



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Dottorato di ricerca  
in Scienze Ambientali  
ciclo XXXIV

Tesi di Ricerca

*On the traces of the hemp*  
**Sviluppo di un metodo per tracciare l'origine della  
*Cannabis sativa* italiana**

SSD: GEO/08

*Coordinatore del Dottorato*

**Prof. Enrico Bertuzzo**

*Supervisore*

**Prof.ssa Barbara Stenni**

*Co-supervisore*

**Dott.ssa Fabiana Corami**

*Dottorando*

**Marco Calvi**

Matricola 956429



***“Hanno provato a seppellirci  
...non sapevano che eravamo semi”***

*(cit. Dinos Christianòpoulos)*



# Indice

Abstract.....	i
Ringraziamenti .....	iv
<b>Introduzione .....</b>	<b>1</b>
<b>1. La canapa .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Metodi di tracciabilità.....</b>	<b>6</b>
2.1 Isotopi stabili.....	7
2.1.1 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	8
2.1.2 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .....	9
2.1.3 $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ .....	10
2.1.4 $^2\text{H}/^1\text{H}$ .....	11
2.1.5 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .....	12
2.2 Rapporti isotopici dello stronzio .....	14
2.3 Elementi in traccia e terre rare .....	16
2.3.1 Elementi in traccia .....	17
2.3.2 Terre rare .....	18
<b>3. Materiali e metodi .....</b>	<b>20</b>
3.1 Campionamenti (siti e campagne) .....	20
3.2 Breve inquadramento pedologico dell'area di studio .....	22
3.3 Metodologie di analisi impiegate .....	25
3.3.1 Preparazione e pre-trattamenti .....	25
3.3.2 Analisi isotopiche di C, N, S, H e O .....	27
3.3.3 Analisi isotopiche dello Sr ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ).....	31
3.3.4 Analisi degli elementi in traccia e delle terre rare.....	35
3.4 Analisi statistiche .....	40
<b>4. Risultati e discussione .....</b>	<b>41</b>
4.1 Isotopi stabili di C, N, S, H e O .....	41
4.1.1 L'olio di canapa .....	52
4.1.2 Il caso studio di Udine.....	53
4.1.3 Considerazioni.....	54
4.1.4 Potenziali fattori che possono intervenire sul frazionamento isotopico dei campioni di canapa.....	57

4.1.5 “ <i>Isotopic characterization of Italian industrial hemp (Cannabis sativa L.) intended for food use: a first exploratory study</i> ” .....	58
4.1.6 Rapporti isotopici dello Sr .....	58
4.2 Elementi in traccia e terre rare .....	62
4.2.1 Elementi in traccia (TE) .....	62
4.2.2 Terre rare (REEs) .....	76
4.2.3 Considerazioni.....	87
4.2.4 “ <i>Distribution pattern of Rare Earth Elements in four different industrial hemp cultivars (Cannabis sativa L.) grown in Friuli Venezia Giulia, Italy</i> ” .....	88
4.3 Analisi delle componenti principali .....	89
<b>5. Conclusioni.....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>105</b>
<b>Appendice.....</b>	<b>120</b>
<b>Allegati</b>	

## Abstract

A seguito dell'entrata in vigore della legge 242/2016, che ne ha nuovamente legalizzato la coltivazione e l'impiego agricolo e industriale, negli ultimi anni è stata registrata in Italia una vera e propria riscoperta della canapa (*Cannabis sativa* L.), coltura storica per il nostro Paese, che si caratterizza per un'elevata sostenibilità ambientale.

Per quel che concerne il settore alimentare, l'olio di canapa e i prodotti da essa derivati, quali farine, semi e infiorescenze, rivestono un importante ruolo dal punto di vista economico e, sempre più spesso, le aziende italiane hanno dovuto affrontare la concorrenza di prodotti di provenienza estera e qualità dubbia.

In questa tesi di dottorato sono state condotte per la prima volta analisi chimiche sugli isotopi stabili di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, zolfo e stronzio, e analisi volte alla determinazione delle concentrazioni di elementi in traccia (TEs - *Trace Elements*) e terre rare (REEs - *Rare Earth Elements*), su campioni di canapa raccolti nel triennio 2018-2020, che hanno permesso di definire i parametri chimici caratteristici (“*fingerprints*”) della canapa coltivata in Italia.

Gli analiti risultati essere più interessanti in un'ottica di caratterizzazione ed in grado di discriminare i campioni in funzione della loro provenienza geografica, sono gli isotopi stabili (rapporti isotopici  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  e  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ).

Questo studio, seppur preliminare, racchiude utili indicazioni per indirizzare studi futuri di classificazione che possano permettere la tracciabilità geografica dei prodotti derivati dalla canapa, al fine di salvaguardarli da eventuali adulterazioni.

## Abstract

Following the enactment of the Italian Law 242/2016, which has re-legalized the agricultural and industrial use of hemp (*Cannabis sativa* L.), in recent years an actual rediscovery of this cultivation has been registered in Italy, which is also characterized by a high environmental sustainability.

For what concerns the food sector, hemp seed oil and hemp derived products, such as flours, seeds, and inflorescences, have an important economic role and, ever more frequently, Italian companies have to face competition from foreign products and of dubious quality.

In this Ph. D thesis, isotopic (through hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, sulfur, and strontium stable isotope ratio analysis) and chemical characterization (through Trace Elements (TEs) and Rare Earth Elements (REEs) determination), were carried out for the first time on Italian hemp samples collected

in the three-year period 2018-2020. These investigations allowed us to define the characteristic chemical parameters ("fingerprints") of hemp grown in Italy.

Stable isotope ratios (*i.e.*,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ , and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ) have proven to be the more interesting analytes among those investigated, having allowed to discriminate samples according to their geographical origin.

This study, although preliminary, provides useful indications to direct future classification studies that may allow the geographical traceability of hemp-derived products, in order to safeguard them from possible adulteration.



## **Ringraziamenti**

*Voglio ringraziare tutti coloro che mi hanno permesso di intraprendere questo dottorato di ricerca e che mi hanno permesso di portarlo a termine, se pur tra mille complicazioni.*

*Penso che i dottorandi del mio anno siano speciali ed abbiano una marcia in più, perché abbiamo dovuto affrontare continui ostacoli inattesi, tra pandemia, ritardi, rinunce.*

*I miei ringraziamenti più sinceri vanno a due persone speciali, senza le quali probabilmente questa tesi non sarebbe stata scritta, ma soprattutto io non mi sarei potuto dottorare. Grazie Barbara e grazie Sarah, due amiche sincere, umili e straordinarie professioniste, dalle quali ho appreso e conoscenze preziose e ho imparato il vero significato dell'amicizia!*

*Voglio ringraziare Fabiana Corami e Marta Radaelli, che mi hanno sempre seguito e dato una grande mano in laboratorio e nell'elaborazione dei dati, il Jozef Stefan Institute di Lubiana nella persona di Tea Zuliani per le analisi isotopiche dello stronzio, la Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige nelle persone di Federica Camin e, in particolare, Luana Bontempo, per tutte le analisi isotopiche e per tutti i fondamentali consigli che mi hanno dato, grazie a Flavia Visin per avermi permesso di liofilizzare i campioni in fase di emergenza, e grazie a tutti coloro che mi hanno fornito i campioni in giro per l'Italia.*

*Un ringraziamento doveroso va a Certottica per avermi dato la grande opportunità di frequentare il corso di dottorato ed in particolare a Cristian Arboit, senza il quale non avrei potuto intraprendere questa strada.*

*Per ultimi, ma non per questo meno importanti, ringrazio di tutto cuore la mia famiglia e i miei genitori per non avermi mai fatto mancare nulla e per avermi sempre supportato in quello che ho fatto.*

*Ringraziamento del tutto particolare e carico di emozione è rivolto a Chiara, mia compagna di vita e a nostra figlia Nicole: grazie per avermi sempre sostenuto soprattutto nei momenti più complicati... grazie di esistere e di essere la luce della mia vita!*

*Grazie a mia nonna Assunta, che purtroppo ci ha lasciati: donna instancabile e con un cuore colmo d'amore. Spero tu sia fiera di me e di questo lavoro sulla canapa che a te è dedicato!*

*Marco*



## Introduzione

Negli ultimi anni è stata registrata in Italia una vera e propria riscoperta della canapa (*Cannabis sativa* L.), soprattutto a partire dal 2013 quando gli ettari coltivati sono passati da 400 a poco più di 4000 nel 2018 (Coldiretti, 2018). Le motivazioni che hanno portato alla riscoperta di questa pianta sono molteplici: da un lato l'entrata in vigore della legge italiana 242/2016 dal titolo "Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera della canapa" che ne ha permesso la coltivazione e l'impiego quale pianta agricola e industriale, pur mantenendo i limiti del THC (Tetraidrocannabinolo) entro lo 0,2% (di recente esteso allo 0,3% dal Parlamento Europeo, EIHA 2021), dall'altro lato, le caratteristiche di sostenibilità ambientale della canapa, quale coltivazione a basso impatto sull'ambiente adatta all'agricoltura biologica (Satriani *et al.*, 2021).

Oltre a questi due fattori, c'è stata una grande volontà di agricoltori, imprenditori e centri di ricerca di recuperare una coltivazione storica per il nostro paese. Si pensi, infatti, che l'Italia era il secondo produttore mondiale di canapa da fibra per quantità (dopo l'Unione Sovietica) e primo per qualità, sino alla Seconda guerra mondiale. L'estensione delle coltivazioni a canapa raggiunsero circa 100.000 ettari (Baldini *et al.*, 2016), per poi ridursi drasticamente con l'avvento delle fibre sintetiche e del proibizionismo americano (Sorrentino, 2021).

Dopo decenni di totale abbandono della coltivazione, la ripresa si è fatta sentire in tutta l'Europa. Ad oggi, la Francia è il paese con la maggior superficie destinata a canapa (circa 18.000 ha), seguita da Italia e Olanda, con 4000 ha (EIHA, 2018).

Nel nostro paese, le attuali produzioni di canapa sono state adibite a nuovi impieghi rispetto a quello predominante del passato, ovvero la fibra, e riguardano in particolare l'agroalimentare, per la produzione di semi, olio, farina e derivati. Altro mercato emergente è quello della canapa da estrazione per ottenere diversi principi attivi, semi lavorati e olio di CBD (Cannabidiolo) per l'impiego in cosmesi (Giupponi *et al.*, 2020), che ad oggi rappresentano un'importante fonte di reddito per i coltivatori e gli operatori di questo settore.

Per quel che concerne il settore alimentare, l'olio di canapa riveste un ruolo importante non solo dal punto di vista delle proprietà nutraceutiche, ma anche dal punto di vista economico. Negli ultimi anni, le aziende italiane che producono olio da semi hanno dovuto affrontare la concorrenza di olii di provenienza e qualità incerta, venduti a prezzi più bassi. Per tale motivo, Federcanapa (Federazione Italiana Canapa) ha istituito il concorso nazionale 'Il Miglior Olio di Semi di Canapa' in collaborazione con l'università Federico II di Napoli e un primo progetto sulla tracciabilità per tutelare l'olio prodotto in Italia, quest'ultimo basato sull'analisi certificata di almeno quattro parametri chimici e sull'assegnazione di un codice univoco al prodotto (Federcanapa, 2021a).

Il mercato italiano della canapa offre, oltre ai già sopracitati prodotti, semi, infiorescenze per tisane e per le aromatizzazioni delle bevande, farine naturalmente prive di glutine, estratti per la cosmesi, tutti prodotti di elevata qualità che si scontreranno con la concorrenza del mercato estero.

Lo scopo di questa ricerca è quello di individuare dei parametri chimici detti “*fingerprints*” caratteristici della canapa coltivata in Italia, che permettano a potenziali organi di controllo, quali Federcanapa o MIPAAF (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali), di verificare l’origine esatta di provenienza dei prodotti a base di canapa, contribuendo così alla riduzione dei casi di adulterazione e alla salvaguardia dei produttori locali.

Altresì, il presente studio vuole fornire un valido strumento di “protezione” ad una coltivazione storica per il nostro Paese e di fondamentale importanza dal punto di vista ambientale, data dalla moltitudine di benefici che la pianta reca al recupero dei suoli, al sequestro di biossido di carbonio dall’atmosfera, alla sua attitudine all’agricoltura biologica e al miglioramento della biodiversità delle coltivazioni ([Adesina et al., 2020](#)).

## 1. La canapa

La *Cannabis sativa* L., comunemente detta canapa, è una pianta erbacea, annuale, alta ed eretta appartenente alla famiglia delle Cannabaceae. È una pianta principalmente dioica (porta infiorescenze maschili e femminili su individui diversi) ed è caratterizzata da impollinazione anemofila. È ampiamente diffusa in tutto il globo grazie alla sua capacità di rispondere e adattarsi ai cambiamenti climatici (Izzo *et al.*, 2020).



*Figura 1: Esempari di pianta di canapa maschile (a sinistra) e femminile (a destra) (Acta plantarum, [https://www.actaplantarum.org/flora/flora\\_info.php?id=1553](https://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=1553)).*

L'area più plausibile di provenienza della canapa è l'Asia centrale (Clarke & Merlin, 2016), mentre altri studi riportano come luogo d'origine l'India e la Cina (Celetti, 2007), zone dalle quali la pianta si è poi diffusa nel resto del mondo. In Italia sono presenti diverse testimonianze a partire dal V e IV secolo a.C. Era nota ai romani che la impiegavano per la produzione di corde e vele, utilizzo che si è

protratto fino al XIX secolo (Ranalli, 2020). Una recente scoperta ad Aquileia ha riportato alla luce il primo sistema di vasche per la macerazione della canapa ad oggi noto in tutto il mondo romano (Cottica & Cipolato, 2020). Da sottolineare, inoltre, alcuni ritrovamenti archeologici di pollini di *Cannabis* nella nostra Penisola risalenti a 11.500 anni a.C. (Ranalli, 2020).

Più recentemente, la coltivazione della canapa italiana per la produzione della fibra ebbe un ruolo molto importante per la nostra economia. L'Italia era infatti il secondo produttore mondiale di fibra, dopo l'Unione Sovietica, con estensioni che arrivarono a toccare i 135.000 ettari tra il 1870-74. Le aree a maggiore vocazione erano Ferrara, Bologna, Rovigo, Modena, Napoli, Caserta e Carmagnola. Negli anni successivi, complici diversi fattori negativi quali l'avvento delle imbarcazioni a motore, l'arrivo di fibre naturali più economiche e di fibre sintetiche, l'arretratezza e la mancata industrializzazione della canapicoltura italiana ed infine il proibizionismo promosso dagli USA, la coltivazione della canapa subì un lento ed irreversibile declino arrivando al 1970 con meno di mille ettari a livello nazionale (Ranalli, 2020; Schluttenhofer & Yuan, 2017).

La canapa ha fatto la sua ricomparsa negli anni 2000 e grazie alla Legge 242 del 2 dicembre del 2016 è stato possibile reintrodurre in Italia la canapa industriale (*Cannabis sativa* L.). La legge ammette a coltivazione solo le varietà registrate nel Catalogo comune delle Varietà di specie delle piante agricole con un contenuto di THC (Tetraidrocannabinolo) inferiore allo 0,2% (Gazzetta Ufficiale, 2016).

Nel 2016, è nata anche Federcanapa - Federazione della canapa italiana, con l'obiettivo di creare un organo di rappresentanza a livello italiano e dare supporto tecnico-scientifico alle iniziative degli attori che operano in questo settore.



*Figura 2: Logo della Federazione della canapa italiana.*

A seguito di quanto successo nel 2016, si è registrato un forte incremento del mercato della canapa italiana: si è passati dai circa 400 ettari nel 2013 ai 4000 ettari nel 2018 (Coldiretti, 2018) e i cosiddetti “hemp shop” hanno superato le 700 unità (Giupponi *et al.*, 2020).

Rispetto al passato, gli impieghi di questa pianta sono cambiati anche grazie alle innumerevoli ricerche e progetti condotti su di essa. Ad oggi, vari sono i settori nella quale la canapa industriale

viene utilizzata. In primis i settori agroalimentare e della cosmesi, che prediligono le parti apicali della pianta (infiorescenze, semi, foglie) che le aziende attive sul territorio italiano sfruttano per la produzione di farina, olio, semi decorticati, infiorescenze per tisane, creme (Giupponi *et al.*, 2020). L'olio di semi di canapa ha sicuramente un grande valore a livello nutrizionale. Esso, infatti, è ricco in acidi grassi polinsaturi e possiede rapporti  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 elevati, ottimali per la salute umana (Izzo *et al.*, 2020). Altri settori oggi degni di nota sono: le infiorescenze per estrazione dei principi attivi (CBD, CBG, ecc.) (Giupponi *et al.*, 2020) e più recentemente anche le altre parti della pianta hanno trovato una destinazione: il canapulo, la parte legnosa dello stelo, per la bioedilizia e per la produzione di bioplastica, di carta e di biodiesel. Altro settore interessante è la fitodepurazione: la canapa è infatti considerata una pianta adatta alla "ripulitura" dei suoli contaminati da metalli pesanti, inquinanti organici e radionuclidi (Rheay *et al.*, 2021). Negli ultimi anni la ricerca si è inoltre focalizzata sull'impiego dei semi e dei co-prodotti dei semi di canapa (esempio farine) come integratore delle diete dei ruminanti (Bailoni *et al.*, 2021).

