MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
10	98	2
10	85	15
40	85	15



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM26A	49.20 mg	CBN (6)
DM26B	52 mg	CBNV (21)

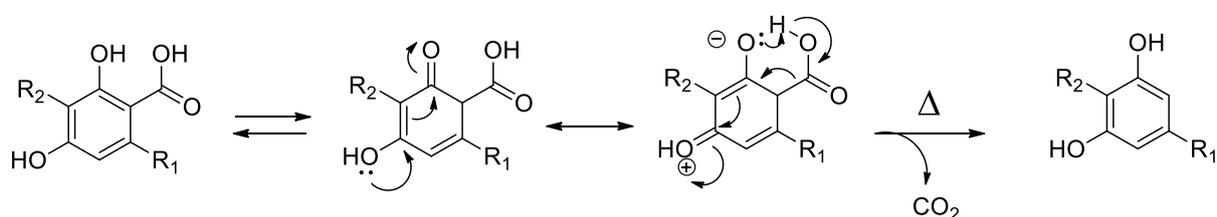
5.0 Chemotipo CBC



5.1 Estratto acetone primario da CBC (2022)

Materiale e vetreria: pallone 1 L, imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtri di carta, pompa a vuoto, acetone.

Procedimento: 194 g di materiale vegetale (infiorescenze) di materiale vegetale, fornita da Canvasalus SRL, finemente tritate, sono estratte, (2 x 12 h) con acetone in un percolatore verticale da 10 L in acciaio inox, usando un rapporto droga/solvente 1:10 p/V. Al termine l'estratto è filtrato con un imbuto dotato di sinterizzato e raccordo per il vuoto, protetto da filtro di carta al fine di rimuovere eventuali residui di materiale vegetale. Infine si evapora il solvente a rotavapor ottenendo un estratto acetone primario DM27A, 10.68 g (resa 5.51%), dal colore verde scuro, molto viscoso.



5.2 Decarbossilazione di DM27A

Materiale e vetreria: pallone, ancoretta magnetica, agitatore e vetreria standard, bagno ad olio.

Scopo: conversione dei pre-cannabinoidi nei rispettivi cannabinoidi neutri per facilitarne l'isolamento.

Procedimento: La frazione DM27A (10.68 mg), inserita in un pallone da 25 mL, è posta all'interno di un bagno ad olio di paraffina a 130° per 1 h, durante la reazione si nota la formazione di bolle di CO₂. Il processo è interrotto quando si interrompe il rilascio di CO₂. Al termine della reazione si ottiene DM27B (8.96 g).

5.3 Vacuum chromatography di DM27B in RPC18

Scopo: eliminare acidi grassi insaturi, clorofille e pigmenti.

Materiale e vetreria: imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtro di carta, imbuto gocciolatore, RP C-18, frazioni da 100 mL, metanolo.

Carico: 8.96 g (DM27B)

Fase stazionaria: 30 g di RPC18

Eluente di impaccamento: MeOH/ Acetone / THF

Volume frazioni: 100 mL

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	UV	QUANTITÀ	NOTE
DM28A	1-7	Metanolo	+/-	6.95 g	Ulteriormente frazionato
DM28B	8-14	Acetone	+/-	1.81 g	out
DM28C	15-18	THF	-	146.10 mg	out

5.4 CCG di DM28A (frazione metanolica)

Procedimento: la frazione metanolica (DM28A) è filtrata a vuoto con solventi a diversa polarità in modo da facilitare le successive purificazioni e caratterizzazioni dei metaboliti secondari.

Carico: DM28A: 6.95 g

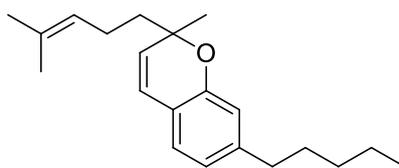
Fasi stazionarie: silice (1:3 p/p); celite (1:3 p/p),

Fase mobile: petroliere (1:15 p/v), EtOAc (1:15 p/v), petroliere/EtOAc 5/5 (1:15 p/v)

Volume frazioni: 50 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM30A	1-4	Pe	590.20 mg	+	CBC (5)
DM30B	5-14	Pe/EtOAc	6.11 g	+	CCG
DM30C	15-17	EtOAc	376.30 mg	-	out



5

5.5 CCG di prima generazione di DM30B

Carico: 6.11 g

Fase stazionaria: Silice 300 mL

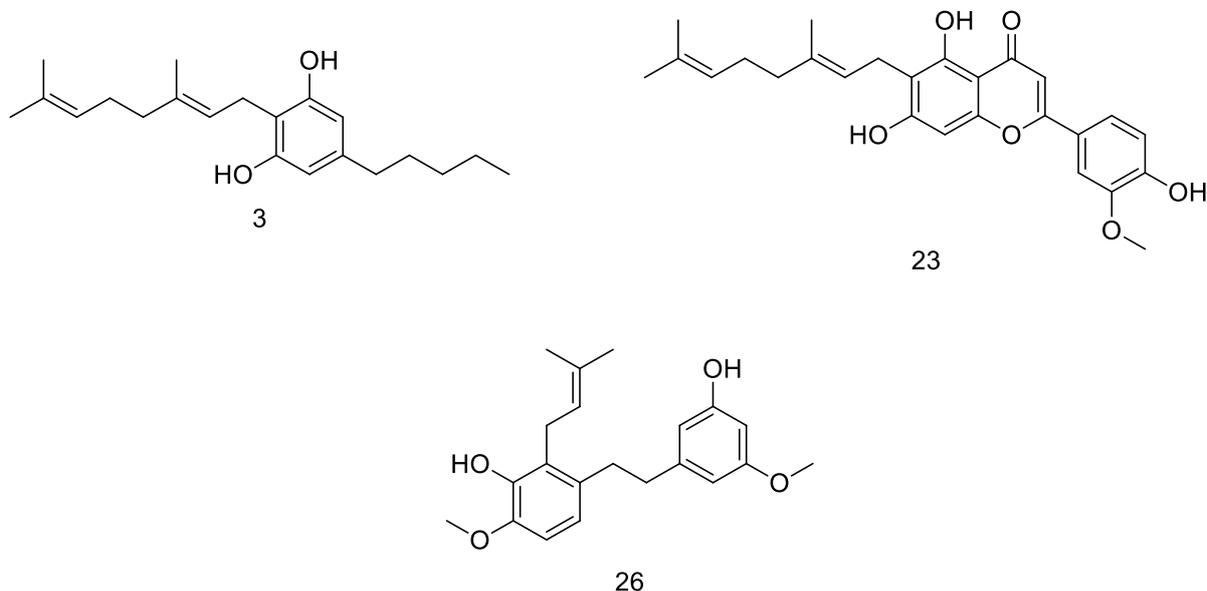
Eluente di carico: Pe

Volume frazioni: 50 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM33A	49-51	9/1	3.69 g	+/-	CBC (5)
DM33B	52-55	9/1-8/2	799 mg	+	CBC (5) (tracce CBG)
DM33C	56-63	8/2	82 mg	+	CBG (3)
DM33D	64-70	8/2-7/3	124 mg	+	out
DM33E	71-102	7/3	242 mg	+	out
DM33F	103-113	6/4	242 mg	+/-	out acidi grassi
DM33G	114-125	6/4-5/5	418 mg	+/-	out acidi grassi
DM33H	126-137	5/5	205 mg	+	Canniprene (26) impuro
DM33I	138-166	5/5-4/6	170.30 mg	+	out
DM33L	167-177	4/6-3/7	221.40 mg	+	Cannflavina A (23)
DM33M	178-187	2/8	94.10 mg	+	unito a DM33N
DM33N	188-194	2/8-1/9	39 mg	-	HPLC

La frazione DM33L è stata cristallizzata e purificata con petroliere. Si sono ottenuti un precipitato cannflavina A (23) e le acque madri.