## 2. Metodi di tracciabilità

Oggigiorno, si sta assistendo ad un aumento della sensibilità da parte dei consumatori verso la qualità e la provenienza dei prodotti che vengono acquistati, siano essi agroalimentari, siano essi provenienti da altri settori industriali tradizionali.

La tracciabilità di un bene sta assumendo sempre maggiore importanza e viene definita come “*Il requisito di essere tracciabile*” ed è meglio esplicitata dalla [UNI EN ISO 22005:2008](#) per il settore agroalimentare come “*la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione*”.

A riguardo, il nostro Paese è famoso per il marchio “Made in Italy”, terzo marchio più conosciuto al mondo dopo “Coca-Cola” e “Visa” ([Duratore, 2018](#)) e i prodotti vengono richiesti proprio per la loro origine e la loro elevata qualità. Questo scaturisce, però, nella presenza sul mercato di diversi prodotti di dubbia provenienza e qualità che vengono venduti a bassi prezzi, generando casi di adulterazione, sofisticazione, alterazione o contraffazione (a seconda delle modalità con cui avvengono) e che danneggiano l’economia e la reputazione italiana. A tal proposito Coldiretti, sulla base dei risultati dell’Ispettorato Centrale Repressione Frodi, afferma che nel 2018 il 58% degli italiani hanno subito un reato “a tavola” ([Coldiretti, 2018](#)). Si sommano, poi, casi ben più gravi nati da problemi di tipo igienico-sanitari, come il ben noto *Bovine Spongiform Encephalopathy*, anche detto “morbo della mucca pazza”.

Per queste ragioni, le aziende produttrici si sono mobilitate per far fronte a queste truffe e dare, il più possibile, certezza al consumatore rispetto a ciò che acquista e consuma, grazie alla definizione di disciplinari di settore, il ricorso a denominazioni (DOP, IGP, STG) e a metodi di tracciabilità di varia natura con i quali è possibile ripercorrere a ritroso la filiera dei prodotti e verificarne la qualità, in linea con i principi della legislazione per la sicurezza alimentare europea ([Reg. CE 178/2002](#)).

Tra le principali tecniche di tracciabilità oggi applicate al settore agroalimentare, degne di nota sono: la geochimica isotopica, con la quale si possono definire le impronte geografiche ed ecologiche di un prodotto, ampiamente utilizzata per l’autenticazione di beni alimentari di rilievo quali l’olio d’oliva, il vino, il formaggio e il caviale ([Bontempo et al., 2019](#); [Camin et al., 2017](#)); la tracciabilità analitica, tramite terre rare ed elementi in traccia, spesso accoppiate agli isotopi e validi strumenti per risalire alle pratiche agricole nonché alla loro provenienza geografica ([Tedesco et al., 2021](#); [Squadrone et al., 2020](#)); l’analisi genetica e delle proteine, impiegate come marcatori lungo la catena alimentare ([Tinacci et al., 2018](#); [Catalano et al., 2016](#)); la tecnologia blockchain, che permette di tracciare e

monitorare, in maniera certificata, i passaggi dal produttore al consumatore ([Antonucci et al., 2019](#); [Tripoli & Schmidhuber, 2018](#)).

Di seguito, vengono riportati degli approfondimenti sulle tecniche di tracciabilità impiegate in questo studio, quali la geochimica isotopica, gli elementi in traccia e le terre rare.

## 2.1 Isotopi stabili

La geochimica isotopica sfrutta le caratteristiche degli isotopi, ovvero atomi di uno stesso elemento che hanno lo stesso numero atomico (uguali proprietà chimiche) e numero di massa diverso (dato dal differente numero di neutroni presenti nel nucleo) e che si traduce in diverse proprietà fisiche e chimico fisiche. Gli isotopi si dividono in stabili, ovvero non subiscono un decadimento radioattivo o che possiedono tempi di emivita così lunghi da non poter essere misurati, e radioattivi, aventi nuclei instabili e soggetti a decadimento, processo che ne varia l'abbondanza e la trasformazione in altri isotopi. La composizione isotopica di un campione, definita dal simbolo delta ( $\delta$ ), viene espressa come segue ([Brand & Coplen, 2012](#)):

$$\delta^i E = \frac{{}^i R_{sample} - {}^i R_{reference}}{{}^i R_{reference}}$$

dove  $i$  rappresenta il numero di massa dell'isotopo più pesante (esempio  $^{13}\text{C}$ ),  $R_{sample}$  è il rapporto tra l'isotopo più "raro" e quello più "abbondante" (esempio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ),  $R_{reference}$  indica lo stesso rapporto isotopico misurato su un materiale di riferimento internazionale, chiamato standard.

Il valore delta è espresso in "per mille" (‰): un valore positivo indica un arricchimento dell'isotopo raro (esempio  $^{13}\text{C}$ ) nel campione rispetto al materiale di riferimento, un valore negativo un impoverimento.

I rapporti isotopici dei bioelementi presi in considerazione in questo studio (C, N, S, H, O) sono stati determinati tramite la tecnica della spettrometria di massa (IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometer). Essa misura i rapporti isotopici di un gas campione, "sample" e di un gas di riferimento, "reference". Il gas campione (nel nostro caso  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}$ ) viene introdotto nello spettrometro di massa, viene ionizzato ( $\text{CO}_2^+$ ) in una sorgente, accelerato da un campo elettrico, e grazie all'applicazione di un campo magnetico, viene deviato in funzione del rapporto massa/carica: le molecole isotopologiche più leggere subiranno un raggio di curvatura più piccolo (verranno deviate di più), mentre quelle più pesanti un raggio maggiore (verranno deviate di meno). Gli ioni, a seconda del rapporto massa/carica,

andranno ad impattare su un collettore specifico e la corrente raccolta verrà trasmessa attraverso i resistori per produrre le tensioni che verranno amplificate e misurate (Figura 3).

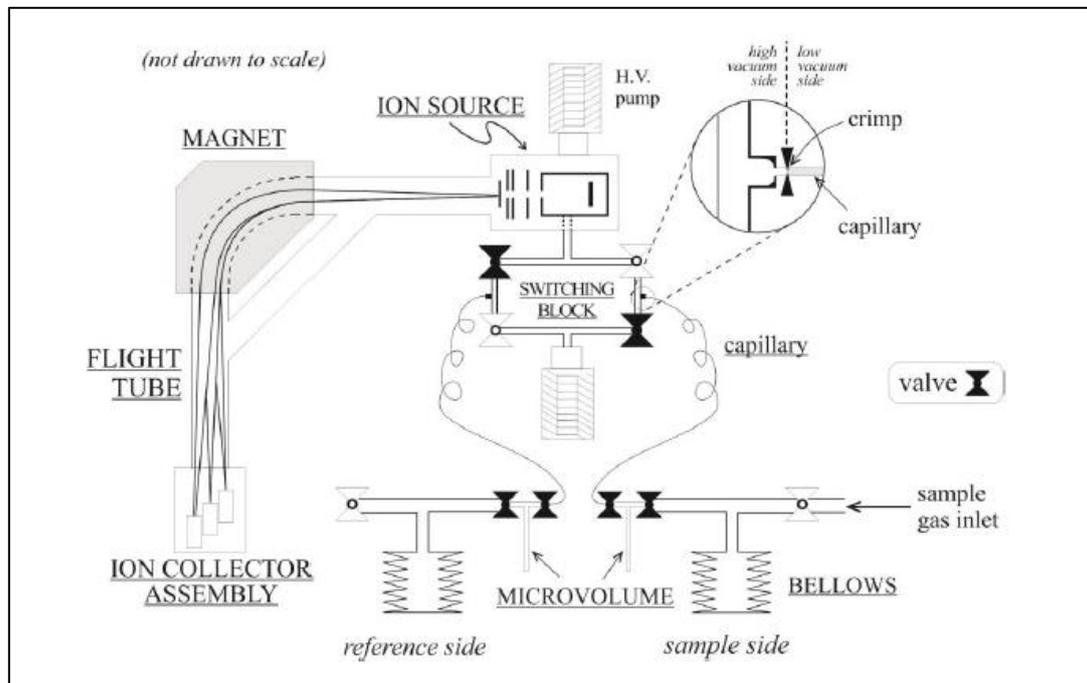


Figura 3: Schema di un tipico spettrometro di massa moderno (Sharp, 2017).

L'intensità della corrente che arriva ai collettori è proporzionale all'abbondanza della molecola isotopologica ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$  nel caso della  $\text{CO}_2$ ). La stessa misura verrà effettuata sul gas di riferimento e la differenza in parti per mille del rapporto isotopico del campione rispetto a quello dello standard produrrà un valore "delta".

### 2.1.1 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

La composizione isotopica del carbonio ( $\delta^{13}\text{C}$ ) è strettamente legata al tipo di ciclo fotosintetico di una pianta e, in minor misura, è influenzato dalle condizioni climatiche presenti nell'area in cui la pianta stessa cresce (Bontempo *et al.*, 2020). Rispetto al primo punto, i range di  $\delta^{13}\text{C}$  sono compresi tra -22 e -33‰ per le piante a ciclo C3, che comprendono la maggior parte delle coltivazioni alimentari utilizzate ad oggi, mentre tra -10 e -15‰ per le piante a ciclo C4, che comprendono piante quali mais, sorgo e la canna da zucchero. Le piante CAM, generalmente rappresentate da specie succulente (come agave e vaniglia), hanno valori di  $\delta^{13}\text{C}$  intermedi tra C3 e C4 (Carter & Chesson 2017), come riportato in Figura 4.

Le differenze nei valori di  $\delta^{13}\text{C}$  caratteristici dei tessuti di queste piante derivano dal primo complesso organico fissato durante la fotosintesi: a tre atomi per le C3, a quattro atomi per le C4, mentre le piante CAM hanno un comportamento simile alle C4.

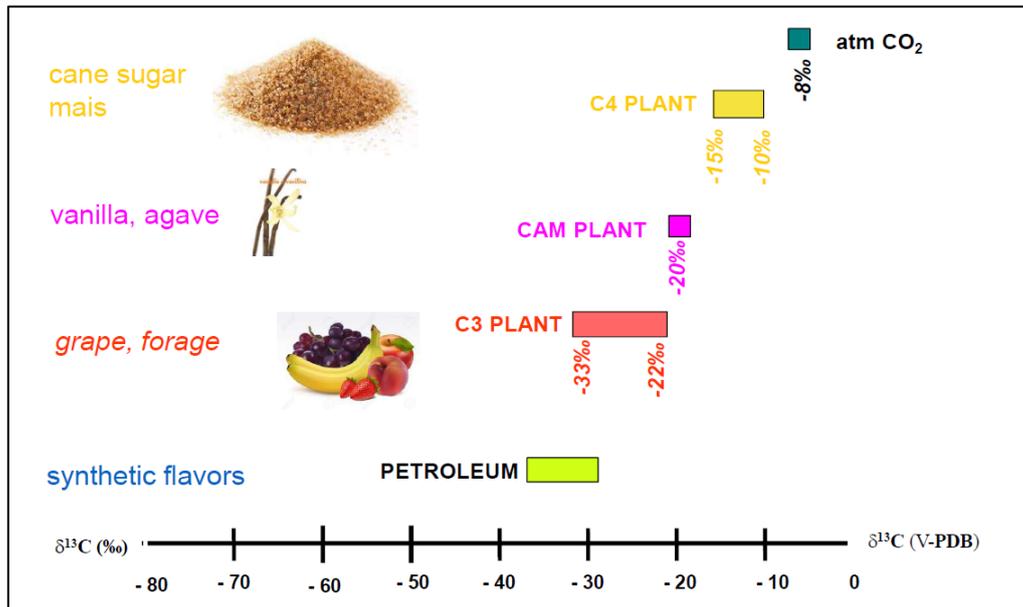
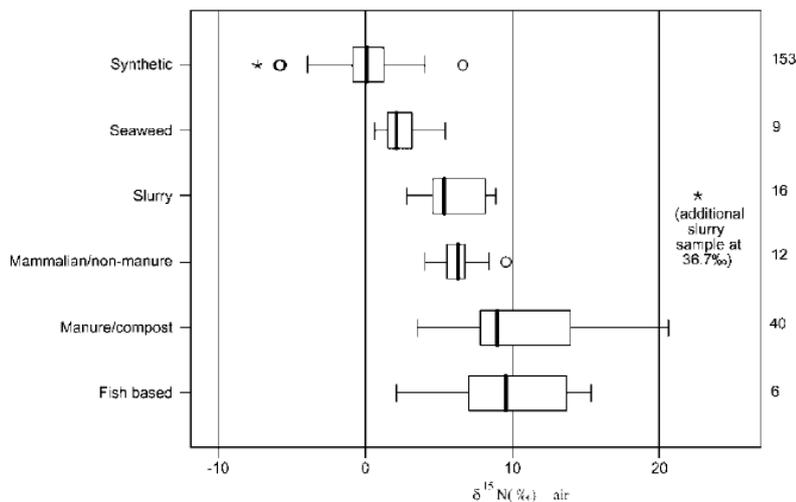


Figura 4: Variabilità del  $\delta^{13}\text{C}$  di alcune piante e di alcuni prodotti derivati.

Il  $\delta^{13}\text{C}$  viene inoltre utilizzato per comprendere la *Water Use Efficiency* (WUE) di una pianta, che può essere definita come la quantità di carbonio assimilato come biomassa per unità di acqua utilizzata dalla coltura (Hatfield & Dold, 2019). Infatti, il rapporto isotopico del carbonio è direttamente collegato al rapporto tra il gradiente di concentrazione di  $\text{CO}_2$  tra l'esterno ( $C_a$ ) e l'interno ( $C_i$ ) di una foglia, che varia in funzione delle condizioni climatiche a cui una pianta è sottoposta (Condon, 2004).

### 2.1.2 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

Il rapporto isotopico dell'azoto ( $\delta^{15}\text{N}$ ), viene generalmente utilizzato come "marker" per differenziare le coltivazioni a seconda del tipo di regime alle quali vengono sottoposte, biologico o convenzionale, come riportato in Bateman & Kelly (2007): tale rapporto riflette la tipologia di fertilizzante impiegato (Figura 5).

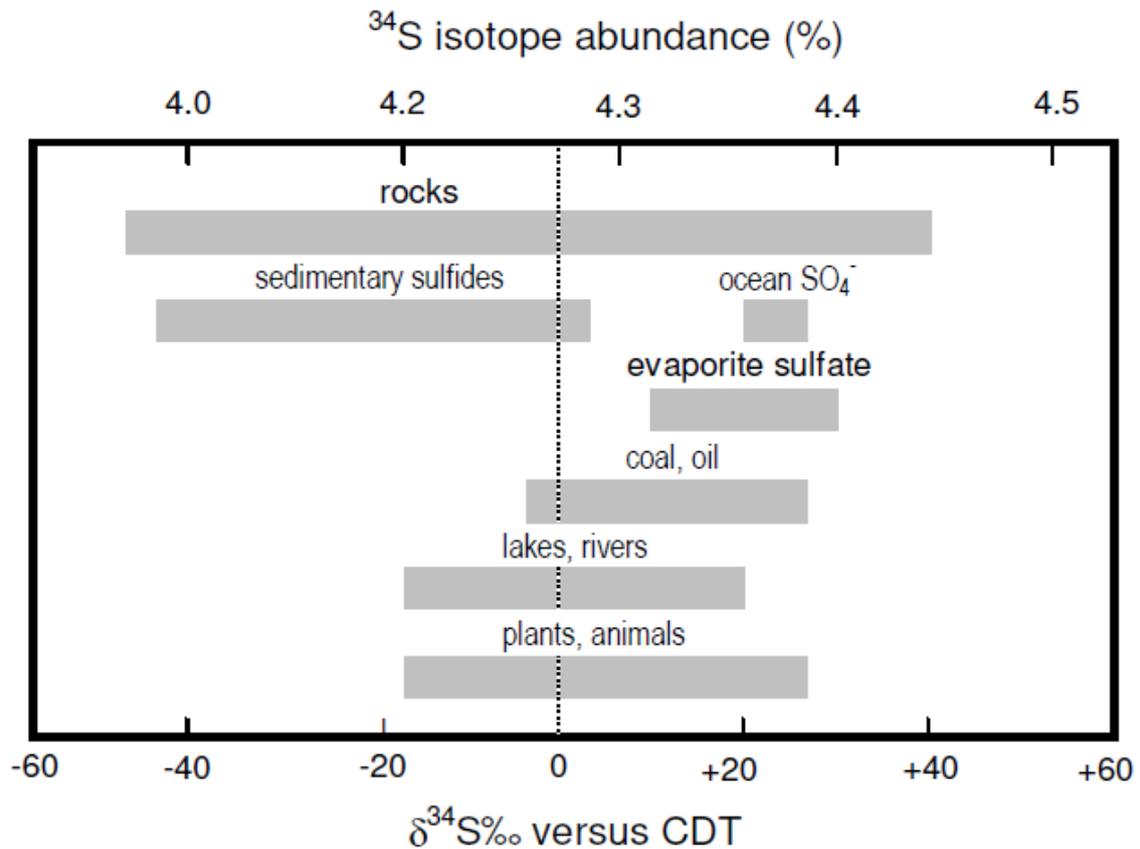


**Figura 5:** Scatole a baffi che riportano i range di  $\delta^{15}\text{N}$  di varie tipologie di fertilizzanti (Bateman & Kelly, 2007).