5.5.a CCG di DM33H

Carico: 205 mg

Fase stazionaria: Silice 15 mL

Eluente di carico: 8/2

Volume frazioni: 20 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM40X	3-5	8/2	17.50 mg	+	out acidi grassi
DM40A	6-11	8/2-7/3	106.70 mg	+	HPLC
DM40B	12-13	7/3	29.40 mg	+	Canniprene (26) impuro
DM40C	14-20	7/3-6/4	30.90 mg	+	out

5.5.b HPLC semipreparativa di DM40A

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

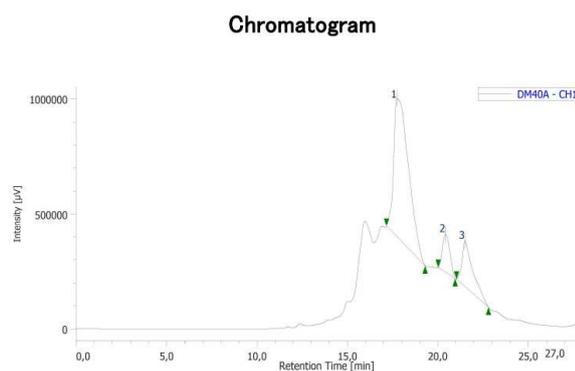
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 106.70 mg di DM40A in 1 mL di Pe/EtOAc. Si esegue 1 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE	
	A %	B %
15	60	40
20	30	70
20	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM41A	53.40 mg	Canniprene (26) impuro
DM41B	7.40 mg	Lupeolo (34) impuro
DM41C	9.40 mg	CBC (5) impuro

5.5.c HPLC semipreparativa di DM33M + DM33N

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

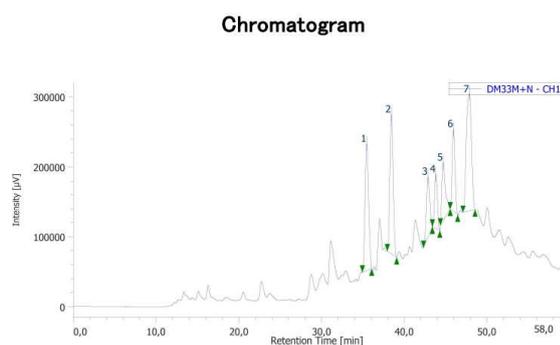
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 133.10 mg di DM33M+DM33N in 2 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 2 iniezioni.

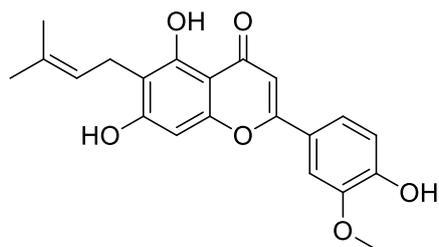
MINUTI	SOLVENTE	
	A %	B %
15	60	40
20	30	70
20	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

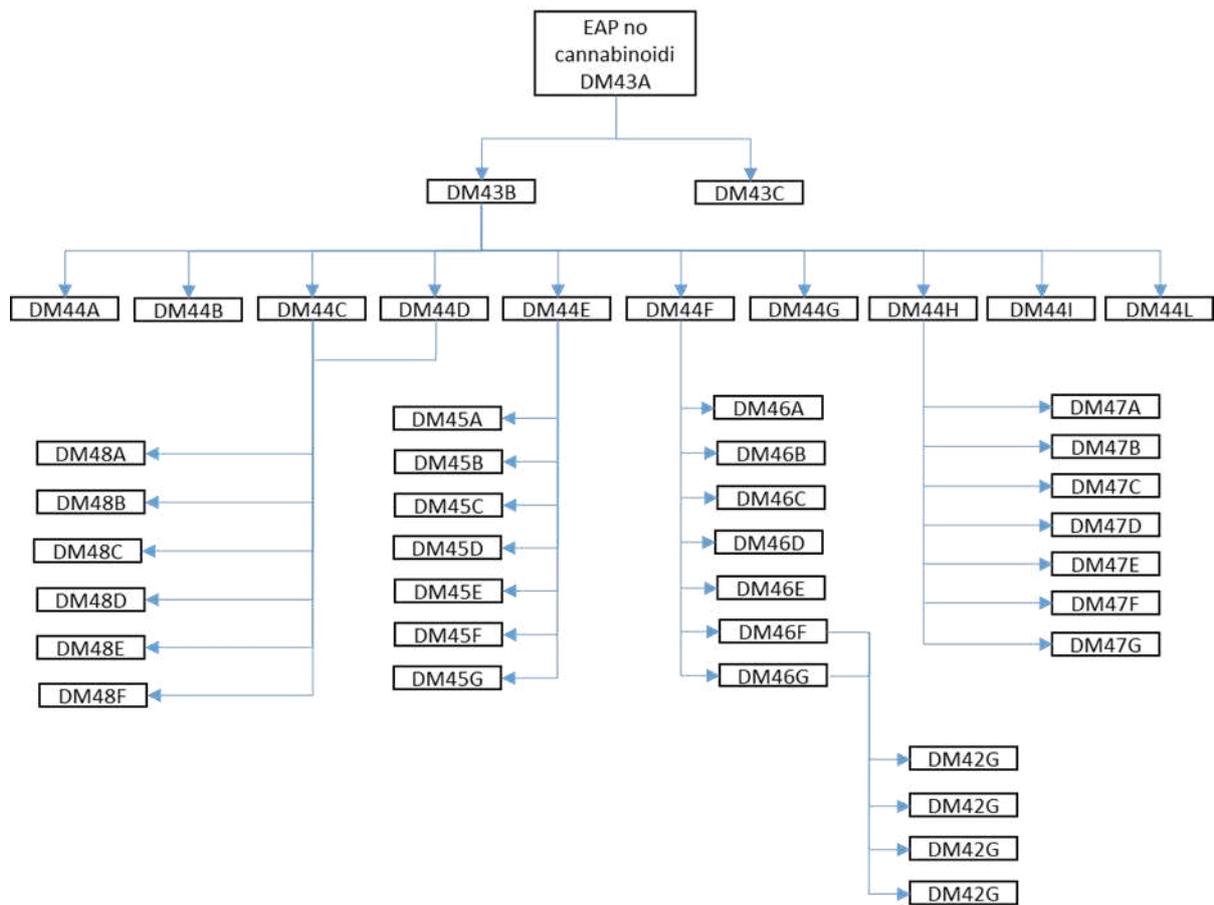
SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM42A	5.10 mg	Cannflavina B (24) impura
DM42B	2.30 mg	out
DM42C	2.60 mg	out miscela polimetossilate
DM42D	2.70 mg	dimetil-diidrofenantrene

DM42E	4.90 mg	CBC (5)
DM42F	6.30 mg	CBC (5)
DM42G	10.90 mg	out miscela di fenantreni



24

6.0 Chemotipo zero cannabinoidi



6.1 Estratto acetoneo da *Cannabis sativa* L. senza cannabinoidi (2020)

Materiale e vetreria: pallone 1 L, imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtri di carta, pompa a vuoto, acetone.

Procedimento: 500.00 g di materiale vegetale (infiorescenze) di *Cannabis sativa* L. chemotipo senza cannabinoidi fornita da Canvasalus SRL, finemente tritate, sono estratte, (2 x 12 h) con acetone in un percolatore verticale da 10 L in acciaio inox, usando un rapporto droga/solvente 1:10 p/V. Al termine l'estratto è filtrato con un imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per il vuoto, protetto da filtro di carta al fine di rimuovere eventuali residui di materiale vegetale. Infine si evapora il solvente a rotavapor ottenendo un estratto acetoneo primario DM43A, 25.54 g (resa 4.64%), dal colore marrone scuro, molto viscoso.

6.2 Vacuum chromatography di DM3A

Scopo: eliminare gli acidi grassi insaturi, le clorofille ed i pigmenti che potrebbero portare a foto-ossidazione

Materiale e vetreria: imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtro di carta, imbuto gocciolatore, RP C-18, frazioni da 50 mL, metanolo.

Carico: 25.54 g DM43A

Fase stazionaria: 150 g di RPC18 (1:6 p/p)

Eluente di impaccamento: MeOH / THF

Volume frazioni: 50 mL

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	UV	QUANTITÀ	NOTE
DM43B	1-13	Metanolo	+	10.51 g	Ulteriormente frazionato
DM43C	14-21	THF	+	6.35 g	Acidi grassi

6.3 CCG di prima generazione di DM43B

Scopo: Separazione delle molecole in base alla polarità.

Carico: 10.51 g, DM5A

Fase stazionaria: Silice 500 mL

Eluente di carico: Pe

Volume frazioni: 20 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	FRAZIONE	ELUENTE	QUANTITÀ	UV	NOTE
DM44A	17-27	8-/2-7/3	592.60 mg	+	out
DM44B	28-43	6/4	1.07 g	+/-	out
DM44C	44-50	6/4	328 mg	+/-	unito a DM44D
DM44D	51-56	6/4-5/5	86.60 mg	+	HPLC
DM44E	57-63	5/5	184.10 mg	+	HPLC
DM44F	64-80	5/5	521.50 mg	+	HPLC
DM44G	81-102	4/6	966.30 mg	+	out
DM44H	103-116	2/8	414 mg	+	HPLC
DM44I	117-154	2/8-EtOAc	950 mg	+	out
DM44L	155-160	EtOAc	70 mg	+	out

6.3.a HPLC SEMIPREPARATIVA DI DM44E

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

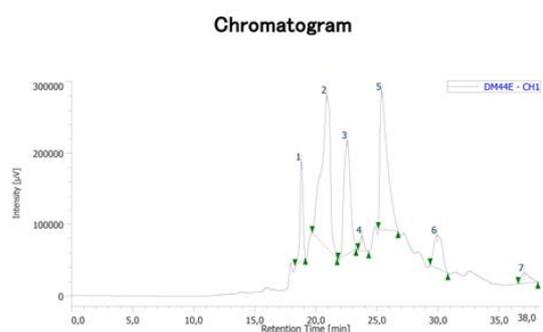
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 184.10 mg in 2 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 2 iniezioni

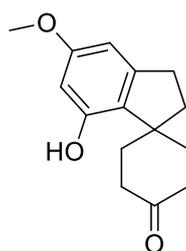
MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
15	60	40
20	60	40
35	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM45A	28 mg	out
DM45B	13 mg	out
DM45C	10.70 mg	out
DM45D	10.90 mg	out

DM45E	15.50 mg	Cannabispirano A (32)
DM45F	18.60 mg	Cannabispirano A (32)
DM45G	16.30 mg	out



32

6.3.b HPLC SEMIPREPARATIVA DI DM44F

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

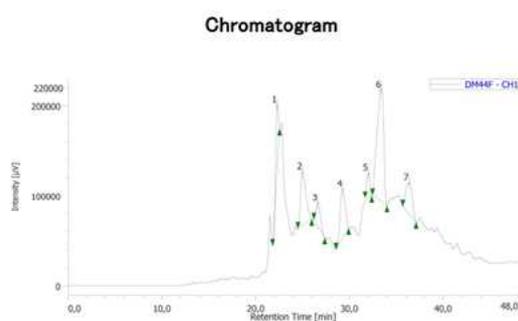
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

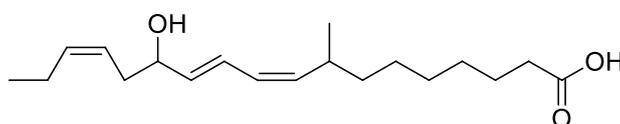
Carico: 521.50 mg in 6 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 6 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
15	60	40
20	60	40
35	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM46A	18,20 mg	out
DM46B	21.10 mg	Ossilipina (35)
DM46C	11.70 mg	Ossilipina (35)
DM46D	13.10 mg	out
DM46E	10.80 mg	Flavonoide metossilato
DM46F	13.50 mg	Denbinobina (27) impura
DM46G	15.70 mg	Denbinobina (27) impura



35

6.3.c HPLC SEMIPREPARATIVA DI DM44H

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

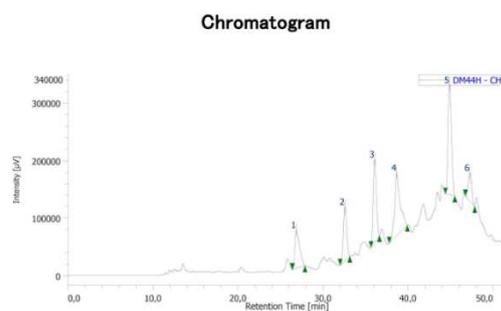
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 521.50 mg in 6 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 6 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
15	60	40
20	60	40
35	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM47A	2.03 mg	out
DM47B	4.70 mg	out
DM47C	6.80 mg	out
DM47D	12.10 mg	Diidrofenantrene impuro
DM47E	34.50 mg	Mix canflavine
DM47F	21.30 mg	out
DM47G	7.00 mg	out

6.3.d HPLC SEMIPREPARATIVA DI DM44C + DM44D

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

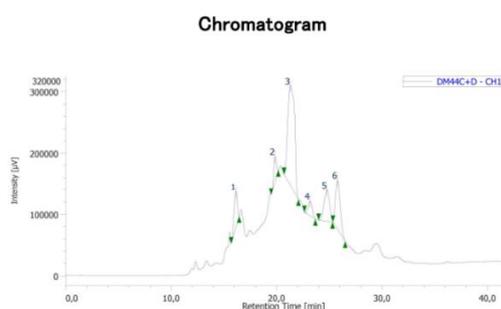
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 414.60 mg in 5 mL di Pe/EtOAc. Si eseguono 5 iniezioni

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
15	60	40
20	60	40
35	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM48A	14.90 mg	out
DM48B	20.00 mg	mix diidrofenantreni
DM48C	15.10 mg	out
DM48D	22.10 mg	out
DM48E	22.40 mg	out

6.3.e HPLC SEMIPREPARATIVA DI DM46F + DM46G

Tipo colonna: Hicrom, 250 x 25 mm, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

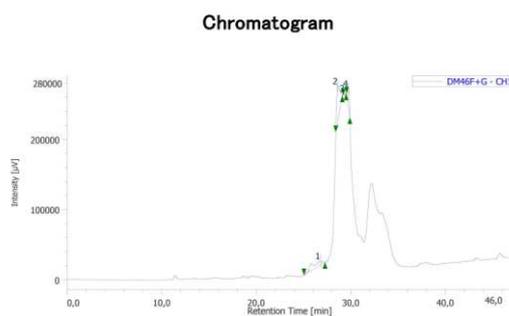
Velocità flusso: 6 mL/min

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 29.20 mg in 1 mL di Pe/EtOAc. Si esegue 1 iniezione

MINUTI	SOLVENTE A %	SOLVENTE B %
15	60	40
20	60	40
35	30	70



Si ottengono le seguenti frazioni:

SIGLA	QUANTITÀ	NOTE
DM49A	1.40 mg	out
DM49B	6.50 mg	Diidrofenantrene monometossilato
DM49C	7.20 mg	Denbinobina (27) impura
DM49D	1.0 mg	Denbinobina (27)

5: Conclusione e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi è stata studiata la composizione in metaboliti secondari di tre diversi chemotipi di *C. sativa*.

Nel chemotipo TKCV sono stati rilevati livelli alti di CBN (6) e CBNV (21). L'isolamento del CBNV (21) è particolarmente rilevante, poiché normalmente la sua presenza è rara. Alcuni metaboliti isolati sono stati inviati al prof. Andreas Koeberle dell'Università di Innsbruck per una valutazione biologica e struttura-attività.