I valori di  $\delta^{15}\text{N}$  possono variare da +0.3 to +14.6‰ per le coltivazioni organiche e da -4.0 to +8.7‰ per quelle convenzionali (Inácio, 2018). Un'eccezione a quanto sopra riportato, si presenta per le colture soggette a pratiche di fertilizzazione che impiegano piante azoto-fissatrici che, fissando l'azoto direttamente dall'atmosfera, hanno valori prossimi allo 0‰ e tendono ad abbassare i valori del  $\delta^{15}\text{N}$  delle coltivazioni biologiche facendole perciò ricadere nel range del convenzionale (Bontempo *et al.*, 2020). Altri fattori che influiscono sulla variazione del rapporto isotopico dell'azoto sono la vicinanza del mare e lo stress idrico, che ne possono causare un arricchimento (Heaton, 1987).

### 2.1.3 $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$

Lo zolfo ha quattro isotopi stabili ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ , e  $^{36}\text{S}$ ) e il rapporto isotopico che viene comunemente misurato è  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ , in quanto gli isotopi  $^{34}\text{S}$  e  $^{32}\text{S}$  sono i più abbondanti in natura (Sharp, 2017). Tale rapporto può essere influenzato da diversi fattori quali distanza dal mare, processi microbici, tipologia di suolo presente, tipologia di fertilizzanti impiegati e input antropogenici (Zhou *et al.*, 2021; Paolini, 2017; Zasso *et al.*, 2011). Generalmente, all'interno delle piante i processi di frazionamento isotopico dello zolfo sono limitati e per questo possono essere utilizzati come indicatori dei valori di  $\delta^{34}\text{S}$  del suolo. Gli isotopi dello zolfo, inoltre, variano geograficamente per cui il  $\delta^{34}\text{S}$  può essere impiegato nell'assegnazione della provenienza geografica dei prodotti alimentari (Carter & Chesson, 2017).



*Figura 6: Valori di  $\delta^{34}\text{S}$  misurati in diverse tipologie di matrici (Kelly, 2001).*

Come sopra riportato, il  $\delta^{34}\text{S}$  può essere influenzato da fattori sia naturali che antropici. Tra i primi, i più rilevanti sono lo spray marino presente nelle regioni costiere, che ne causa un arricchimento in  $\delta^{34}\text{S}$ , e l'attività biologica dei batteri presenti nel suolo, sia essi aerobici che anaerobici. Tra i fattori antropici, invece, i più rilevanti sono la combustione di combustibili fossili (esempio carbone, petrolio, ecc.), le emissioni vulcaniche e i fertilizzanti impiegati in agricoltura (Paolini, 2017).

#### 2.1.4 $^2\text{H}/^1\text{H}$

L'idrogeno ha due isotopi stabili  $^1\text{H}$  e  $^2\text{H}$ , i quali hanno una grande differenza di massa (100%). Questo si traduce in grandi variazioni a livello fisico-chimico che possono essere largamente influenzate da processi quali evaporazione, condensazione e fattori biologici. Il rapporto isotopico dell'idrogeno ( $\delta^2\text{H}$ ) nelle precipitazioni è quindi legato alle variazioni climatiche e a fattori geografici quali latitudine, altitudine e distanza dal mare, che possono causarne un arricchimento o un impoverimento (Dansgaard, 1964). Un esempio è dato dal processo di evaporazione/condensazione che l'acqua subisce dal passaggio dall'oceano verso l'entroterra, come riportato in Figura 7, che causa

un progressivo impoverimento in  $^2\text{H}$  a causa dei successivi processi di condensazione frazionata, processo anche noto con il termine di “rain-out”.

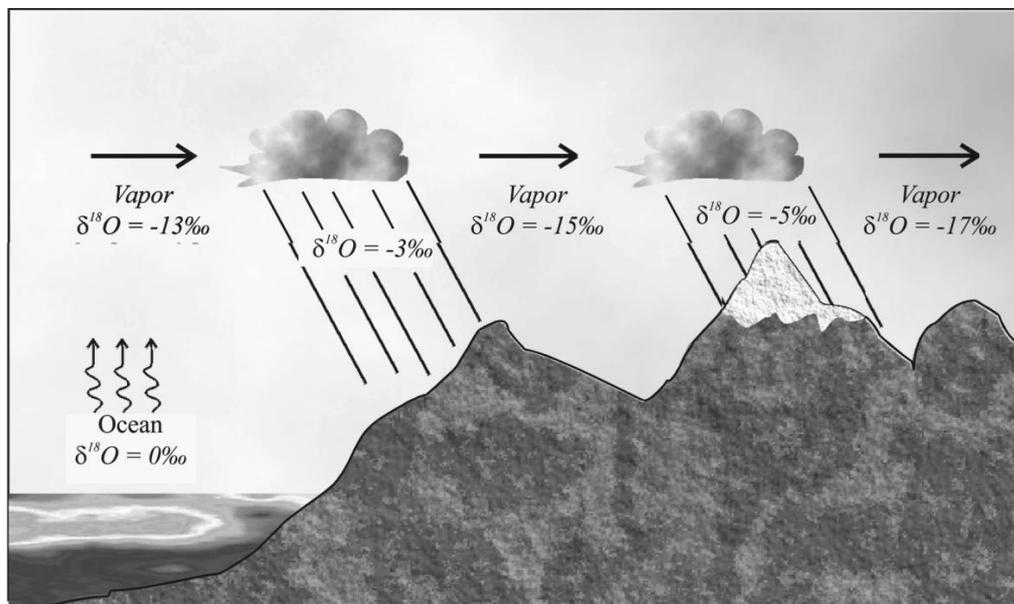


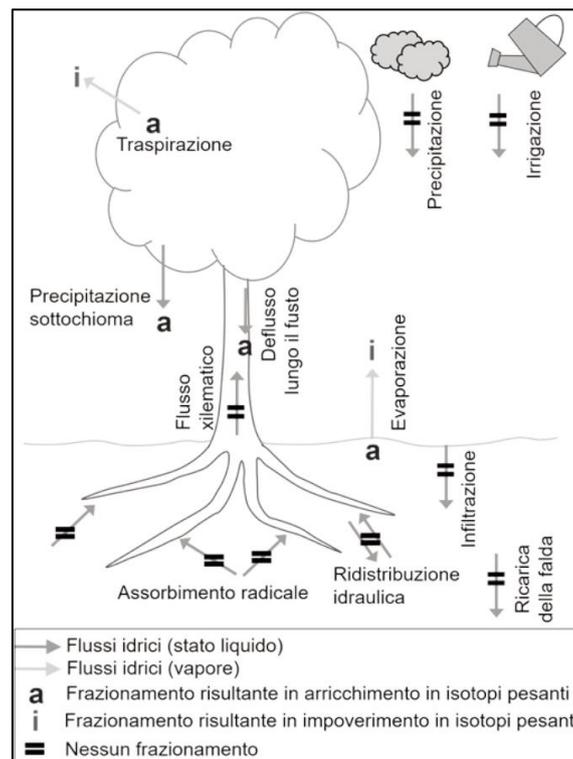
Figura 7: Schema che rappresenta l'effetto della distillazione frazionata delle precipitazioni (Sharp, 2017).

Per quanto riguarda il comportamento nelle piante, il valore del  $\delta^2\text{H}$  dell'acqua xilematica si assume sia lo stesso dell'acqua captata dal suolo, in quanto non avvengono processi rilevanti di frazionamento isotopico, anche se i flussi d'acqua tra le cellule di una pianta sono ancora molto poco studiati (Barbeta *et al.*, 2022; Scandellari & Penna, 2017). La variazione più significativa avviene a livello degli stomi, dove l'evapotraspirazione causa un arricchimento dell'acqua fogliare e dei tessuti vegetali, per via della volatilizzazione degli isotopi più leggeri (Sharp, 2017; Scandellari & Penna, 2017). A livello di materia organica, invece, il valore del  $\delta^2\text{H}$  dipende dall'acqua assorbita dalla pianta (direttamente dal suolo o da irrigazione) (Horacek *et al.*, 2015) ed è successivamente influenzato dal processo fotosintetico di sintesi della cellulosa (Yakir & De Niro, 1990).

### 2.1.5 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

L'ossigeno in natura si presenta sottoforma di tre isotopi:  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  e  $^{18}\text{O}$ . Il rapporto isotopico  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  delle precipitazioni è anch'esso influenzato, come per l'idrogeno, da fattori climatici e geografici, quali latitudine, altitudine e distanza dal mare, che possono arricchire o impoverire il suo valore (Dansgaard, 1964). La composizione isotopica dell'idrogeno delle precipitazioni risulterà, mediamente, 8 volte più frazionata di quella dell'ossigeno e le due risulteranno legate da quella che viene definita la retta delle acque meteoriche (Global Meteoric Water Line, GMWL), espressa dalla seguente relazione:  $d^2\text{H} = 8 \cdot d^{18}\text{O} + 10$  (Craig, 1961).

Il  $\delta^{18}\text{O}$  subisce un impoverimento maggiore è la distanza dal mare, maggiore è la latitudine e l'altitudine. Per quest'ultimo fattore, [Sharp \(2017\)](#) riporta un impoverimento in  $^{18}\text{O}$  del  $-0,26\%/100\text{m}$  a livello globale. La composizione isotopica dell'ossigeno dell'acqua nelle piante è fortemente legata alla composizione dell'acqua assorbita dal suolo (dalla falda o da quella di irrigazione). Come riportato in [Figura 8](#), a livello xilematico nel movimento dalle radici verso le parti apicali è poco probabile che si verifichino dei frazionamenti, cosa invece che accade nelle foglie a causa del processo di traspirazione, quale fattore più influente nel continuum suolo-pianta-atmosfera ([Scandellari & Penna, 2017](#)).



**Figura 8:** Variazione della composizione isotopica nel continuum suolo-pianta-atmosfera ([Scandellari & Penna, 2017](#)).

Nella materia organica vegetale, la composizione isotopica dell'ossigeno è legata all'acqua assorbita dalla pianta, che può subire un arricchimento negli isotopi più pesanti a causa dell'evapotraspirazione nelle foglie, ma dipende anche, in minor parte, dalla  $\text{CO}_2$  e dall'ossigeno dell'atmosfera, entrambi con valori di  $\delta^{18}\text{O}$  estremamente positivi, rispettivamente  $+41\%$  ([Yakir & Sternberg, 2000](#)) e  $+23,5\%$  ([Guy et al., 1993](#)). L'integrazione di quest'ossigeno atmosferico nei processi metabolici comporta frazionamenti significativi dei valori di  $\delta^{18}\text{O}$  della cellulosa, causandone un arricchimento rispetto al  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua fogliare. ([Barbour, 2007](#)).

## 2.2 Rapporti isotopici dello Stronzio

Lo stronzio è un metallo alcalino-terroso ed è caratterizzato da quattro isotopi naturali  $^{84}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Sr}$ ,  $^{87}\text{Sr}$  e  $^{88}\text{Sr}$ . Il suo raggio ionico è molto simile a quello dell'elemento calcio, per cui lo può sostituire in un'ampia serie di minerali, nonché in diversi processi metabolici (Elgawhary *et al.*, 1972). Lo  $^{87}\text{Sr}$  si viene a formare dal decadimento radioattivo del  $^{87}\text{Rb}$ , come riportato di seguito:



Per tale motivo, la quantità di  $^{87}\text{Sr}$  presente in natura aumenta progressivamente, così come il rapporto  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ . Ogni formazione geologica presenta un rapporto  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  caratteristico, per cui questo valore, funzione dell'età delle rocce, è un utile strumento di datazione geocronologica che viene spesso sfruttato nelle ricerche archeologiche (Sillen, 2021; Arienzo *et al.*, 2020).

Lo stronzio che deriva dalle cosiddette “bedrocks” è presente nei suoli e nelle acque di profondità e durante il processo di assorbimento verso le piante non subisce frazionamenti isotopici significativi. Per questa ragione, il rapporto isotopico dello stronzio che troviamo in una pianta riflette la geologia del luogo, diventando un valido strumento per gli studi di tracciabilità geografica di diverse tipologie di prodotti agroalimentari quali riso (Liu *et al.*, 2019), uva (Tescione *et al.*, 2018) e caffè (Liu *et al.*, 2014).

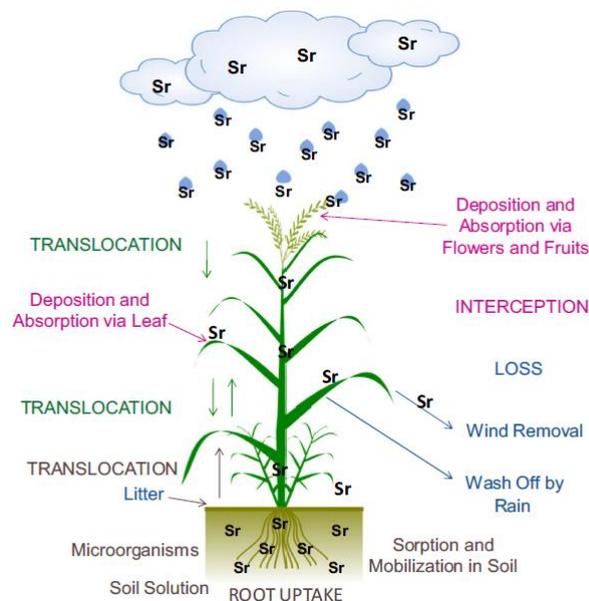


Figura 9: Processo di assorbimento dello stronzio nelle piante (Burger & Lichtscheidl, 2019).

La misurazione del rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  (e in generale degli elementi pesanti) avviene tramite la tecnica della spettrometria di massa e, nello specifico, può essere utilizzata la TIMS (Thermal

Ionization Mass Spectrometry) oppure la MC-ICP-MS (*Multi Collector-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*). La MC-ICP-MS è una tecnica che negli ultimi anni sta prendendo il sopravvento sulla TIMS, sia per un minor consumo di tempo, sia nell'introduzione più semplice dei campioni (Cherter & Chesson, 2017). Generalmente, il campione prima di essere analizzato, subisce una purificazione per eliminare eventuali elementi interferenti come il  $^{87}\text{Rb}$ .

## 2.3 Elementi in traccia e Terre Rare

Gli elementi in traccia (*Trace Elements*, TEs) e le terre rare (*Rare Earth Elements*, REEs) possono fornire indicazioni sulla provenienza geografica, sulle pratiche agricole e sul processo produttivo ai quali i prodotti agroalimentari sono sottoposti (Tedesco *et al.*, 2021; Squadrone *et al.*, 2020; Telloli *et al.*, 2019). In diversi studi, TEs e REEs vengono accoppiati agli isotopi stabili per dare maggiore robustezza al metodo di tracciabilità e autenticazione. Nella tracciabilità, l'analisi chimica degli elementi può essere cruciale per verificare l'identità e l'autenticità dei prodotti e nel monitoraggio dei vari passaggi che subiscono lungo una filiera. Elementi in traccia e terre rare possono quindi rappresentare uno strumento valido per dirimere situazioni di incertezza nelle frodi alimentari nonché per identificare contaminazioni pericolose per l'ambiente e la salute (Telloli *et al.*, 2019).

La spettrometria di massa è una delle tecniche analitiche più utilizzate per determinare gli elementi in traccia ed ultra-traccia presenti negli alimenti ed altre matrici, data la sua elevata sensibilità, ampio range di concentrazioni rilevabili e velocità di esecuzione (Becker, 2007). Nello specifico, per gli elementi in traccia e per le terre rare, la tecnica che comunemente viene adottata è l'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*).

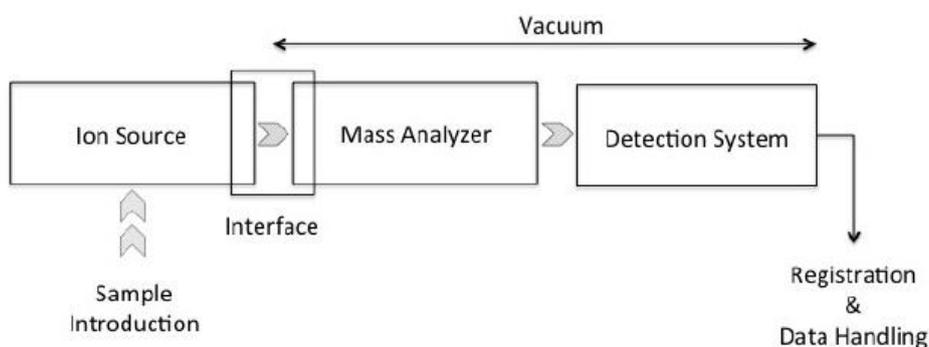
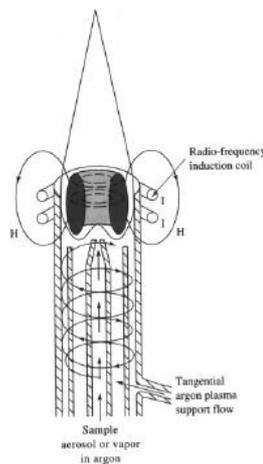


Figura 10: Schematizzazione di uno spettrometro di massa (Bonetto, 2014).