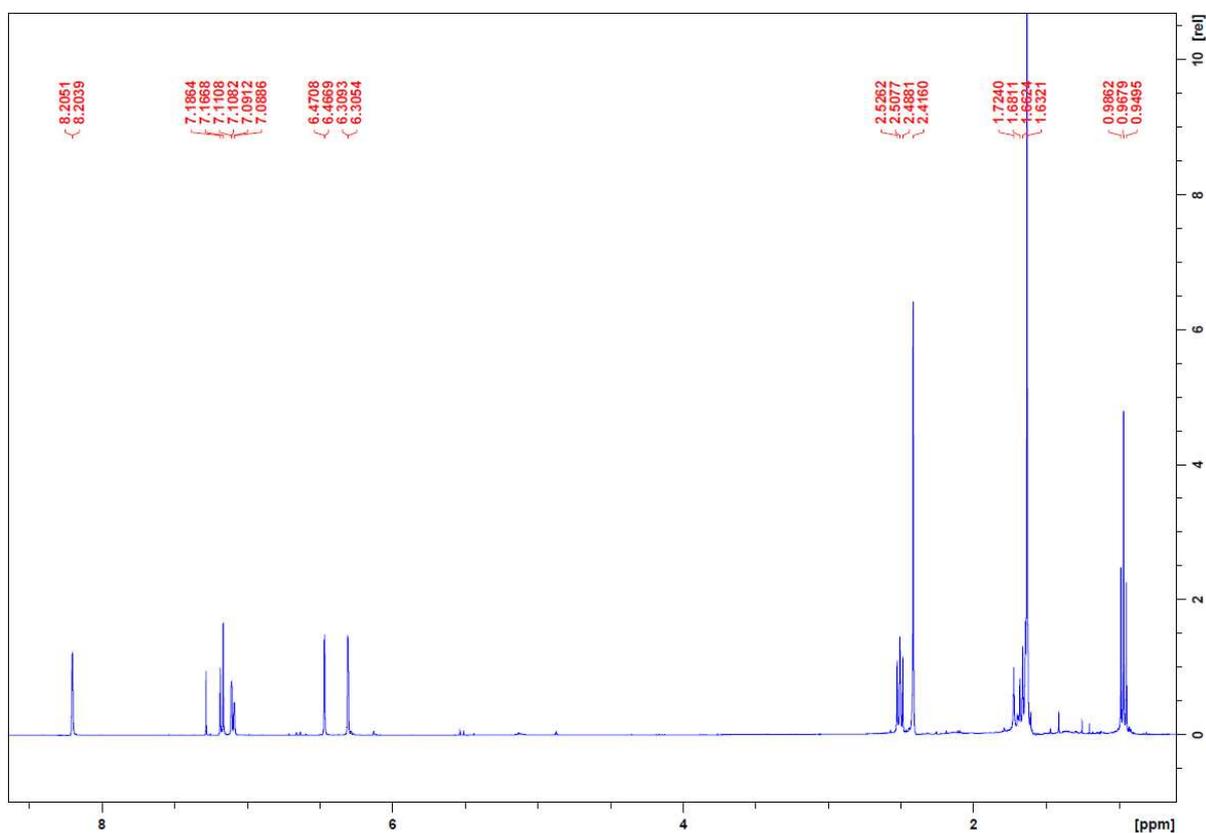
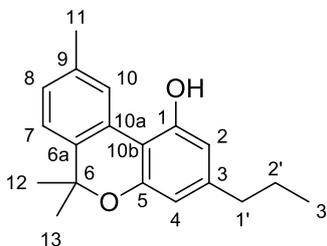
Per quanto riguarda il secondo chemotipo a CBC, l'identificazione di un'elevata quantità di CBC (5) ha confermato la il successo nella selezione del chemotipo poiché il cannabinoide risulta essere presente in tracce in altre varietà comuni.

Dallo studio della terza pianta è stata confermata l'assenza di cannabinoidi ed è stato possibile isolare altri composti come la denbinobina (27).

Alla luce di quanto identificato, risulta essere indispensabile l'analisi fitochimica al fine di fornire corrette informazioni non solo sul profilo fitochimico dei nuovi chemotipi, ma anche sulla stabilità degli stessi.

6: Dati spettroscopici

CBNV (21)

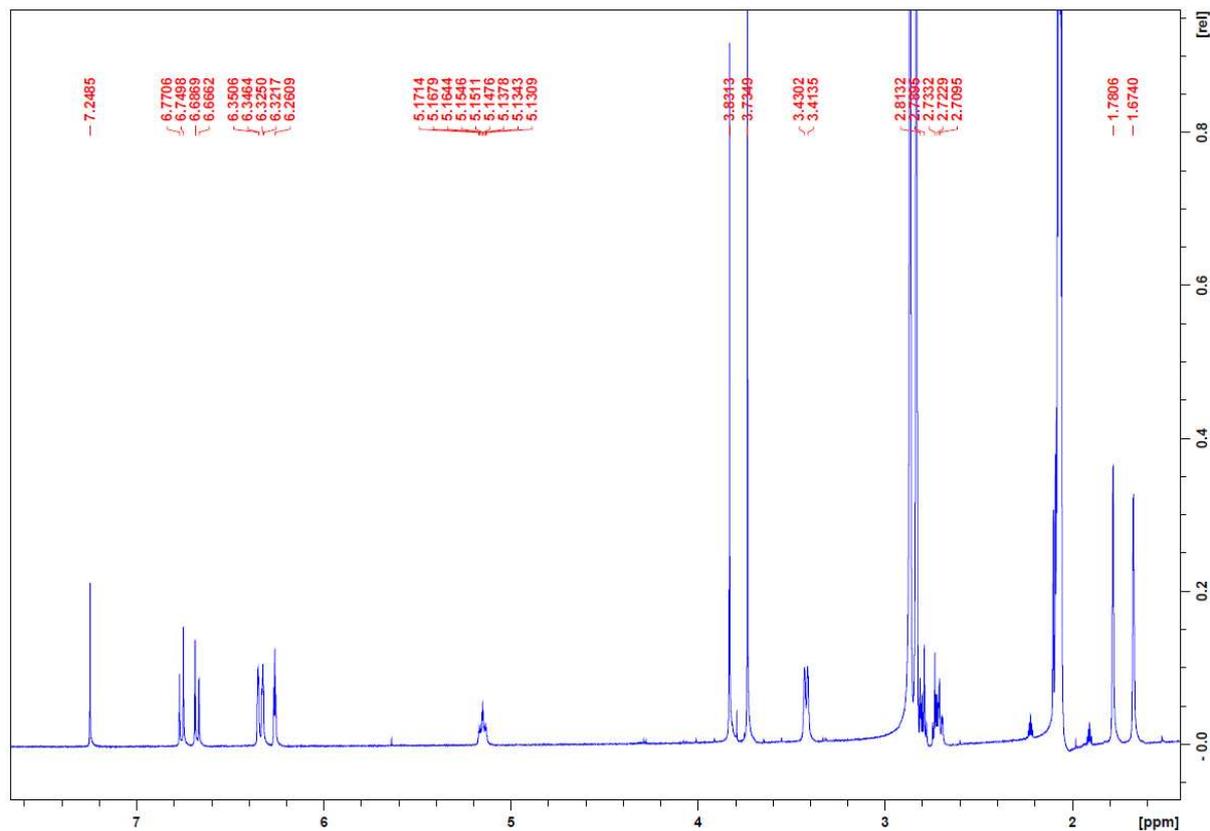
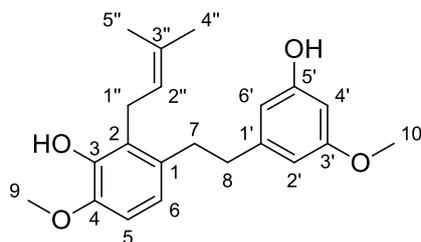


Formula chimica: C₁₉H₂₂O₂

Peso molecolare: 264.06 g/Mol

¹H-NMR (400MHz; CDCl₃): δ = 8.21 (1H, s, H-10), 7.18 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 7.10 (1H, dd, J = 1.1, 7.9 Hz, H-8), 6.47 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-4), 6.31 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2), 2.51 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-1'), 2.42 (3H, s, H-11), 1.71-1.65 (2H, m, H-2'), 1.63 (6H, s, H-12, H-13), 0.97 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-3').

CANNIPRENE (26)

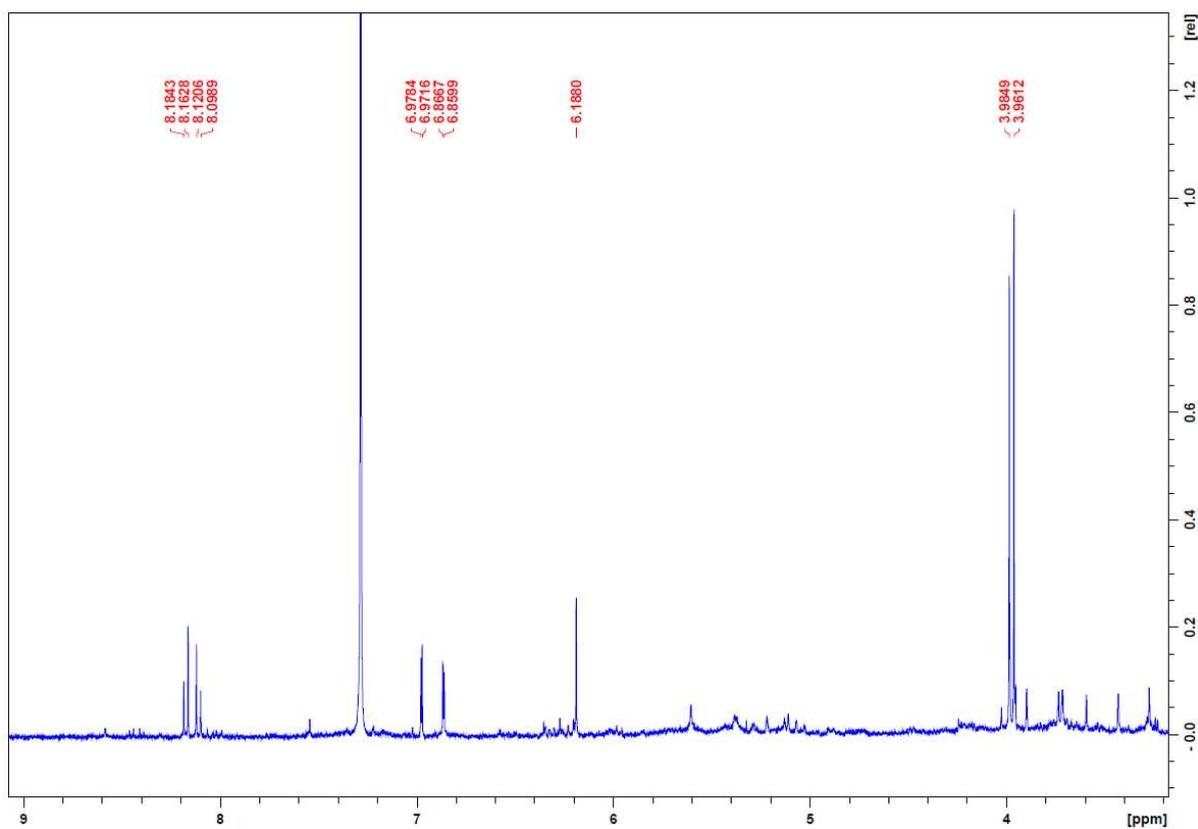
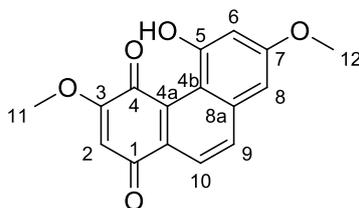


Formula chimica: $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4$

Peso molecolare: 342.43 g/Mol

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz; CDCl_3): $\delta = 6.76$ (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'), 6.68 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.35 (1H, s, H-5), 6.33 (1H, s, H-6), 6.26 (1H, t, $J = 2.6$ Hz, H-4'), 5.18-5.11 (1H, m, H-2''), 3.83 (3H, s, H-9), 3.74 (3H, s, H-10), 3.42 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 2.81-2.71 (4H, m, H-7, H-8), 1.79 (3H, s, H-4''), 1.67 (3H, s, H-5'').

DENBINOBINA (27)

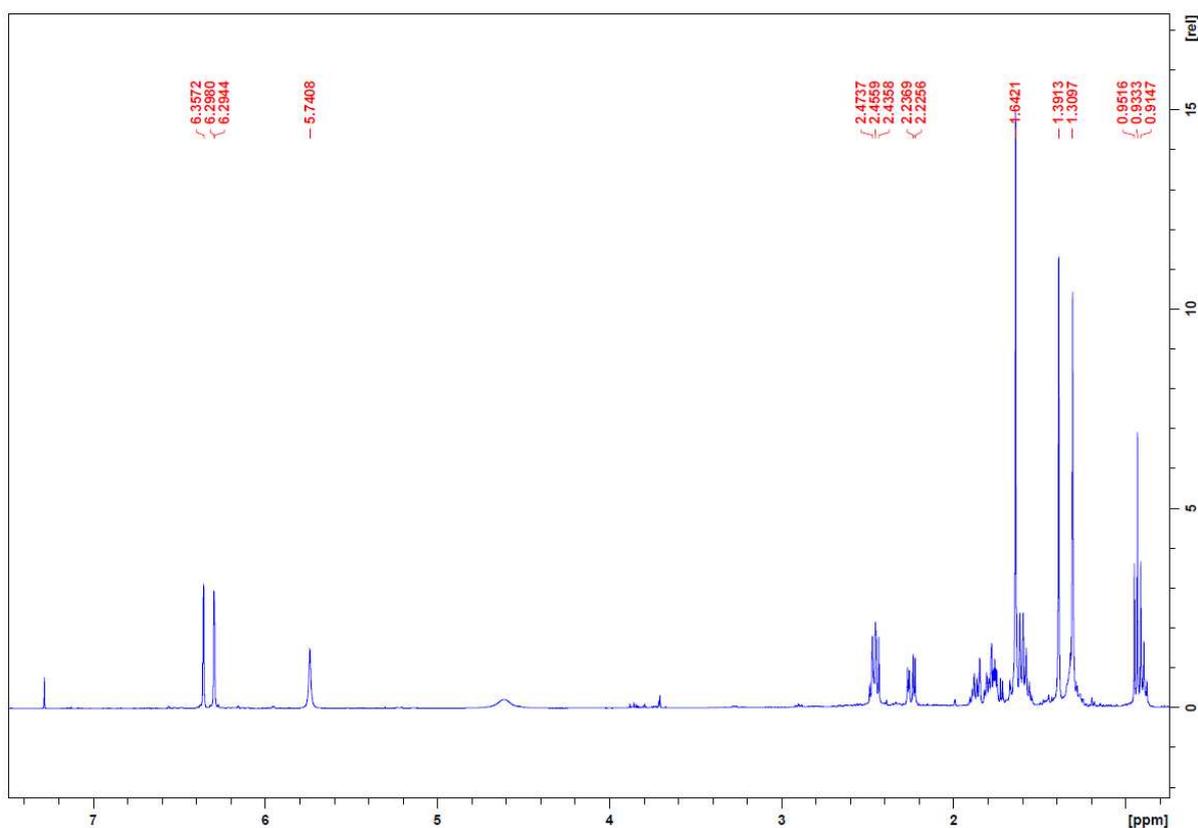
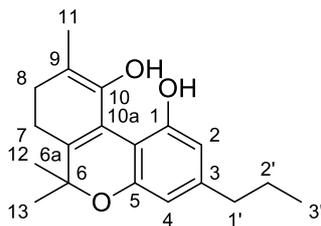


Formula chimica: C₁₆H₁₂O₅

Peso molecolare: 284.26 g/Mol

¹H-NMR (400MHz; CDCl₃): δ = 8.17 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-9), 8.11 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-10), 6.98 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-8), 6.87 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-2), 6.19 (1H, s, H-6), 3.98 (3H, s, H-11), 3.96 (3H, s, H-12).