All'interno dell'ICP-MS il campione liquido viene inviato alla camera di nebulizzazione dove viene trasformato in aerosol. Successivamente viene eseguita una selezione nella camera dell'aerosol, ciò in funzione della geometria della camera. L'aerosol così formato viene trasportato (spesso attraverso argon) nella zona della sorgente dove, grazie ad una torcia al plasma che opera ad elevata temperatura (circa 10.000 °C), avviene la sua evaporazione, atomizzazione e la ionizzazione (Telloli *et al.*, 2019).



*Figura 11: esempio di torcia al plasma (Bonetto, 2014).*

Gli ioni prodotti vengono dunque sottoposti ad un campo magnetico il quale, in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ ), ne definisce la traiettoria specifica con cui colliderà su di un rivelatore. Il sistema di rilevazione converte lo ione in un segnale elettrico, la cui intensità è correlata alla concentrazione del singolo ione.

A seguire verranno fatti degli approfondimenti sugli elementi in traccia (*Trace Elements*, TEs) e sulle terre rare (*Rare Earth Elements*, REEs), elementi impiegati nel corso di questo studio per caratterizzare la canapa e i suoi prodotti derivati.

### 2.3.1 Elementi in traccia

Con il termine “elementi in traccia” o “*Trace Elements – TEs*” in lingua inglese, vengono definiti comunemente una serie di elementi presenti in ambiente o negli organismi a basse concentrazioni. Nelle scienze della terra vengono considerati in traccia quegli elementi con contenuti al di sotto dello 0,1% in peso di ossidi. Se consideriamo piante ed animali, sono da definirsi in traccia gli elementi presenti a concentrazioni relativamente basse (sotto lo 0,1%) e non considerati ancora essenziali (Pais & Jones, 1997). Nella categoria degli elementi in traccia vengono spesso inseriti i micronutrienti (con concentrazioni  $\leq 100$  mg/kg/dw), sui quali vi sono ancora alcune difficoltà nel definirne il numero esatto, in quanto, per alcuni di essi, non è stato ancora chiarito il ruolo di “essenziale” o “non essenziale” (Vatansever et al., 2017). Fanno parte dei micronutrienti Zn, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni che intervengono in importanti processi quali metabolismo primario e secondario, difesa della cellula, trasferimento del materiale genetico, regolazione dei geni e metabolismo energetico (Vatansever et al., 2017). Una loro carenza o eccesso possono influenzare in maniera negativa la fisiologia della pianta, causando anche gravi problemi. Contrariamente, As, Cd, Pb, Cr e Hg, conosciuti anche come

*Toxic Heavy Metals* (THMs), non sono essenziali per la fisiologia della pianta e in alcuni casi, a seconda dell'organismo considerato, possono manifestare la loro tossicità a livelli piuttosto bassi di concentrazione (Muszyńska & Labudda, 2019; Rahman & Singh, 2019), mentre Rb e Sr, Cs e Li possono sostituirsi o competere con alcuni elementi essenziali presenti nelle piante o negli esseri umani.

Per quel che riguarda la tracciabilità, gli elementi in traccia sono stati impiegati in diversi studi per i prodotti agroalimentari (Fernandes *et al.*, 2020; Wadood *et al.*, 2019). La loro presenza è dovuta alle concentrazioni nel suolo, che possono dipendere dalla tipologia di substrato e di roccia madre presente, alle pratiche agricole di fertilizzazione o alla presenza di attività industriali nell'area. Anche i processi di lavorazione a cui un prodotto è stato sottoposto possono essere fonte di elementi in tracce nei prodotti (Aceto *et al.*, 2019). La concentrazione di tali elementi può essere riconducibile alla zona d'origine del prodotto stesso, come riportato in ricerche condotte su olio d'oliva, nocciole, vino, riso (Aceto *et al.*, 2020, Aceto *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2014; Oddone *et al.*, 2009) e addirittura nell'industria delle gemme preziose (Cartier *et al.*, 2018). Spesso, in queste ricerche, gli elementi in traccia vengono accoppiati all'analisi delle terre rare (Danezis & Georgiou, 2022).

### 2.3.2 Terre Rare

Le terre rare (*Rare Earth Elements* - REE) sono un gruppo di 17 elementi: i lantanidi, dal La al Lu (15) e Y e Sc, come evidenziato in Figura 12.

Rare Earth Elements																			
H																	He		
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne		
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn		
Fr	Ra	**	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Fl	Uup	Lv	Uus	Uuo		
		*	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
		**	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		
			Light Rare Earth Element					Heavy Rare Earth Element											

Figura 12: tabella periodica con le terre rare in evidenza (it.Quora.com).

Questi elementi vengono generalmente suddivisi in due categorie in base alla loro configurazione elettronica: terre rare leggere (*Light REEs*), dal La al Eu, e terre rare pesanti (*Heavy REEs*), dal Gd al Lu (Grosjean *et al.*, 2022). Alcuni articoli prevedono una classificazione differente, con l'aggiunta delle terre rare medie (*Medium REEs*), che comprendono Dy, Eu, Gd, Tb, e Y, mentre ridefiniscono le leggere (La, Ce, Pr, Nd, Sm) e le pesanti (Er, Ho, Sc, e Yb) (Hidayah & Abidin, 2019).

Nonostante il loro nome fuorviante, questi elementi non sono così rari sul nostro pianeta. Basti pensare che la loro abbondanza nella crosta terrestre è paragonabile a quella del rame, per le terre rare leggere, e all'oro, per quelle pesanti (Wall, 2021). Negli ultimi anni, l'interesse verso le terre rare è in costante aumento per via delle loro particolari caratteristiche chimiche e fisiche. Infatti, sono diventate essenziali per settori quali elettronica, comunicazione, medicina, catalisi, produzione di energia, settore medico (Grosjean *et al.*, 2021; Cotruvo *et al.*, 2019). Altro settore dove stanno trovando impiego sono i fertilizzanti e i mangimi per animali (Kotelnikova *et al.*, 2021; Tommasi *et al.*, 2021). In questo caso, le terre rare sembrano esercitare un effetto positivo sulla crescita di piante ed animali quali galline ovaiole e maiali: gli effetti tossici su tali organismi e sull'uomo sono ancora in fase di valutazione, come anche il loro comportamento geochimico nel sistema suolo-pianta (Tommasi *et al.*, 2021; Kotelnikova *et al.*, 2021; Malhotra *et al.*, 2020).

Anche le terre rare, come gli elementi in traccia, sono state considerate validi strumenti per l'identificazione dell'origine geografica di diversi prodotti alimentari quali l'olio di semi di zucca (Bandoni *et al.*, 2013), le foglie di tè (Zhao & Yiang, 2019), il latte (Tedesco *et al.*, 2021) e il cibo in generale (Danezis & Georgiou, 2022). I vantaggi nell'impiego delle REEs negli studi di tracciabilità risiedono nel fatto che le fonti primarie di questi elementi nel suolo, e di conseguenza nelle piante negli organismi indagati, siano la composizione degli strati rocciosi e le condizioni meteorologiche dell'area considerata (Kotelnikova *et al.*, 2021; Migaszewski & Gałuszka, 2015). Questo le rende un valido strumento per la tracciabilità dell'origine geografica.

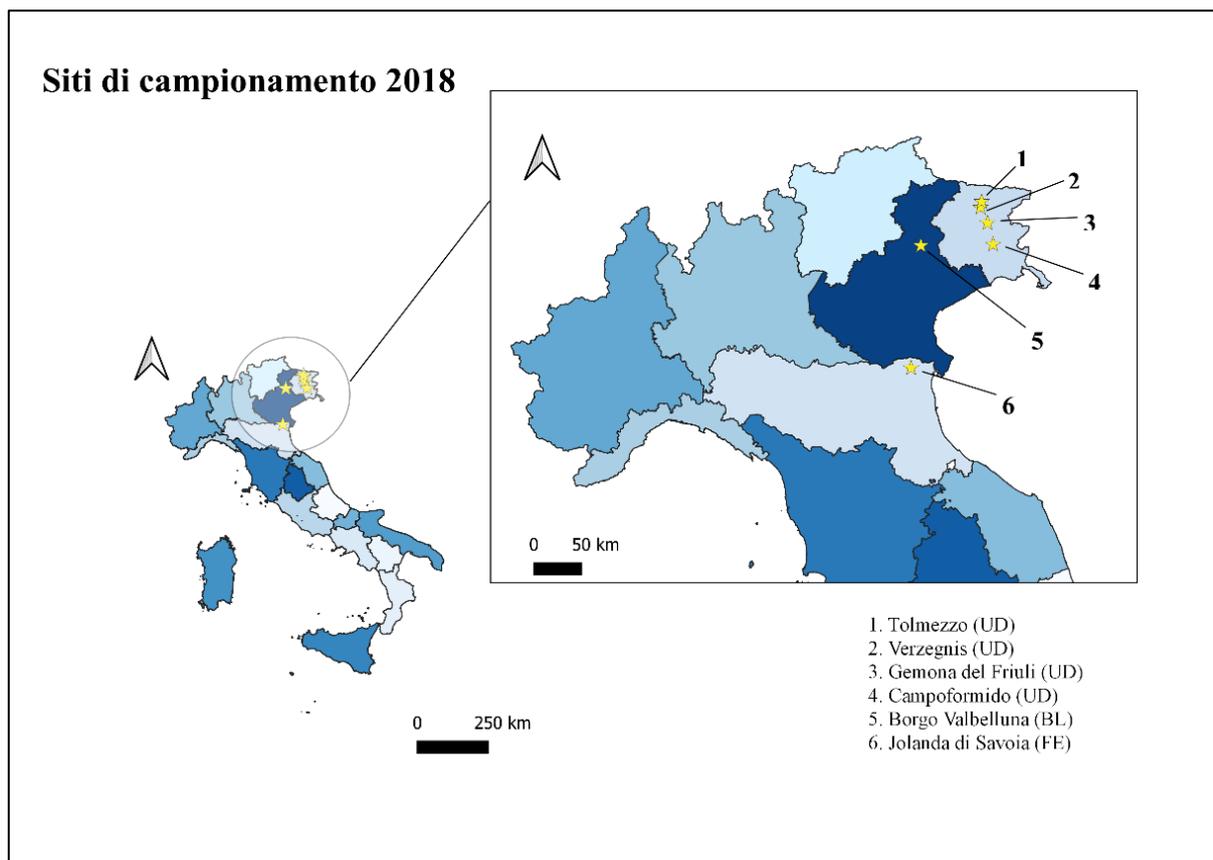
### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Campionamenti (siti e campagne)

Per questa ricerca di dottorato è stata considerata come zona di campionamento iniziale l'intera penisola italiana, isole principali comprese. A seguito di puntuali considerazioni economico-temporali ed in funzione dell'andamento delle coltivazioni di canapa industriale italiana, dipendenti dalla disponibilità di semente certificata, del quadro legislativo nazionale non molto chiaro e della situazione legata all'emergenza sanitaria COVID-19, sono state considerate solo alcune regioni. Sempre per le ragioni sopracitate, non è sempre stato possibile ripetere il campionamento nella stessa area in anni successivi.

Nello specifico, i siti totali di campionamento sono stati 19 su un totale di 10 regioni considerate, ovvero: Piemonte, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Marche, Calabria, Sardegna e Sicilia. Le campagne per la raccolta campioni sono state possibili grazie alla collaborazione con le aziende agricole sparse sul territorio, che non coltivano solo canapa industriale, ma anche altre piante e cereali. Le estensioni andavano dai 0,1 ai 5 ettari (le estensioni maggiori si registrano nel centro-sud Italia) e alcune di esse erano sottoposte a regime biologico o in transizione al biologico. I campionamenti delle diverse parti della pianta di canapa (radice, stelo, infiorescenze, semi), dell'olio e del suolo, sono stati eseguiti nelle campagne del 2018, 2019 e 2020. I campioni di canapa sono stati raccolti direttamente in campo a maturazione della pianta avvenuta (a seconda della zona di provenienza) e quindi a scalare dalle zone meridionali (giugno-luglio) alle zone settentrionali (settembre-ottobre). Ogni campione, che consisteva nell'unione di 5/6 piante raccolte a random nel campo, è stato poi suddiviso con l'ausilio di cesoie in radice, stelo, infiorescenze e semi e inserito in sacchetti di polietilene a chiusura ermetica e conservati in congelatore ad una temperatura di -20°C, in modo da evitare la proliferazione di muffe e/o batteri. I campioni di suolo, invece, raccolti nelle immediate vicinanze delle piante (a mano o con l'aiuto di una piccola zappa) ad una profondità di 0-20cm, sono stati inseriti in sacchetti di polietilene e anch'essi conservati ad una temperatura di -20°C. L'olio, non appena spremuto, è stato trasferito in boccette di polietilene con tappo e contro tappo e conservato in frigo al buio per evitarne la degradazione.

La campagna del **2018** si è focalizzata su un'area piuttosto ristretta dell'Italia e nello specifico ha riguardato sei punti dislocati tra Veneto, Friuli-Venezia Giulia ed Emilia-Romagna, come riportato nella [Figura 13](#).



*Figura 13: Mappa che riporta i siti campionati nel 2018.*

Nella campagna condotta nel **2019** i campionamenti non sono stati ripetuti nei punti del 2018, ma eseguiti in altre aree, come riportato in [Figura 14](#). Per quel che riguarda le regioni, nel 2019 il campionamento ha riguardato Piemonte, Trentino-Alto Adige, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Marche, Sardegna e Sicilia, per un totale di 9 siti interessati, estendendo così il raggio dello studio. Nel **2020**, ultima campagna condotta, sono stati prelevati campioni da 9 aree localizzate in 7 regioni differenti, come riportato di seguito. Dei 9 siti considerati, 5 sono gli stessi campionati nell'anno precedente (2019), ovvero Predaia (TN) in Trentino-Alto Adige, Seren del Grappa (BL) in Veneto, Udine in Friuli-Venezia Giulia, Sassari in Sardegna e Caltagirone (CT) in Sicilia. 4 invece quelli nuovi: Monno (BS) in Lombardia, Fiesso d'Artico (VE) e Rovigo in Veneto e Camigliatello Silano (CS) in Calabria (evidenziati in rosso nella [Figura 14](#)).

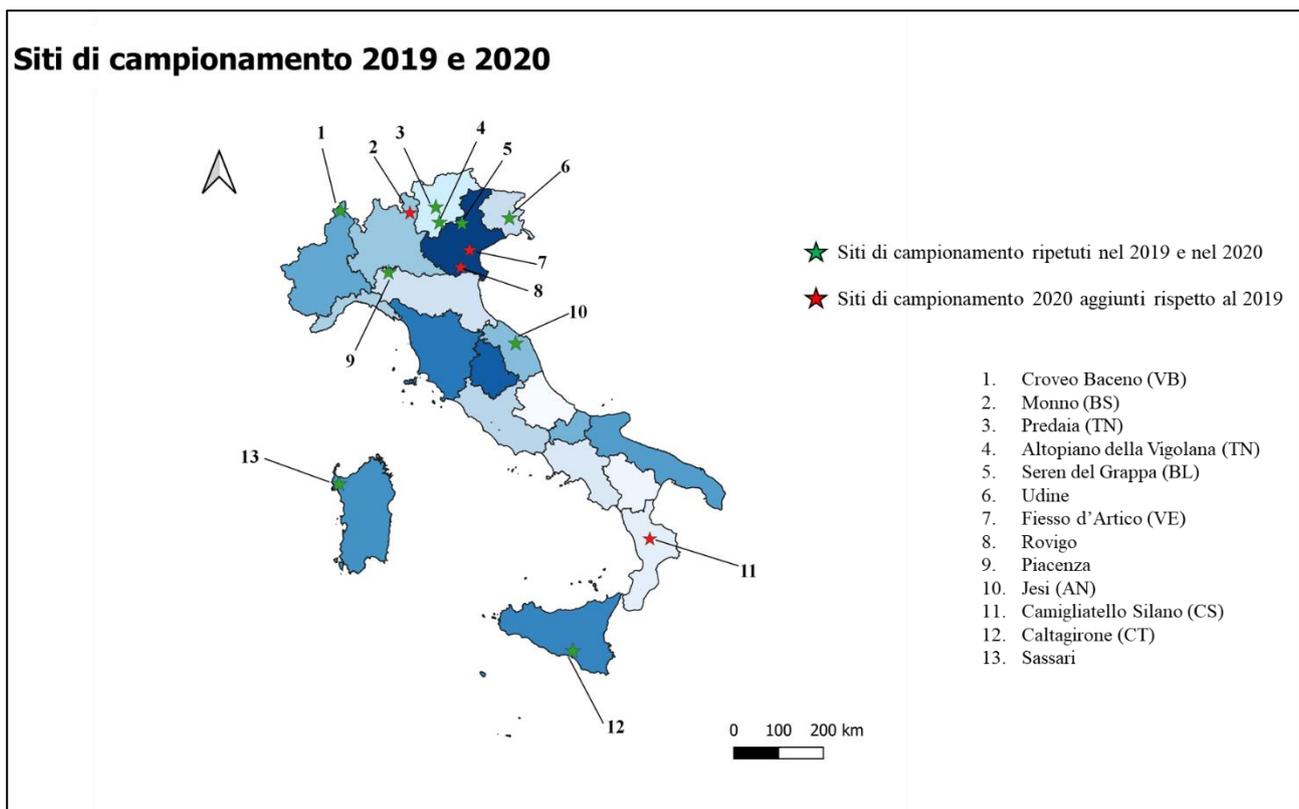


Figura 14: Mappa che riporta i siti campionati nel 2019 e nel 2020.