10-IDROSSI-8,7-DIIDROCANNABIVARINOLO (30)

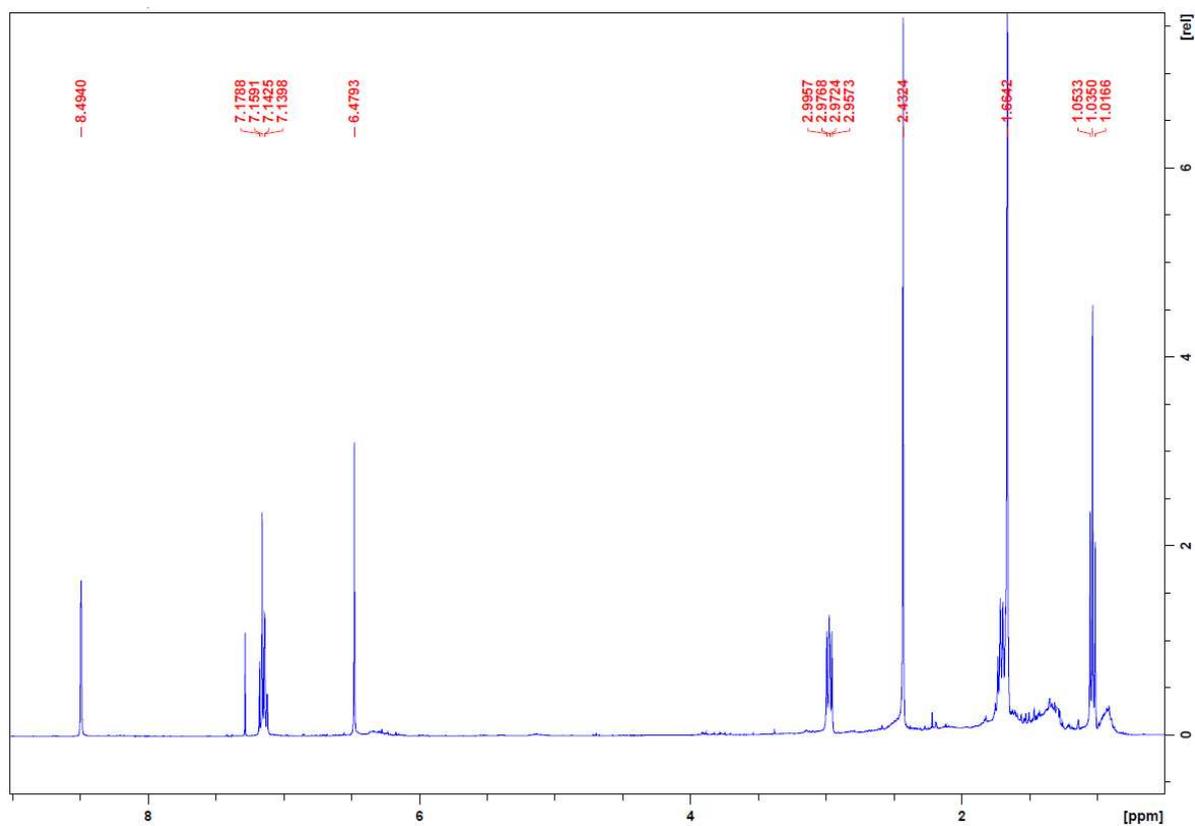
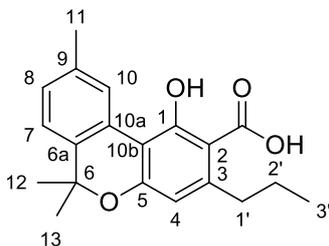


Formula chimica: C₁₉H₂₄O₃

Peso molecolare: 300.39 g/Mol

¹H-NMR (400MHz; CDCl₃): δ = 6.36 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2), 6.30 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-4), 5.74 (1H, s, OH), 2.46 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-1'), 1.92-1.72 (4H, m, H-7, H-8), 1.64 (3H, s, H-11), 1.59 (2H, tt, J = 7.2, 7.0 Hz, H-2'), 1.39 (3H, s, H-12), 1.31 (3H, s, H-13), 0.93 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-3').

CBNVA (29)

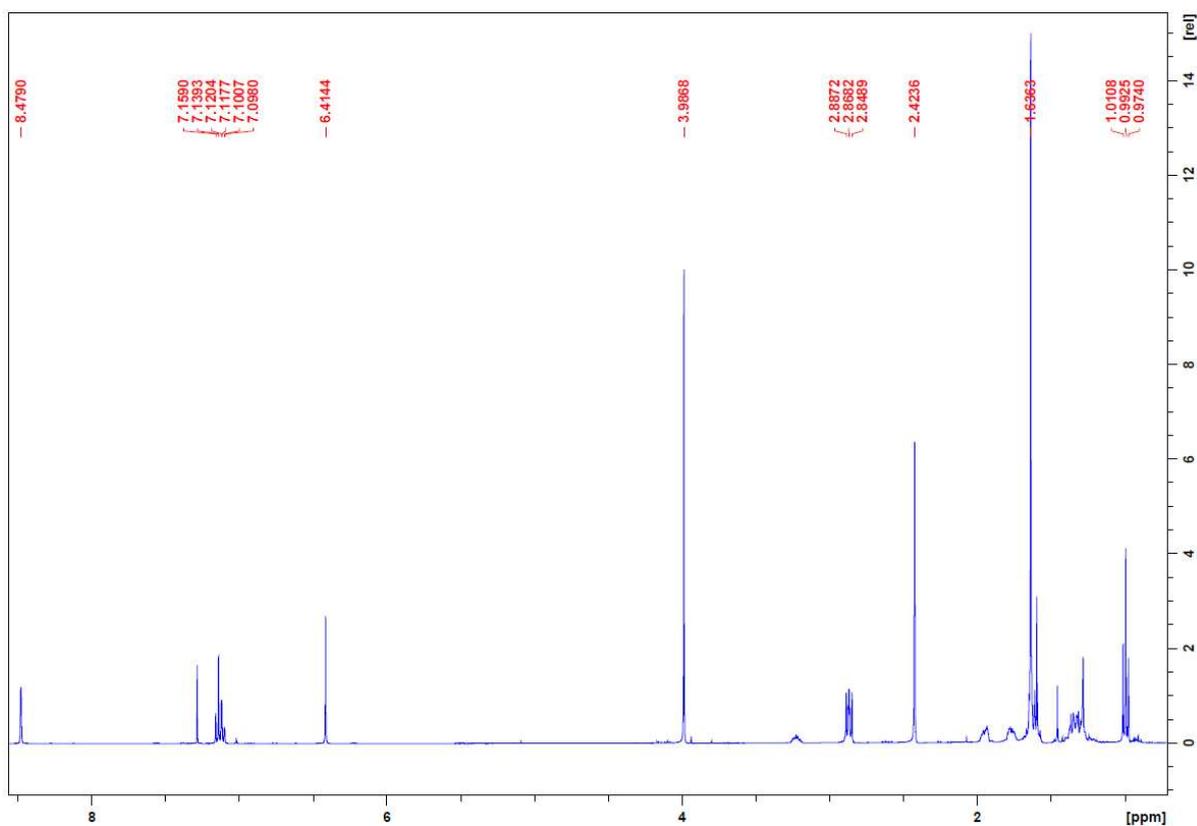
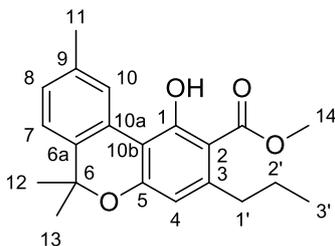


Formula chimica: C₂₀H₂₂O₄

Peso molecolare: 326.39 g/Mol

¹H-NMR (400MHz; CDCl₃): δ = 8.49 (1H, s, H-10), 7.17 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-7), 7.13 (1H, dd, J = 1.1, 7.9 Hz, H-8), 6.48 (1H, s, H-4), 2.98 (2H, t, J = 8.2 Hz, H-1'), 2.43 (3H, s, H-11), 1.75-1.69 (2H, m, H-2'), 1.67 (6H, s, H-12, H-13), 1.04 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-3').