### 3.2 Breve inquadramento pedologico dell'area di studio

L'area di campionamento, come riportato nel precedente paragrafo, è localizzata in dieci regioni italiane, quali Piemonte, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Marche, Calabria, Sardegna e Sicilia.

In questo paragrafo verranno descritte brevemente le tipologie di suoli presenti nelle aree di campionamento, dalle quali si possono estrarre informazioni che potranno essere utilizzate nel proseguo della tesi per meglio comprendere e spiegare eventuali comportamenti o concentrazioni di alcuni elementi.

Per la descrizione viene presa come riferimento la Carta dei Suoli d'Italia in scala 1:1.000.000 (Figura 15, [https://esdac.jrc.ec.europa.eu/images/Eudasm/IT/2012Carta\\_Suoli\\_Italia.jpg](https://esdac.jrc.ec.europa.eu/images/Eudasm/IT/2012Carta_Suoli_Italia.jpg)) pubblicata dal Consiglio per ricerca e la sperimentazione in agricoltura e dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Costantini *et al.*, 2012), che riporta la tipologia dei suoli e la loro classificazione secondo il *World Reference Base*.



I siti di campionamento localizzati nella parte nord dell'Italia, quali Croveo-Baceno (Piemonte), Monno (Lombardia), Predaia e Altopiano della Vigolana (Trentino-Alto Adige), Borgo Valbelluna e Seren del Grappa (Veneto), Tolmezzo, Verzegnis, Campofornido e Gemona del Friuli (Friuli-Venezia Giulia) rientrano tutti nella regione pedologica di tipo A – Suoli delle Alpi e Prealpi (colorazione sui toni del viola), in cui i gruppi tassonomici più frequenti sono i *Cambisols*, *Leptosols*, *Phaeozem*, *Luvisol* e *Podzol*. Queste aree sono contraddistinte da un substrato roccioso metamorfico (soprattutto per Croveo Baceno, Monno e Predaia) e sedimentario di tipo carbonatico. I siti di Piacenza e Jolanda di Savoia (Emilia-Romagna), Fiesso d'Artico e Rovigo (basso Veneto) e Udine, fanno invece parte della regione D – Suoli della pianura Padana e colline associate, caratterizzata da gruppi quali *Cambisols*, *Calcisols*, *Luvisols*, *Vertisols* e *Fluvisols* e il substrato è composto prevalentemente da rocce sedimentarie di tipo carbonatico. Nella zona di Piacenza sono presenti depositi alluvionali, mentre le zone ferrarese e rovigotta presentano depositi deltizi e litorali. Il campione di Jesi, nelle Marche, rientra nella regione pedologica di tipo G – Suoli delle colline del centro e sud Italia su sedimenti marini neogenici e su calcari, contraddistinta da *Cambisol*, *Regosol*, *Calcisol*, *Phaeozem* e *Luvisol*. Tali suoli sono caratterizzati dalla presenza di depositi continentali quaternari di natura calcarea.

Scendendo verso sud, il sito di Camigliatello Silano, in Calabria, fa parte della regione E – Suoli degli Appennini centrale e meridionali, di cui fanno parte i gruppi tassonomici del *Cambisol*, *Regosol*, *Calcisol*, *Luvisol* e *Umbrisol*. L'area di Camigliatello è caratterizzata dalla presenza di rocce metamorfiche appartenenti all'unità della Sila.

Passando ai campioni delle isole, Sassari (Sardegna, zona Nurra) rientra anch'esso nella regione pedologica G – Suoli delle colline del centro e sud Italia su sedimenti marini neogenici e su calcari, come per Jesi. In questo caso l'area è contraddistinta dalla formazione di Mores (calcareniti e calciruditi algali). Il sito di Caltagirone, infine, fa parte della regione pedologica I – Suoli delle colline e dei terrazzi marini del sud Italia su sedimenti calcarei (*Luvisol*, *Cambisol*, *Regosol*, *Phaeozem* e *Vertisol*) e nello specifico è caratterizzata da un substrato composto da sabbie e argille marine.

### 3.3 Metodologie di analisi impiegate

Tutte le fasi di preparazione dei campioni della pianta di canapa e del suolo sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica (DAIS) dell'Università Cà Foscari di Venezia. La preparativa e la analisi degli elementi in traccia (TEs) e delle terre rare (REEs) delle parti della pianta di canapa (radice, stelo, infiorescenze, semi), del suolo e dell'olio sono state condotte presso i laboratori del DAIS e del CNR – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze Polari (ISP) di Venezia.

I rapporti isotopici  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  delle parti della pianta di canapa (radice, stelo, infiorescenze, semi), del suolo e dell'olio di canapa sono stati determinati presso il Dipartimento di Qualità Alimentare e Nutrizione della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (TN).

Il rapporto isotopico dello stronzio  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  della canapa (radice, stelo, infiorescenze, semi) e del suolo è stato determinato al Jožef Stefan Institute di Lubiana, nel Dipartimento di Scienze Ambientali. Per questo dottorato di ricerca la tecnica analitica che è stata utilizzata per le analisi degli isotopi stabili degli elementi leggeri (C, N, S, H, O), dello stronzio e degli TEs e delle REEs, è la spettrometria di massa.

Di seguito, verranno descritte nel dettaglio le fasi di preparazione, di pre-trattamento e di analisi dei campioni.

#### 3.3.1 Preparazione e Pre-trattamenti

Tutti i campioni, olio a parte, sono stati sottoposti allo stesso processo di preparazione, così da uniformare il metodo e ottimizzare i tempi processamento relativi a questa fase.



*Figura 16: Foto del liofilizzatore impiegato.*

I campioni, infatti, dopo il processo di congelamento, sono stati sottoposti a liofilizzazione ad una temperatura di  $-40^{\circ}\text{C}$  e 0,5mbar per 48 ore con il liofilizzatore Modulyo® (Edwards Ltd., <sup>TM</sup>Crawley, UK) per eliminare tutto il contenuto d'acqua in modo tale da evitare processi di frazionamento indesiderati a discapito delle analisi isotopiche. Inoltre, questo ha poi permesso di conservare i campioni in laboratorio a temperatura ambiente. Successivamente, i campioni sono stati inseriti nuovamente nei sacchetti di polietilene o in boccette Falcon®, a seconda dell'ingombro del campione.



*Figura 17: Esempio di campioni di infiorescenza liofilizzata e inserita in boccette Falcon® da 50ml.*

Una volta liofilizzati, i campioni sono stati sottoposti a macinatura tramite un mulino MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany) equipaggiato con giare e sfere in politetrafluoroetilene (PTFE). Il PTFE è stato scelto per evitare contaminazioni per le analisi degli elementi in traccia e delle terre rare. Il mulino è stato settato ad una oscillazione di  $28\text{ s}^{-1}$ , mentre il tempo di macinatura è stato variato in funzione della matrice: 22 minuti per le radici (più legnose), 15 minuti per lo stelo e 10 minuti per le infiorescenze e per i semi. Da tenere in considerazione che, a causa della tenacità delle radici e della grande resistenza delle fibre presenti nello stelo, queste due matrici sono state sminuzzate con un coltello in ceramica prima della macinatura.



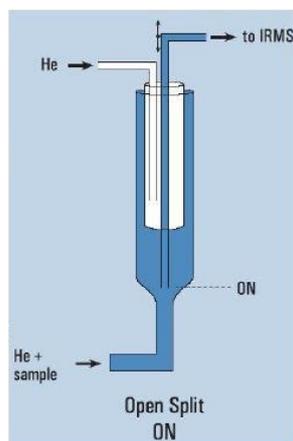
*Figura 18: Mulino MM 400 con giare in PTFE.*

Prima e dopo ogni singolo processo di macinatura, le giare e le sfere in PTFE sono state attentamente lavate con acqua ultra-pura (18,2 M $\Omega$  cm di resistività a 25°C), con una soluzione di acido cloridrico (HCl) al 2% (v/v) (Ultra purity Acids-UpA™, Romil Ltd., Cambridge, UK), nuovamente risciacquate con acqua ultra-pura ed infine lasciate ad asciugare sotto cappa a flusso laminare per una notte. La polvere omogenea ottenuta è stata poi trasferita in boccette Falcon® da 50 mL. Ogni singolo campione è stato suddiviso in aliquote in base alla tipologia di analisi a cui sarebbe stato sottoposto, ovvero tre: (1) analisi isotopica di C, N, S, H, O, (2) analisi isotopica dello Sr, (3) analisi degli elementi in traccia e delle terre rare.

Nei prossimi paragrafi verranno trattate nel dettaglio le tre tipologie di analisi e i processi ai quali i campioni sono stati sottoposti.

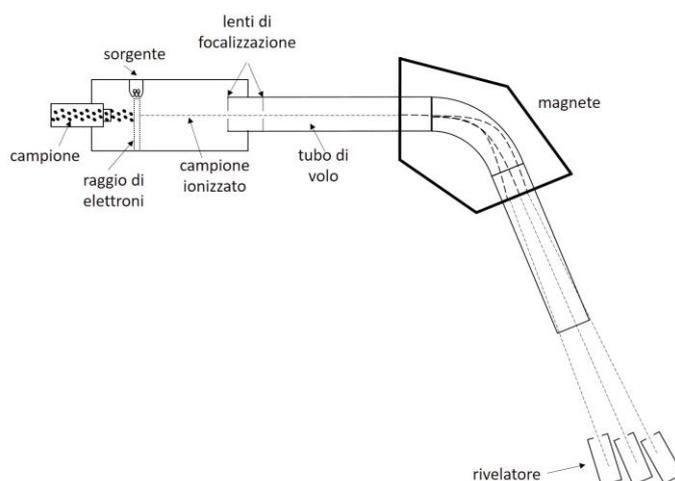
### **3.3.2 Analisi isotopiche di C, N, S, H e O**

I rapporti isotopici  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  sono stati determinati grazie alla tecnica della spettrometria di massa IRMS (*Isotope Ratio Mass Spectrometry*), presso il Dipartimento di Qualità Alimentare e Nutrizione della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (TN). Tale tecnica misura i rapporti isotopici di un gas campione, “sample” e di un gas di riferimento, “reference”, basandosi sulla separazione degli ioni e delle molecole in funzione del rapporto massa/carica (Sharp, 2017). Nello specifico, per queste analisi è stato impiegato uno spettrometro con sistema a flusso continuo, dove il campione viene trasportato per mezzo di un “carrier gas”, o gas di trasporto (He o Ar), purificato attraverso un gas-cromatografo ed introdotto nella sorgente.



**Figura 19:** Schema della periferica impiegata dallo spettrometro a flusso continuo (Sharp, 2017).

A seconda del tipo di elementi da analizzare, lo spettrometro può essere collegato a delle periferiche, quali piroizzatore, analizzatore elementare e *gas bench* (analisi isotopica di carbonati e acque). Per prima cosa il campione, una volta convertito in forma gassosa, entra nella regione della sorgente, dove viene ionizzato grazie all’impatto di un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno, accelerato da un campo elettrico e focalizzato (da delle lenti con potenziale elettrico crescente) in un fascio e accelerato lungo il “tubo di volo” (Figura 20). Il fascio di ioni subisce poi l’influenza di un campo magnetico in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ ) dello ione: gli ioni più leggeri (o le molecole isotopologiche più leggere) subiranno un raggio di curvatura più piccolo (verranno deviate di più), mentre quelle più pesanti un raggio maggiore (verranno deviate di meno). Gli ioni andranno ad impattare su di un collettore specifico (*Faraday cup*) e la corrente raccolta verrà trasmessa attraverso i resistori per produrre le tensioni che verranno amplificate e misurate.



**Figura 20:** Schema esemplificato di uno spettrometro di massa IRMS (Scandellari & Penna, 2017).

L'intensità della corrente che arriva ai collettori è proporzionale all'abbondanza della molecola isotopologica. La stessa misura verrà effettuata sul gas di riferimento (*carrier*) e la differenza in parti per mille del rapporto isotopico del campione rispetto a quello dello standard, produrrà un valore "delta" (come descritto nel [capitolo 2.1.](#)).

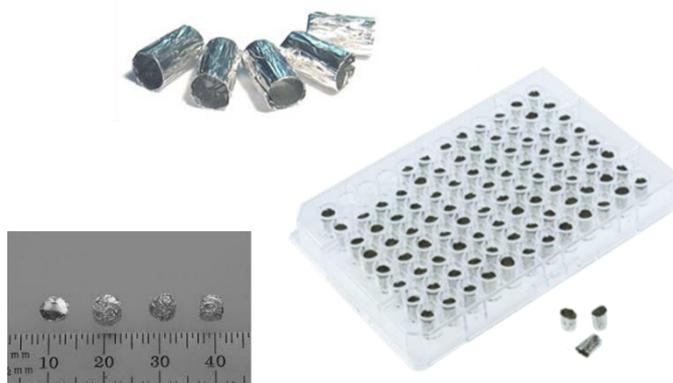
### Analisi di $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{34}\text{S}$

Per l'analisi dei rapporti isotopici di C, N, S è stato impiegato un EA-IRMS (*Elemental Analyzer* VARIO CUBE, Elementar Analysensysteme GmbH, Germany) accoppiato con un IRMS (Isoprime, Isoprime Ltd., UK).



**Figura 21:** EA-IRMS impiegato per le analisi  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{34}\text{S}$ .

Per questa analisi sono stati pesati 2,5mg di campione polverizzato (in triplo) di canapa (in tutte le sue parti) e suolo in capsule di stagno, richiuse su sé stesse per evitare fuoriuscite del campione, caricate sullo strumento e bruciate nella fornace in ambiente ossidante a temperature elevate (oltre i 1700 °C) per convertire il campione dallo stato solido a gassoso. I gas che sono stati analizzati sono: CO<sub>2</sub> per il carbonio, N<sub>2</sub> per l'azoto e SO<sub>2</sub> per lo zolfo ([Carter & Chesson, 2017](#)).



**Figura 22:** Esempio di capsule utilizzate per le analisi isotopiche. In basso a sinistra si può osservare come esse vengano richiuse prima di essere disposte nel rack.

I valori isotopici di  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , e  $\delta^{34}\text{S}$  sono stati calcolati contro uno standard interno precedentemente calibrati contro gli standard internazionale IAEA (*International Atomic Energy Agency*, Vienna, Austria) V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) per il carbonio, AIR (Air nitrogen) per l'azoto e V-CDT (Vienna-Canyon Diablo Troilite) per lo zolfo. In [Tabella 1](#) vengono riportati tutti gli standard interni e IAEA impiegati per queste analisi, con relativi valori e deviazioni standard.

*Tabella 1: Materiali di riferimento interno impiegati con rispettivi valori dei rapporti isotopici e deviazione standard.*

Sigla	Materiale di riferimento interno	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{34}\text{S}$
/	saccarosio	$-10,449 \pm 0,033\text{‰}$		
NIST NBS22	lubricating oil	$-30,03 \pm 0,09\text{‰}$		
USGS40	Acido L-glutammico	$-26,39 \pm 0,04\text{‰}$	$-4,52 \pm 0,06\text{‰}$	
IAEA-NO-3	Nitrato di potassio		$+4,7 \pm 0,2\text{‰}$	
IAEA-SO-5	Solfato di bario			$+0,5 \pm 0,2\text{‰}$
NIST NBS127	Solfato di bario			$+21,17 \pm 0,09\text{‰}$
USGS42	Capelli umani tibetani			$+7,84 \pm 0,25\text{‰}$
USGS43	Capelli umani indiani			$+10,46 \pm 0,22\text{‰}$

I risultati sono stati espressi in ‰ secondo la formula riportata nel [Capitolo 2.1](#). e le incertezze sulle misure ( $\pm 1\sigma$ ) per  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{34}\text{S}$  sono 0,1, 0,2 e 0,3 rispettivamente.

### Analisi di $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$

I rapporti isotopici di idrogeno e ossigeno sono stati determinati nei campioni di canapa (in tutte le sue parti), di suolo e di olio (quest'ultimo in bulk).



*Figura 23: TC/EA-IRMS utilizzato nelle analisi dei rapporti isotopici di idrogeno e ossigeno.*

In questo caso sono stati pesati circa  $0,25 \pm 0,05$  mg di campione (in doppio) in capsule di argento e introdotte nel TC/EA-IRMS (*Thermal Conversion/Elemental Analyser*, Finnigan TM TC/EA, Thermo Finnigan, Bremen, Germany). Qui il campione, a monte dell'analizzatore elementare, subisce un processo di pirolisi tra 1300 °C e 1450 °C, che lo converte in forma gassosa: l'idrogeno in H<sub>2</sub> e l'ossigeno in CO. I valori isotopici di  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  sono stati calcolati contro un “*in-house working standards*” a sua volta calibrato contro lo standard internazionale IAEA (*International Atomic Energy Agency*, Vienna, Austria). In [Tabella 2](#) vengono riportati tutti gli standard interni con i rispettivi valori impiegati per queste analisi.

**Tabella 2:** Materiali di riferimento interno impiegati con rispettivi valori dei rapporti isotopici e deviazione standard.

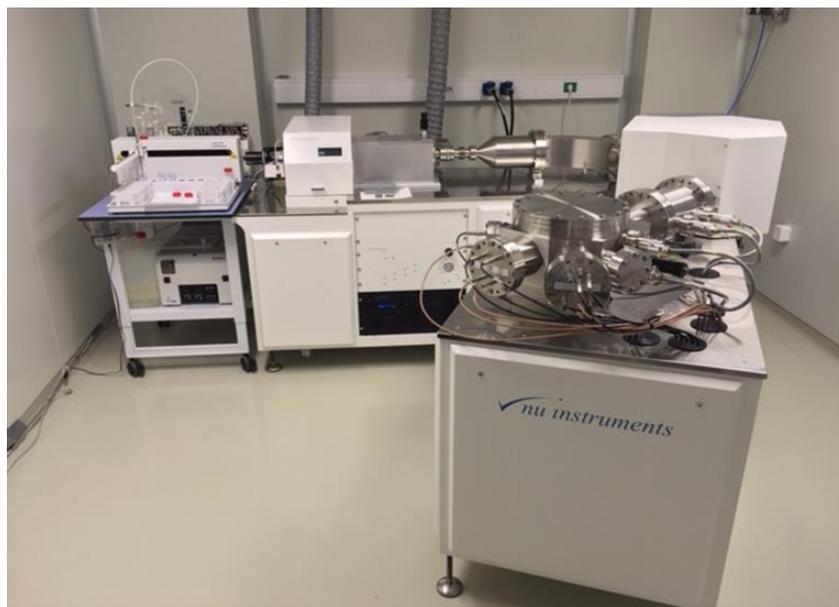
Sigla	Materiale di riferimento interno	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
USGS54	Canadian lodgepole pine	$-150,4 \pm 1,1\text{‰}$	$+17,79 \pm 0,15\text{‰}$
USGS56	South African red ivorywood	$-44,0 \pm 1,8\text{‰}$	$+27,23 \pm 0,03\text{‰}$

I risultati sono riportati rispetto allo standard internazionale V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water) espressi in ‰ secondo la formula riportata nel [Capitolo 2.1](#). e le incertezze sulle misure ( $\pm 1\sigma$ ) sono rispettivamente 0,3 e 1‰.

I rapporti isotopici di  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  sono stati sui campioni raccolti nelle tre campagne, ovvero 2018, 2019 e 2020. Sono per i campioni del 2020, sono stati considerati anche i suoli.

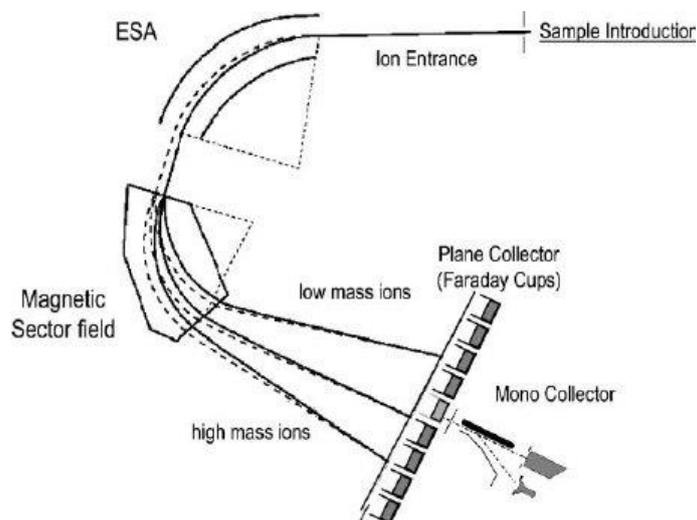
### 3.3.3 Analisi isotopiche dello Sr ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ )

I rapporti isotopici dello  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  sono stati definiti grazie all'impiego della tecnica MC-ICP-MS (*Multi Collector-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Ambientali del Jožef Stefan Institute di Lubiana (Slovenia). Le analisi sono state eseguite tramite un multi-collettore accoppiato induttivamente ad uno spettrometro di massa Nu plasma II (Nu Instruments Ltd., Wrexham, United Kingdom, [Figura 24](#)) sulle varie parti della canapa (dalle radici ai semi) e su alcuni campioni di suolo, tutti raccolti nella campagna 2020.



*Figura 24: Foto dell'MC-ICP-MS impiegato al Jožef Stefan Institute di Lubiana.*

La tecnica MC-ICP-MS abbina l'elevata efficienza di ionizzazione dell'ICP all'elevata precisione di analisi della spettrometria di massa ed è indicata per studiare i rapporti isotopici degli elementi pesanti, come Pb e Sr (Walczyk, 2004). I processi di assorbimento e di successiva ionizzazione degli elementi ad opera del plasma (come riportato nel [Capitolo 2.3](#)), permettono la correzione dei processi di frazionamento attraverso il confronto con gli standard. Gli ioni prodotti vengono dunque sottoposti ad un campo magnetico il quale, in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ ), ne definisce la traiettoria specifica con cui colliderà su di un rivelatore: gli ioni più leggeri (o le molecole isotopologiche più leggere) subiranno un raggio di curvatura più piccolo, mentre quelle più pesanti un raggio maggiore ([Figura 25](#)).



*Figura 25: Schema di un MC-ICP-MS (Moldovan, 2004).*

Il sistema di rilevazione, equipaggiato con un multi-collettore (*Faraday cup*), permette la misura simultanea di più fasci di ioni così da evitare qualsiasi variazione di segnale che andrebbe a influenzare gli isotopi durante la stessa analisi e, di conseguenza, esercitare effetti negativi sulla precisione della misura. Infine, il sistema di rivelazione va a convertire lo ione in un segnale elettrico, la cui intensità è correlata alla concentrazione del singolo ione.

A seguire, verranno trattate nello specifico le metodiche di preparazione per determinazione dei rapporti isotopici dello  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  nella canapa e nel suolo.

### **Determinazione dei rapporti isotopici dello $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ nella canapa**

Circa 0,5 g di campione di canapa (radici, semi e/o steli), precedentemente liofilizzati e macinati (vedi [Paragrafo 3.3.1](#)), sono stati pesati in un tubo di teflon (PTFE). Successivamente, sono stati aggiunti 5 mL di  $\text{HNO}_3$  concentrato, 1 mL di  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 0,1 mL di HF concentrato. I tubi sono stati chiusi e sottoposti a digestione a microonde. Un'aliquota del campione digerito è stata evaporata a secco e i residui sono stati nuovamente disciolti in 1 mL 8 M di  $\text{HNO}_3$ . 1 mL di soluzione è stato caricato su colonne preconfezionate con resina specifica Eichrom da 2 mL Sr (SR-B50- S, Triskem International, Francia). La resina è stata pre-pulita con 6 M HCl e 8 M di  $\text{HNO}_3$ . A seguire, lo Sr è stato eluito dalla resina specifica Sr con 10 mL di acqua MilliQ (Merck-Millipore Watertown, MA, USA). La concentrazione finale di Sr nei campioni era compresa tra 30 - 50 ng mL<sup>-1</sup>. Il rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  è stato determinato grazie al plasma di Nu II (Nu Instruments Ltd., Wrexham, Regno Unito). I campioni sono stati introdotti nel plasma dal sistema di nebulizzazione e desolvatazione Aridus II (Teledyne Cetac, Omaha, Nebraska, USA) e la discriminazione di massa è stata corretta dalla normalizzazione interna al rapporto  $^{86}\text{Sr}/^{88}\text{Sr}$  di 0,1194. La correzione per le interferenze di Rb e Kr è stata eseguita utilizzando i rapporti  $^{87}\text{Rb}/^{85}\text{Rb}$  e  $^{86}\text{Kr}/^{83}\text{Kr}$ , rispettivamente di 0,38567 e 1,50566. ([Zuliani et al., 2020](#)). Per l'ottimizzazione delle misure è stato utilizzato il materiale certificato NIST SRM 987  $\text{SrCO}_3$  (0,71034 0,00026, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) ([Allegato 1](#)).

Le condizioni operative dell'MC-ICP-MS e dell'ICP-MS, quest'ultimo impiegato per la determinazione dell'esatta concentrazione di Rb e Sr nei campioni, necessaria al fine di definire il rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ , sono di seguito riportate ([Tabella 3](#)):

**Tabella 3:** Condizioni operative dell'MC-ICP-MS e dell'ICP-MS.

<b>MC-ICP-MS</b>	
RF power	1300 W
Plasma gas flow	13 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas flow	0.80 L min <sup>-1</sup>
Nebuliser gas pressure	38 psi
Sampler cone	Ni, aperture diameter 0.9 mm
Skimmer cone	Ni, aperture diameter 0.7 mm
Integration time	10 s
Number of cycles	30
Number of blocks	2
Mass assignment to Faraday cup detectors	H5 88 H3 87 H1 86 L1 85 L3 84 L5 83
<b>ICP-MS</b>	
Nebulizer	Micromist
Spray chamber	Scott double-pass
RF Power	1550 W
Plasma gas flow	15 L min <sup>-1</sup>
Carrier gas	1.05 L min <sup>-1</sup>
Makeup gas	0.15 L min <sup>-1</sup>
Sampling depth	7.5 mm
Sample uptake rate	0.3 mL min <sup>-1</sup>
Sampling and skimmer cones	Nickel
Cell gas (flow rate) / Elements	He Mode (4.3 mL He min <sup>-1</sup> ): <sup>88</sup> Sr, <sup>85</sup> Rb
Internal standard	<sup>103</sup> Rh

### **Determinazione dei rapporti isotopici dello <sup>87</sup>Sr/<sup>86</sup>Sr nel suolo**

Per quanto riguarda il suolo, sono stati pesati circa 2 g campione liofilizzato (preparati secondo quanto riportato nel [Paragrafo 3.3.1](#)) in tubi di polietilene (PE) da 30 mL e sono stati aggiunti 5 mL di 1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. I campioni sono stati agitati tramite agitatore ellittico per 2 ore, centrifugati per 5 minuti a 4000 giri al minuto e filtrati utilizzando una siringa con filtro a membrana di teflon da 0,45 µm. Il filtrato è stato stabilizzato aggiungendo 50 µL di 14 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Un'aliquota del campione è stata evaporata a secco. Il residuo solido è stato disciolto in 1 mL di 8 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> e caricato su colonne riempite di Sr-resina (Eichrom, SR-B50-S, Triskem International, Francia) per l'isolamento dello stronzio dalla matrice ([Zuliani et al., 2020](#)).

Infine, il rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  del campione è stato determinato per mezzo dell'ICP-MS. Per lo stronzio, sono stati analizzati i soli campioni raccolti nella campagna del 2020, dove sono state considerate le varie parti della pianta di canapa (radice, stelo, infiorescenze, semi) e il suolo.

### 3.3.4 Analisi degli elementi in traccia e delle terre rare

Le analisi degli elementi in traccia e delle terre rare sono state svolte presso i laboratori del DAIS dell'Università Cà Foscari di Venezia e del CNR-ISP di Venezia grazie alla tecnica della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*).



*Figura 26: ICP-MS con autocampionatore impiegato per la determinazione degli elementi in traccia e delle terre rare.*

All'interno dell'ICP-MS il campione liquido, generalmente ottenuto tramite digestione acida umida, viene inviato alla camera di nebulizzazione dove viene trasformato in aerosol. Successivamente viene eseguita una selezione nella camera dell'aerosol in funzione della geometria della camera.

L'aerosol così formato viene trasportato mediante gas argon alla sorgente di ioni dove, grazie ad una torcia al plasma di argon che opera ad elevata temperatura (circa 10.000 °C), avviene la sua evaporazione, atomizzazione e la ionizzazione (Telloli *et al.*, 2019). Gli ioni positivi prodotti si muovono dal plasma (pressione atmosferica) all'analizzatore di massa (alto vuoto), dove vengono sottoposti ad un campo magnetico che, in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ), ne definisce la traiettoria specifica con cui collideranno su di un rivelatore (come descritto nel [Paragrafo 3.3.2](#)).

Infine, il sistema di rilevazione converte lo ione in un segnale elettrico, la cui intensità è correlata alla concentrazione del singolo ione.

Di seguito si riportano le fasi di digestione a cui i campioni di canapa e di suolo sono stati sottoposti prima di essere analizzati con ICP-MS. Per le analisi degli elementi in traccia e per le terre rare, sono state impiegate le stesse metodiche.

### **Digestione acida umida dei campioni di canapa**

Aliquote di circa 0,1 g di campione in polvere (trattato secondo quanto riportato nel [Paragrafo 3.3.1](#)) sono state pesate in recipienti cilindrici di politetrafluoroetilene di seconda generazione (TFM), ([Figura 27](#)) e mineralizzate mediante digestione acida umida con 7 mL di HNO<sub>3</sub> e 3 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1500 W in un microonde Ethos 1 Advanced Microwave Digesting 98 Labstation (high-pressure and high-temperature rotor, Milestone S.r.l., Bergamo, Italy) ([Figura 27](#)).



*Figura 27: Recipienti cilindrici in PTFE (a sinistra) e microonde Ethos 1 (a destra) impiegati per la digestione acida dei campioni.*

Per ogni lotto di digestione a microonde, sono stati preparati un bianco procedurale, un materiale certificato e otto campioni utilizzando le stesse aliquote di acido nitrico concentrato e perossido di idrogeno. Il programma di temperatura impiegato per la digestione viene riportato nella [Tabella 4](#).

Una volta che le *vessels* si sono completamente raffreddate, i campioni, i bianchi e i materiali certificati sono stati recuperati dalle *vessels* e successivamente diluiti 1 a 50 prima dell'analisi, utilizzando acqua ultra-pura (Elga LabWater). Le aliquote diluite sono state analizzate grazie ad uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo accoppiato induttivamente (ICP104 MS) con un iCAP™ RQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), equipaggiato con un autocampionatore ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies Ltd., Omaha, NE, USA).

**Tabella 4:** Rampa di temperatura impiegata per la digestione al microonde.

Step	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	10	100
2	5	100
3	5	120
4	5	120
5	5	140
6	5	140
7	5	160
8	5	160
9	5	180
10	10	180

La quantificazione degli elementi in traccia (TEs) e delle terre rare (REEs) è stata eseguita tramite calibrazione esterna, mentre il rodio (Rh) è stato utilizzato come standard interno per verificare eventuali effetti della matrice e verificare la presenza di interferenze. Per gli elementi in traccia., il controllo della bontà del metodo analitico è stato effettuato utilizzando il materiale di riferimento SRM 1515: Apple Leaves (NIST – *National Institute of Standards and Technology*), di cui si riporta la scheda ([Allegato 2](#)).

Per quanto concerne, invece, le terre rare, il materiale di riferimento SRM 1515: Apple Leaves, non è certificato, ma riporta valori indicativi ([Allegato 2](#)) ed è stato trattato come un campione per valutarne la ripetibilità.

Elementi in traccia e terre rare sono state determinate nei campioni di canapa raccolti nelle campagne 2018, 2019 e 2020 e sono state analizzate in replicato.

### **Digestione dei campioni di suolo**

Aliquote di circa 0,3 g di campione in polvere (trattato secondo quanto riportato nel [Paragrafo 3.3.1](#)) sono state pesate in recipienti cilindrici politetrafluoroetilene di seconda generazione (TFM), ([Figura 25](#)) e mineralizzate mediante digestione acida umida con 9 mL di HNO<sub>3</sub>, 2 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2mL di HF a 1500 W in un microonde Ethos 1 Advanced Microwave Digesting 98 Labstation (high-pressure and high-temperature rotor, Milestone S.r.l., Bergamo, Italy) ([Figura 27](#)). I bianchi procedurali sono stati preparati e digeriti nello stesso modo dei campioni. I campioni e i bianchi sono stati recuperati dalle *vessels* dopo la digestione e diluiti prima dell'analisi, utilizzando acqua ultra-pura. Le aliquote diluite sono state analizzate con lo spettrometro di massa a singolo quadrupolo accoppiato induttivamente (ICP104 MS) con un iCAP™ RQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA),

equipaggiato con un autocampionatore ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies Ltd., Omaha, NE, USA). Il programma di temperatura impiegato per la digestione viene riportato nella [Tabella 5](#).

*Tabella 5: Rampa di temperatura impiegata per la digestione al microonde dei suoli.*

Step	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	10	150
2	5	15
3	10	180
4	5	180
5	10	200
6	60	200

La quantificazione degli elementi in traccia (TEs) e delle terre rare (REEs) (vedi [Tabella 6](#) per il dettaglio degli elementi analizzati) è stata eseguita tramite calibrazione esterna, mentre il rodio (Rh) è stato utilizzato come standard interno per verificare eventuali effetti della matrice e verificare la presenza di interferenze.