CBNV metil estere (31)

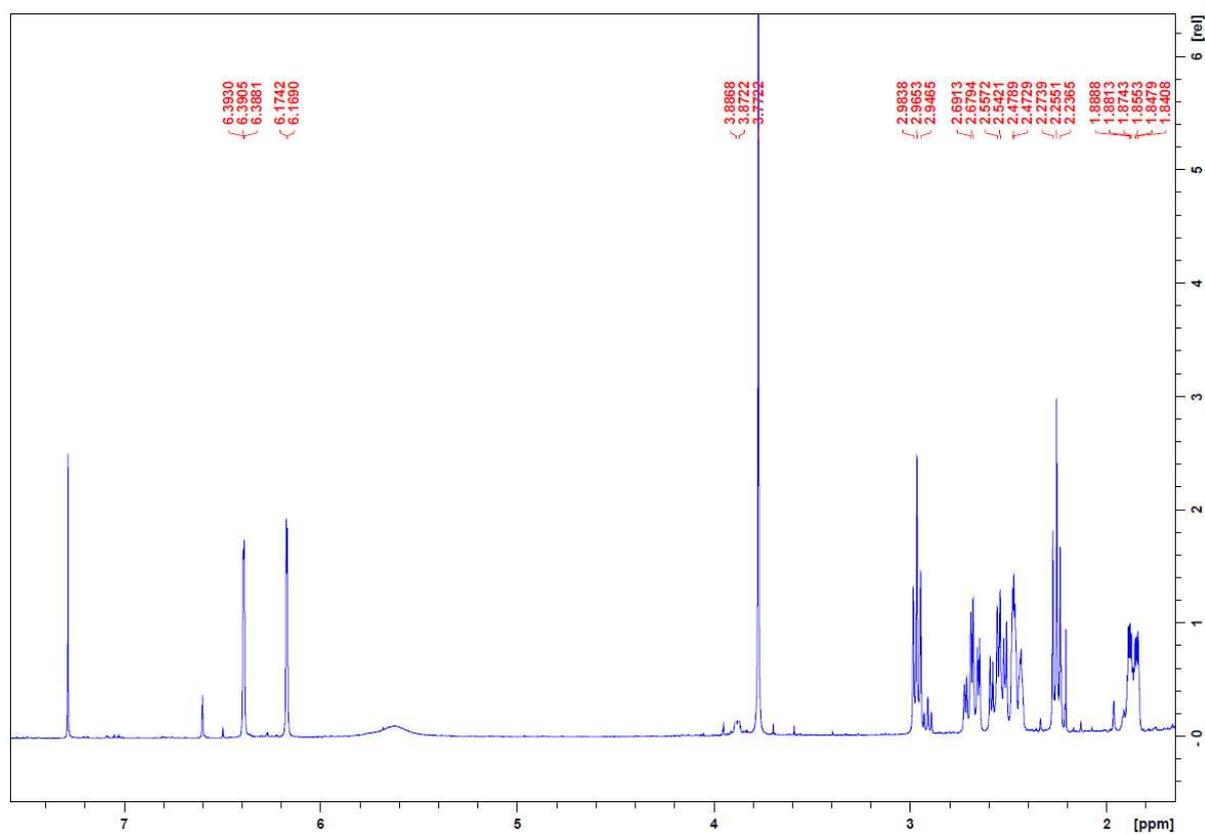
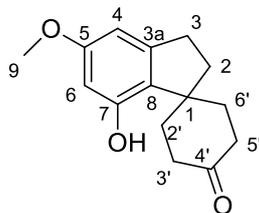


Formula chimica: $C_{21}H_{24}O_4$

Peso molecolare: 340.41 g/Mol

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz; CDCl_3): $\delta = 8.48$ (1H, s, H-10), 7.15 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.11 (1H, dd, $J = 1.1, 8.0$ Hz, H-8), 6.41 (1H, s, H-4), 3.99 (3H, s, H-14), 2.87 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 2.43 (3H, s, H-11), 1.64 (6H, s, H-12, H-13), 1.60-1.58 (2H, m, H-2'), 1.00 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-3').

CANNABISPIRANO A (32)

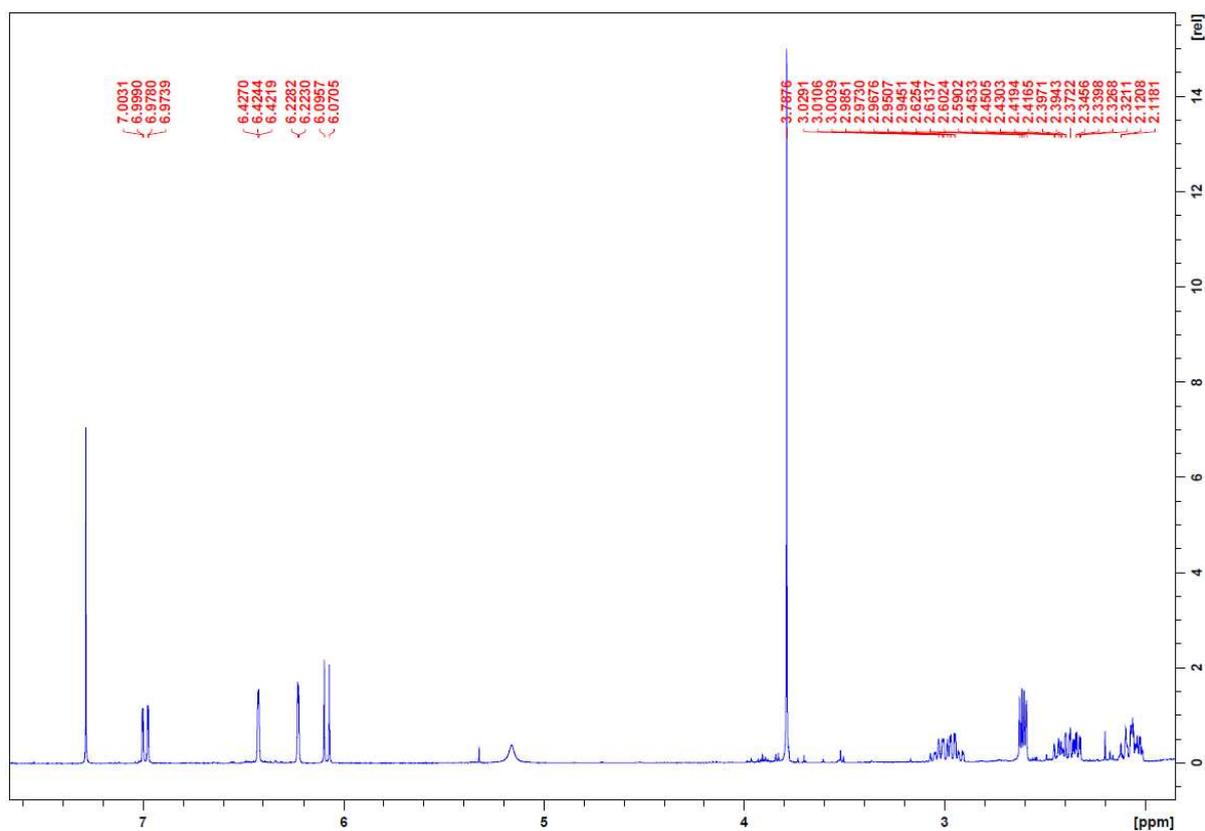
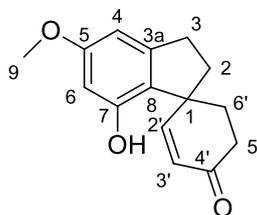


Formula chimica: C₁₅H₁₈O₃

Peso molecolare: 246.30 g/Mol

¹H-NMR (400MHz; CDCl₃): δ = 6.39 (1H, s, H-4), 6.18 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 3.77 (3H, s, H-9), 2.97 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-3), 2.69 (2H, td, J = 6.4, 18.1 Hz, H-5'), 2.55 (2H, td, J = 7.0, 19.9 Hz, H-3'), 2.46 (2H, dt, J = 4.7, 9.0 Hz, H-2'), 2.26 (2H, t, J = 7.3 Hz, H-6'), 1.86 (2H, dt, J = 4.5, 8.2 Hz, H-2).