*Tabella 6: Elementi in traccia e terre rare analizzate.*

Elementi in traccia	Cr	Ni	Ni	Cu	Zn	Sr
Terre rare	<b>LREE</b>					
	La	Ce	Pr	Nd	Sm	
	<b>MREE</b>					
	Y	Eu	Gd	Tb	Dy	
	<b>HREE</b>					
	Sc	Ho	Er	Tm	Yb	Lu

Le analisi sono state effettuate in replicato ed i campioni di suolo sono stati forniti solo per il 2020.

### Elaborazioni dati terre rare

Per quanto concerne l'elaborazione delle terre rare, per eliminare il cosiddetto andamento "a dente di sega" dato dall'effetto Oddo-Harkins, le concentrazioni misurate sono state normalizzate per ogni elemento secondo l'European Archean Shale (EAS; [Bau et al., 2018, Tabella 7](#)) tranne che per lo Sc, che è stato normalizzato secondo lo scisto australiano (Post Australian Archean Shale) (PAAS; [Taylor e McLennan, 1985: Tabella 7](#), valore evidenziato in azzurro).

**Tabella 7:** Valori impiegati per la normalizzazione delle terre rare.

Elemento	Valore	Elemento	Valore
La	44.30	Tb	0.90
Ce	88.30	Dy	5.66
Pr	9.54	Ho	1.09
Nd	36.60	Er	3.30
Sm	6.63	Tm	0.48
Eu	1.31	Yb	3.12
Gd	5.86	Lu	0.47
Y	28.70	Sc	15.89

Una deviazione dalla tendenza “regolare” può indicare un possibile arricchimento antropogenico nelle singole terre rare (Picone *et al.*, 2022). Sono state inoltre calcolate le anomalie del cerio ( $\partial Ce$ ) secondo Loader *et al.* (2017):

$$\partial Ce = \frac{Ce_N}{\frac{Nd_N^2}{Sm_N}}$$

E dell'eurobio ( $\partial Eu$ ), secondo McLennan (1989):

$$\partial Eu = \frac{Eu_N}{\sqrt{Gd_N * Sm_N}}$$

Possibili anomalie positive (valori > 1) indicano un arricchimento dell'elemento rispetto ad altre REEs, mentre anomalie negative (valori < 1) indicano una diminuzione dell'elemento rispetto alle altre REEs (MacMillan *et al.*, 2017).

### 3.4 Analisi statistiche

Allo scopo di valutare possibili tendenze e correlazioni tra le variabili chimiche acquisite, le aree di campionamento e le varietà di canapa considerate in questa tesi di dottorato, test statistici non parametrici sono stati eseguiti su tutte le popolazioni, raggruppate per classi, composte da più di due campioni. Tramite *software* Microsoft Excel è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman (R), che permette di valutare la forza e la direzione della relazione presente tra due variabili osservate. Inizialmente è stato attribuito un rango a tutte le osservazioni sulla base della loro grandezza, attribuendo il rango 1 all'osservazione più piccola, mentre alle altre variabili è stato assegnato un valore crescente. Successivamente, è stato calcolato il coefficiente R, il cui valore è compreso tra +1 (correlazione direttamente proporzionale e perfetta) e -1 (correlazione indirettamente proporzionale e perfetta). Previa questo primo passaggio, è stato possibile procedere con altri test statistici, sempre all'interno del foglio di calcolo di Microsoft Excel. Il test per ranghi di Kruskal-Wallis è stato impiegato per la comparazione multipla delle mediane dei diversi gruppi di variabili considerate (in alcuni casi su un set di dati a numerosità ridotta), mentre il test di Wilcoxon è stato utilizzato per la comparazione a coppie. Entrambi i test sono stati impiegati per comprendere se le mediane prese in considerazione fossero statisticamente diverse fra di loro. Tutti i test non parametrici effettuati hanno evidenziato differenze statisticamente significative ( $p\text{ value} < 0,05$ ) tra le popolazioni di campioni considerate e correlazione tra le variabili.

L'esplorazione dei dati chimici ottenuti mediante tecniche di analisi multivariata è stata condotta utilizzando la *routine* CAT (*Chemometric Agile Tool*) per il *software* R (*R Foundation for Statistical Computing*; [R Core Team, 2014](#)) sviluppata dal Gruppo di Chemiometria della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana, in collaborazione con l'Università di Genova. In particolare, l'Analisi delle Componenti Principali (PCA – *Principal Component Analysis*) è stata eseguita sfruttando l'algoritmo NIPALS (*Non-linear Iterative Partial Least Squares*) per verificare la presenza di similarità tra i dati sperimentali e valutare la possibile relazione tra composizione chimica, area geografica di crescita del campione e regime di coltivazione. Prima di applicare la PCA, in ogni matrice di dati considerata è stata valutata la distribuzione delle variabili. Campioni e variabili con un numero consistente di "buchi di matrice" sono stati eliminati mentre, laddove il numero di dati mancanti risultava inferiore al 25%, essi sono stati ricalcolati mediante algoritmo NIPALS sfruttando la matrice dei *loadings* per quella specifica classe. La presenza di *outliers* è stata valutata mediante le statistiche  $T^2$  e Q di Hotelling.

Per tutte le analisi statistiche effettuate, le concentrazioni inferiori al limite di quantificazione (LOQ – *Limit Of Quantification*) sono state sostituite dalla metà del valore del limite di rivelabilità (LOD – *Limit Of Detection*).

## 4. Risultati e discussione

Il capitolo “Risultati e discussione” è organizzato nel modo seguente: nel [Paragrafo 4.1](#) si riportano tutti i risultati ottenuti dall’analisi della composizione isotopica degli elementi H, C, N, O e S effettuati sui campioni di *Cannabis sativa* raccolti nel 2018, 2019 e 2020. Nel [Paragrafo 4.1.5](#) si riporta una sintesi del manoscritto pubblicato sulla rivista *Separations*, all’interno dello *Special Issue "Advances in the Analysis of Food Constituents, Residues, and Contaminants"*, che riguarda i risultati e le interpretazioni relative ai soli campioni 2018 e 2019. Questo manoscritto permette di effettuare un primo inquadramento delle caratteristiche isotopiche della canapa sul territorio italiano. La versione integrale dell’articolo è stata inserita nella sezione Allegati della tesi ([Allegato 3](#)). Il [Paragrafo 4.1.6](#) riporta i risultati ottenuti dall’analisi dei rapporti isotopici dello stronzio sui campioni del 2020. Il [Paragrafo 4.2](#) riporta tutti i risultati ottenuti dall’analisi chimica degli elementi in tracce e delle terre rare dei campioni raccolti durante le campagne 2018, 2019 e 2020, mentre il [Paragrafo 4.2.4](#) riporta una sintesi del manoscritto sottomesso alla rivista *Environmental Science and Pollution Research*, attualmente in revisione, che riguarda i modelli di distribuzione degli elementi delle terre rare nei soli campioni 2018. La versione integrale dell’articolo è stata inserita nella sezione Allegati ([Allegato 4](#)). Infine, il [Paragrafo 4.3](#) riporta i risultati ottenuti dall’applicazione dell’analisi delle componenti principali sull’intero data set ottenuto in questa tesi.

### 4.1 Isotopi stabili di C, N, S, H e O

I rapporti isotopici  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  sono stati determinati sulle varie parti della canapa, dalle radici ai semi all’olio, utilizzando campioni raccolti nelle campagne 2018, 2019 e 2020 (vedi [Figure 13 e 14](#)) per definire gli intervalli di variazione della *Cannabis sativa* coltivata in Italia.

Ad oggi, nessuna ricerca si è focalizzata sullo studio dei rapporti isotopici della canapa industriale italiana e nella [Tabella 8](#) e nella [Tabella 9](#) si riportano i risultati isotopici ottenuti per i campioni raccolti, rispettivamente nel 2018/19 e nel 2020.

**Tabella 8:** Rapporti isotopici (valori medi e deviazione standard Dev.Std. espressi in ‰) dei campioni di canapa industriale raccolti nel 2018 e 2019, ordinati secondo la latitudine delle aree di campionamento (dalla latitudine più alta alla più bassa).

Campione			$\delta^2\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{18}\text{O}$		$\delta^{34}\text{S}$	
Area	Parte*	n**	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std
Tolmezzo (UD)	I	1	-117		-29.3		1.9		22.0		2.0	
Verzegnis (UD)	I	7	-107	13	-28.8	1.1	2.4	0.9	22.1	0.5	6.6	1.7
	S	7	-85	5	-28.4	0.8	0.8	0.9	23.9	0.7	3.9	1.7
	R	1	-94		-28.5		0.9		24.1		4.7	

<i>Campione</i>			$\delta^2H$		$\delta^{13}C$		$\delta^{15}N$		$\delta^{18}O$		$\delta^{34}S$	
<i>Area</i>	<i>Parte*</i>	<i>n**</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.Std</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.Std</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.Std</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.Std</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.Std</i>
<i>Predaia (TN)</i>	O	1	-197						17.9			
	SD	1	-149		-30.4		5.1		20.9		5.5	
	I	1	-98		-28.4		2.8		22.7		5.9	
<i>Gemona del Friuli (UD)</i>	I	6	-96	5	-29.9	0.4	1.1	1.0	21.4	0.7	5.3	2.4
	S	6	-103	10	-29.5	0.2	1.5	0.5	22.9	1.1	4.3	2.6
	R	1	-110		-29.1		1.7		23.4		4.1	
<i><sup>b</sup>Baceno (VB)</i>	I	1	-95		-28.0		6.3		22.2		3.1	
<i>Udine</i>	SDf	2	-117	1	-27.9	1.4	2.7	0.01	24.0	0.8	8.7	0.5
	SDm	1	-134		-29.3		4.8		23.7		9.5	
	If	2	-89	4	-28.5	0.3	2.0	0.2	23.1	1.0	12.7	1.2
	Im	1	-100		-28.2		4.6		23.3		11.5	
	Sf	2	-94	5	-28.0	0.7	2.7	0.6	23.6	0.2	9.3	1.5
	Sm	2	-113	0.1	-29.2	0.9	5.2	1.9	22.2	0.4	10.9	0.4
	Rf	2	-105	9	-27.5	0.7	2.9	0.6	24.2	0.6	10.2	0.7
	Rm	2	-125	0.1	-28.9	0.3	4.9	0.5	22.8	0.2	11.1	0.4
<i>Borgo Valbelluna (BL)</i>	I	2	-100	4	-27.8	0.4	4.9	0.2	23.2	0.4	5.3	0.1
<i><sup>b</sup>Campoformido (UD)</i>	I	6	-103	10	-29.1	0.8	0.6	0.8	22.6	0.6	10.8	1.0
	S	6	-103	8	-28.7	0.5	1.1	0.5	23.2	0.3	8.6	1.6
	R	1	-117		-28.6		1.9		23.9		8.7	
<i>Altopiano della Vigolana (TN)</i>	SD	1	-141		-29.4		2.6		22.3		6.3	
	I	1	-101		-28.7		1.3		23.5		6.1	
<i><sup>b</sup>Seren del Grappa (BL)</i>	SD	1	-138		-30.9		3.6		21.5		4.5	
	I	1	-116		-30.3		3.5		21.7		5.4	
<i>Piacenza</i>	SD + I	2	-104	16	-27.5	0.4	5.0	0.3	23.4	0.4	0.7	1.4
	S	2	-84	2	-26.7	0.1	4.7	0.8	24.5	0.4	-1.2	0.8
<i><sup>b</sup>Jolanda di Savoia (FE)</i>	O	1	-200						20.9			
	I	3	-85	18	-27.5	0.4	11.3	7.2	23.3	1.1	4.1	0.7
<i>Jesi (AN)</i>	O	1	-181						22.4			
	SD	1	-118		-28.5		10.7		23.7		2.8	
	I	1	-68		-23.6		8.3		28.6		-9.9	
<i><sup>b</sup>Sassari</i>	O	1	-179						24.5			
	SD	2	-99	7	-27.8	0.4	3.1	0.7	27.3	0.2	10.5	0.2
	I	2	-86	15	-26.9	0.4	2.7	0.1	25.7	0.2	12.9	0.6
<i><sup>b</sup>Caltagirone (CT)</i>	O	1	-173						25.6			
	SD	1	-104		-25.8		7.3		28.7		1.4	
	I	1	-80		-26.2		8.7		25.4		1.4	
	S	1	-88		-27.6		7.9		26.5		0.5	
	R	1	-93		-27.3		7.1		27.8		2.6	
<i>Minimum value</i>			-200		-30.9		0.6		14.5		-9.9	
<i>Maximum value</i>			-68		-23.6		11.3		28.7		12.9	

<sup>b</sup>=regime biologico, \* R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Seme, O=Olio, \*\* numero di campioni analizzati per ogni matrice

**Tabella 9:** Rapporti isotopici (valori medi e deviazione standard Dev.Std. espressi in ‰) dei campioni di canapa industriale raccolti nel 2018 e 2019, ordinati secondo la latitudine delle aree di campionamento (dalla latitudine più alta alla più bassa).

Campione			$\delta^2\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{18}\text{O}$		$\delta^{34}\text{S}$	
Area	Parte*	n	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std
<sup>b</sup> Predaia (TN)	SD	1	-162		-31.5		3.4		20.0		4.4	
Monno (BS)	S	1	-106		-26.2		1.8		22.1		2.5	
	SD+I	1	-106		-29.5		4.7		22.1		3.1	
	SD	1	-132		-29.8		5.0		24.4		3.3	
Udine	R	1	-132		-28.8		1.0		24.0		8.5	
	S	1	-120		-28.1		1.7		22.7		9.2	
	I	1	-115		-31.3		1.0		21.2		10.6	
<sup>b</sup> Seren del Grappa (BL)	S	1	-119		-29.1		2.6		21.5		3.4	
	I	1	-120		-29.2		3.0		22.4		6.5	
Fiesso d'Artico (VE)	S	1	-83		-28.4		4.8		23.3		1.4	
	I	1	-101		-29.2		4.6		22.4		4.6	
Rovigo	I	1	-93		-26.3		5.8		25.4		-1.0	
<sup>b</sup> Sassari	R	1	-106		-28.7		3.2		27.2		10.9	
	S	1	-99		-27.0		2.7		24.7		10.8	
	I	1	-114		-28.1		4.2		26.2		12.3	
	SD	1	-133		-28.1		3.2		24.9		7.0	
<sup>b</sup> Camigliatello Silano (CS)	R	2	-96	2	-28.2	0.1	-0.7	0.4	26.2	0.2	9.6	0.0
	S	2	-103	2	-28.1	0.2	-1.4	0.4	24.1	0.4	9.5	0.0
	I	2	-91	4	-29.4	0.6	0.7	0.5	24.4	0.1	10.4	0.1
<sup>b</sup> Caltagirone (CT)	I	1	-103		-26.1		4.2		28.3		14.5	
	SD	1	-127		-27.1		6.4		25.7		0.1	
Valore minimo			-161.6		-31.5		-1.4		20.0		-1.0	
Valore massimo			-83.4		-26.1		6.4		28.3		14.5	

<sup>b</sup>=regime biologico, \* R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Seme, O=Olio, \*\* numero di campioni analizzati per ogni matrice

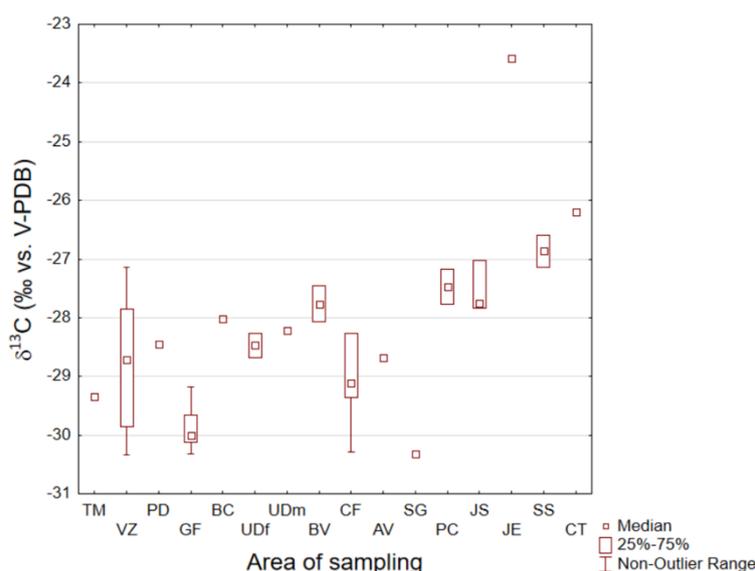
Purtroppo, i campionamenti non sono stati omogenei e spesso non si sono potuti ripetere nelle stesse aree in anni successivi a causa di problemi legati alla coltivazione della canapa (molte aziende agricole non hanno fornito i campioni oppure hanno abbandonato la coltivazione della canapa) e alla pandemia COVID-19. Ove possibile, sono state raccolte tutte le parti della pianta di canapa, dalla radice ai semi fino all'olio, ma in generale la parte che è presente in tutte le aree di campionamento è l'infiorescenza (I). Per tale motivo verranno presentati i grafici con i dati delle sole infiorescenze, tranne nei casi in cui verranno analizzate le singole aree (vedi i paragrafi "L'olio di canapa" e "Il caso studio di Udine").