CANNABISPIRENONE A (33)



Formula chimica: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$

Peso molecolare: 244.29 g/Mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): δ = 6.99 (1H, dd, J = 1.8, 10.1 Hz, H-2'), 6.42 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4), 6.23 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.08 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-3'), 3.79 (3H, s, H-9), 2.99 (2H, ddd, J = 5.0, 9.7, 19.1 Hz, H-3), 2.61 (2H, dd, J = 4.9, 9.2 Hz, H-5'), 2.46-2.31 (2H, m, H-6'), 2.07 (2H, ddd, J = 5.4, 12.0, 26.0 Hz, H-2).

7: Bibliografia

Allegrone, G., Pollastro, F., Magagnini, G., Tagliatalata-Scafati, O., Seegers, J., Koeberle, A., ... & Appendino, G. (2017). The bibenzyl canniprene inhibits the production of pro-inflammatory eicosanoids and selectively accumulates in some *Cannabis sativa* strains. *Journal of Natural Products*, 80(3), 731-734. [28] Kuo, C. T., Hsu, M. J., Chen, B. C., Chen, C. C., Teng, C. M., Pan, S. L., & Lin, C. H. (2008). Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, 177(1), 48-58.

Anavi-Goffer, S., Baillie, G., Irving, A. J., Gertsch, J., Greig, I. R., Pertwee, R. G., & Ross, R. A. (2012). Modulation of L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *Journal of biological chemistry*, 287(1), 91-104.

Bailey, K., & Gagné, D. (1975). Distinction of synthetic cannabidiol, cannabichromene, and cannabivarin by GLC using on-column methylation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(10), 1719-1720.

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), 2019-2024.

Bolognini, D., Costa, B., Maione, S., Comelli, F., Marini, P., Di Marzo, V., ... & Pertwee, R. G. (2010). The plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *British journal of pharmacology*, 160(3), 677-687.

Bow, E. W., & Rimoldi, J. M. (2016). The structure–function relationships of classical cannabinoids: CB1/CB2 modulation. *Perspectives in medicinal chemistry*, 8, PMC-S32171.

Brenneisen, R. (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents. In *Marijuana and the Cannabinoids* (pp. 17-49). Totowa, NJ: Humana Press.

Carbone, M., Castelluccio, F., Daniele, A., Sutton, A., Ligresti, A., Di Marzo, V., & Gavagnin, M. (2010). Chemical characterisation of oxidative degradation products of Δ^9 -THC. *Tetrahedron*, 66(49), 9497-9501.

- Cascio, M. G., Zamberletti, E., Marini, P., Parolaro, D., & Pertwee, R. G. (2015). The phytocannabinoid, Δ^9 -tetrahydrocannabivarin, can act through 5-HT 1 A receptors to produce antipsychotic effects. *British journal of pharmacology*, 172(5), 1305-1318.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa* L.: botany and horticulture. *Cannabis sativa l.-botany and biotechnology*, 79-100.
- Dawidowicz, A. L., Olszowy-Tomczyk, M., & Typek, R. (2021). CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia*, 152, 104915.
- De Meijer, E. P. M., & Hammond, K. M. (2016). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L.(V): regulation of the propyl-/pentyl cannabinoid ratio, completion of a genetic model. *Euphytica*, 210(2), 291-307.
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S. & Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1479-1494.
- Huang, Y. C., Guh, J. H., & Teng, C. M. (2005). Denbinobin-mediated anticancer effect in human K562 leukemia cells: role in tubulin polymerization and Bcr-Abl activity. *Journal of biomedical science*, 12, 113-121.
- Jastrzab, A., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2022). The origin and biomedical relevance of cannabigerol. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 7929.
- Koltai, H., & Namdar, D. (2020). *Cannabis* phytomolecule'entourage': from domestication to medical use. *Trends in plant science*, 25(10), 976-984.
- Korthout, H. A. A., Verhoeckx, K. C. M., Witkamp, R. F., Doornbos, R. P., & Wang, M. (2010). U.S. Patent No. 7,807,711. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kuo, C. T., Hsu, M. J., Chen, B. C., Chen, C. C., Teng, C. M., Pan, S. L., & Lin, C. H. (2008). Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, 177(1), 48-58.

- Lee, Y. H., Park, J. D., Beak, N. I., Kim, S. I., & Ahn, B. Z. (1995). In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Medica*, 61(02), 178-180.
- Luo, X., Reiter, M.A., d' Espaux, L. et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* 567, 123-126 (2019)
- Merkus, F. W. (1971). Cannabivarin and tetrahydrocannabivarin, two new constituents of hashish. *Nature*, 232(5312), 579-580.
- Merkus, F. W. (1971). Cannabivarin, a new constituent of hashish. *Pharmaceutisch Weekblad*, 106(9), 69-71.
- 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.
- Pollastro F., Minassi, A., & Fresu, L. G. (2018). Cannabis Phenolics and their Bioactivities. *Current medicinal chemistry*, 25(10), 1160-1185.
- Sanchez-Duffhues, G., Calzado, M. A., de Vinuesa, A. G., Caballero, F. J., Ech-Chahad, A., Appendino, G., ... & Munoz, E. (2008). Denbinobin, a naturally occurring 1, 4-phenanthrenequinone, inhibits HIV-1 replication through an NF- κ B-dependent pathway. *biochemical pharmacology*, 76(10), 1240-1250.
- Shoyama, Y., Hirano, H., & Nishioka, I. (1984). Biosynthesis of propyl cannabinoid acid and its biosynthetic relationship with pentyl and methyl cannabinoid acids. *Phytochemistry*, 23(9), 1909-1912.
- Wang, C., & Kurzer, M. S. (1997). Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells.
- Werz, O., Seegers, J., Schaible, A. M., Weinigel, C., Barz, D., Koeberle, A., 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.
- Wirth, P. W., Watson, E. S., ElSohly, M., Turner, C. E., & Murphy, J. C. (1980). Anti-inflammatory properties of cannabichromene. *Life sciences*, 26(23), 1991-1995.

Ringraziamenti

Vorrei iniziare ringraziando mamma Graziella, da sempre la mia più grande sostenitrice e papà Francesco per l'aiuto che mi ha sempre dato e per avermi trasmesso la forza di andare avanti nei momenti più difficili. Un ringraziamento speciale va anche ai miei nonni e a mio fratello Marco, una fonte di ispirazione per me. Tutto ciò non sarebbe stato possibile senza di voi, che avete sempre creduto in me, dandomi il coraggio di affrontare tutte le difficoltà incontrate nel mio cammino.

Ringrazio anche la mia relatrice, la Professoressa Federica Pollastro, che durante questi ultimi mesi del mio percorso universitario mi ha aiutato e insegnato tanto, dandomi suggerimenti fondamentali per la realizzazione del mio progetto di tesi. Inoltre ringrazio Stefano e Aurora per avermi aiutato in laboratorio e nella stesura della tesi ma anche per i bei momenti passati insieme.

Infine volevo ringraziare tutti i miei amici, compagni d'avventura, con cui ho condiviso tanti bei momenti e tante gioie durante questo percorso.