Nel proseguo del testo, i dati raccolti nel 2018 e nel 2019 verranno analizzati assieme per identificare i rapporti isotopici più caratteristici della canapa, mentre i campioni raccolti nel 2020 verranno

impiegati per confermare o smentire eventuali caratteri o *trend* individuati in precedenza e riportati in dettaglio nel manoscritto pubblicato sulla rivista *Separations* (si veda [Paragrafo 4.1.5](#)).

I risultati ottenuti dai campioni 2018 e 2019 ci hanno permesso di raccogliere informazioni determinanti sulla composizione isotopica della canapa industriale italiana e hanno mostrato caratteristiche peculiari che possono essere collegate all'origine geografica del campione, alle pratiche di fertilizzazione e alle condizioni climatiche delle aree di crescita della canapa. In particolare,  $\delta^{13}\text{C}$  e, in misura minore,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ , hanno mostrato valori chiaramente dipendenti dalle condizioni climatiche e dalla distribuzione latitudinale dei siti di campionamento considerati; il  $\delta^{15}\text{N}$  riflette le pratiche di fertilizzazione convenzionali o organiche, mentre i valori di  $\delta^{34}\text{S}$  raggruppano campioni diversi, probabilmente legati dalla natura comune del *bedrock*. Un marcato impoverimento dei valori medi di  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  è stato evidenziato nei campioni di olio di semi di canapa rispetto a quelli rilevati nei campioni di semi, probabilmente determinato dall'elevato contenuto di lipidi nell'olio. Nello specifico, il  $\delta^{13}\text{C}$  dei campioni analizzati mostra valori medi che rientrano nel range tipico delle piante a ciclo fotosintetico C3 ([Carter & Chesson, 2017](#)), con valori compresi tra  $-30.9$  to  $-23.6\text{‰}$  ([Tabella 8](#)). I valori sono confermati anche dai campioni raccolti nel 2020 che mostrano un range tra  $-31.5$  e  $-26.1\text{‰}$  ([Tabella 9](#)).

Nei campioni di infiorescenze 2018/2019 (i più omogenei e rappresentativi in termini numerici) si nota un chiaro *trend* che aumenta al decrescere della latitudine dei siti di campionamento, con valori che aumentano dal nord al sud Italia, come evidenziato dal box-plot sottostante ([Figura 28](#)).



**Figura 28:** Box-plot dei valori medi del  $\delta^{13}\text{C}$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel 2018 e 2019.

TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

Lo stesso andamento si riscontra per i campioni delle infiorescenze campionate nel 2020 (Figura 29), eccezion fatta per Sassari e Camigliatello Silano (CS) che mostrano valori più negativi (-28,1 e -29,4‰, rispettivamente), probabilmente dettati da frazionamenti legati a stress idrico indotto da particolari condizioni climatiche della zona (Carter & Chesson, 2017).

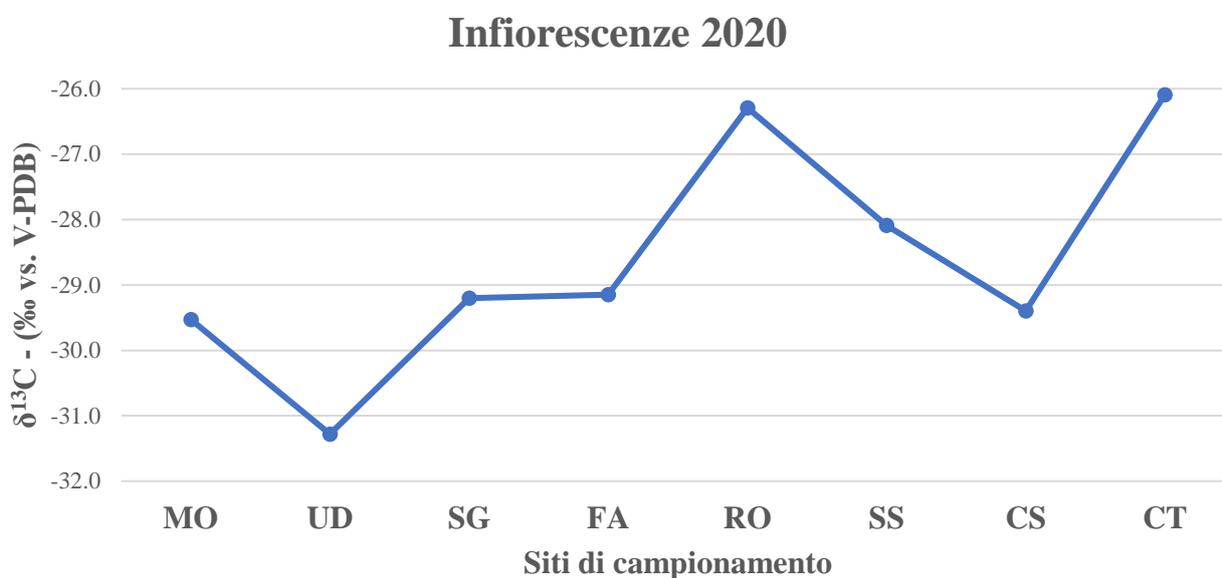
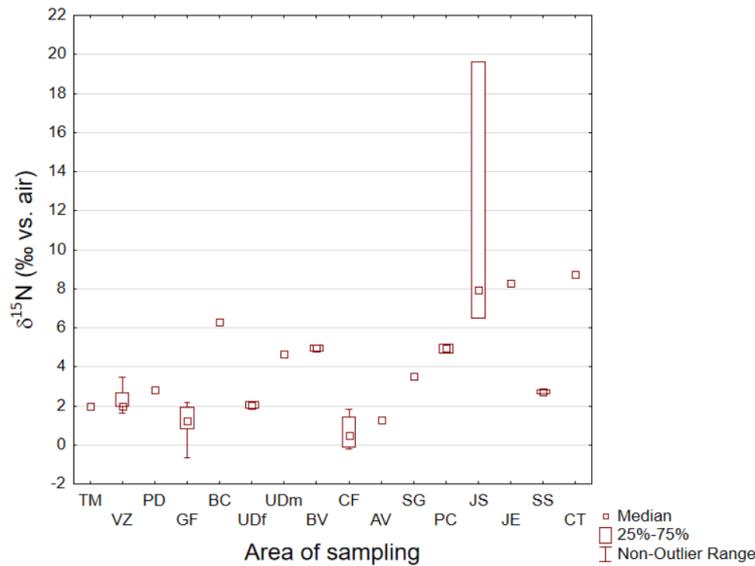


Figura 29: Grafico dei valori medi del  $\delta^{13}\text{C}$  dei campioni di infiorescenze raccolte nel 2020.

MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone.

Per qual che riguarda l'azoto, i rapporti isotopici  $\delta^{15}\text{N}$  sono spesso impiegati quali *marker* del tipo di fertilizzazione adottata in una coltivazione, essendo legati all'origine dell'azoto impiegato nel fertilizzante (Bateman & Kelly, 2001).

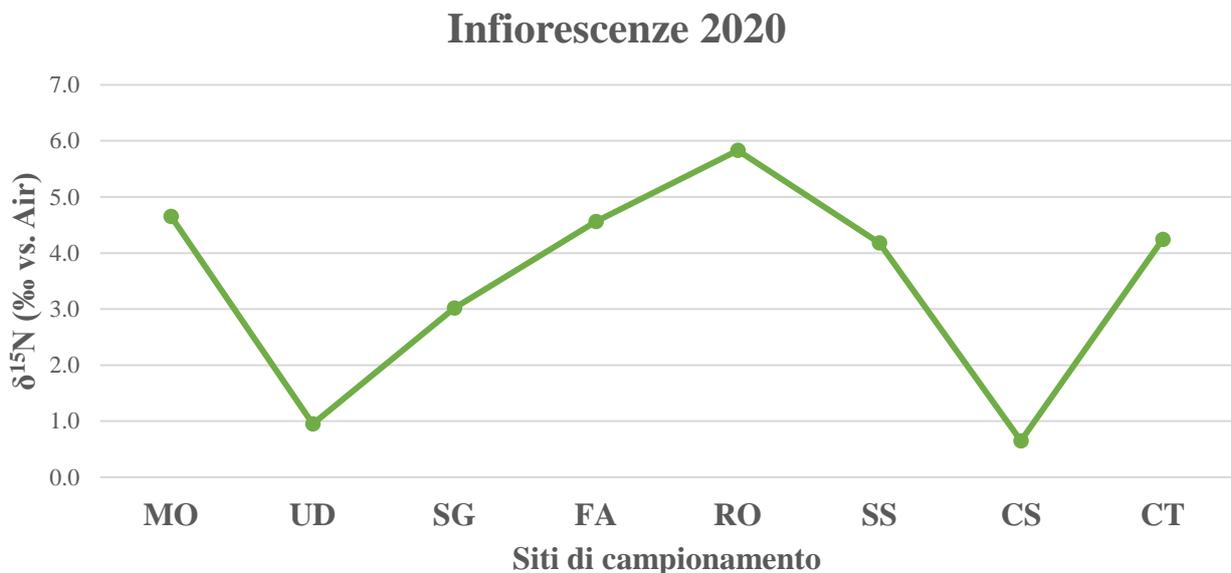
Facendo riferimento ai campioni di canapa indagati nel 2018/2019, i valori medi dei rapporti isotopici variano da 0,6 a 11,3‰ nei campioni coltivati in biologico, e da 0,9 a 10,7‰ per quelli in regime convenzionale (Tabella 8). Da notare che alcuni campioni, nonostante siano stati certificati come biologici, rientrano nei range della fertilizzazione convenzionale (-4,0 ÷ 8,7‰, come riportato da Bateman & Kelly, 2001), come accade per il sito di Campoformido (UD), Seren del Grappa (BL) e Sassari (come si può notare dalla Figura 30). Questo fatto può essere collegato ad una pratica spesso impiegata nelle rotazioni biologiche, dove l'impiego di piante azoto-fissatrici può abbassare i valori di  $\delta^{15}\text{N}$ , ciò dovuto al fatto che tali piante sfruttano l'azoto atmosferico (Bontempo *et al.*, 2020b).



**Figura 30:** Box-plot dei valori medi del  $\delta^{15}\text{N}$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel 2018 e 2019.

TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

Per i campioni raccolti nel 2020 si notano in generale valori medi più bassi (-1,4 ÷ 6,4‰), tutti rientranti nel range della fertilizzazione convenzionale (Figura 30). Per i campioni raccolti negli stessi siti sia nel 2019 che nel 2020, Predaia, Udine, Seren del Grappa, Sassari e Caltagirone, si registrano all'incirca gli stessi valori, a conferma della continuità nella pratica di concimazione impiegata, con l'eccezione di Caltagirone che mostra un abbassamento dei valori (Tabella 9 e Figura 31).

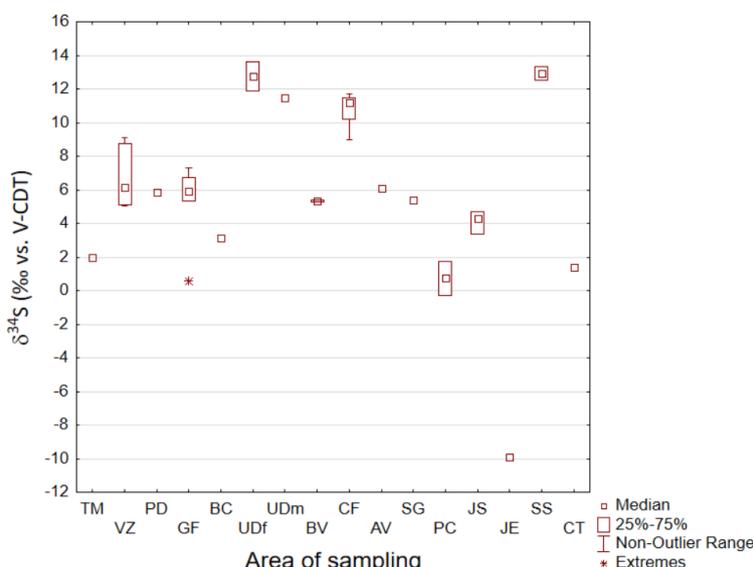


**Figura 31:** Grafico dei valori medi del  $\delta^{15}\text{N}$  dei campioni di infiorescenze raccolte nel 2020.

MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone.

Altra dato degno di nota riguarda i siti a coltivazione biologica. Come sopra menzionato, tutti i campioni raccolti nel 2020 rientrano nei limiti della concimazione chimica, ma ciò può essere ricondotto alle pratiche che prevedono l'utilizzo di specie azoto-fissatrici, tipico delle rotazioni biologiche.

Passando allo zolfo, i rapporti isotopici  $\delta^{34}\text{S}$  dei campioni del 2018/19 mostrano valori positivi con un range che va da 0,5 a 12,9‰, con le uniche eccezioni rappresentate dai siti di campionamento di Piacenza (Emilia-Romagna) e Jesi (Marche), che mostrano valori medi negativi (-1,2 e -9,9‰, rispettivamente; [Tabella 8](#)). Si può notare che i campioni di infiorescenza di (1) Udine e Sassari, e (2) Piacenza e Caltagirone mostrano valori medi  $\delta^{34}\text{S}$  simili (12,7 e 12,9; 0,7 e 1,4‰, rispettivamente; [Tabella 8](#); [Figura 32](#)), anche se questi siti di campionamento sono geograficamente lontani ([Figura 14](#)). Questo potrebbe essere spiegato dalla natura comune delle rocce: carbonatica per (1) e argilloso/calcareo per (2) ([Costantini et al., 2012](#)).

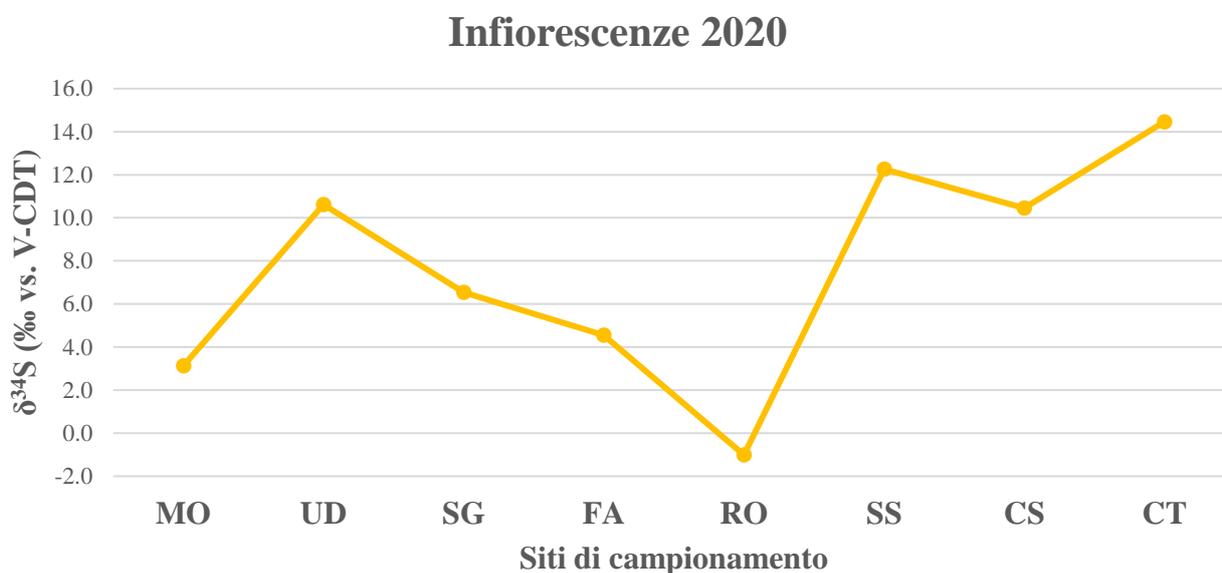


**Figura 32:** Box-plot dei valori medi del  $\delta^{15}\text{N}$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel 2018 e 2019.

TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

L'area di campionamento di Jesi rappresenta un'eccezione, con il campione di infiorescenza che presenta un valore medio  $\delta^{34}\text{S}$  piuttosto negativo (-9.9‰; [Figura 32](#)), fortemente diverso da tutti gli altri. Questo aspetto è probabilmente attribuibile alla geologia di questa zona dell'Italia centrale, dove la formazione evaporitica del messiniano potrebbe affiorare nell'area di campionamento ([Costantini et al., 2012](#)). I campioni del 2020 presentano un range che va da -1,0 a 14,5‰ ([Figura 33](#)), molto simile a quello delle campagne 2018/19, considerando la mancanza del sito di campionamento di Jesi. Il valore negativo appartiene a Rovigo (-1,0‰), molto simile al campione di Piacenza campionato

nel 2019 (-1,2‰): i due siti sono caratterizzati infatti da suoli simili di origine calcarea (Costantini *et al.*, 2012).



**Figura 33:** Grafico dei valori medi del  $\delta^{34}\text{S}$  dei campioni di infiorescenze raccolte nel 2020.

MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone.

Per le aree in cui si è ripetuto il campionamento nel 2019 e nel 2020, notiamo sostanzialmente una situazione simile: Predaia (TN), Seren del Grappa (BL), Udine e Sassari esibiscono valori di  $\delta^{34}\text{S}$  con variazioni minime o al massimo di qualche unità, mentre l'eccezione viene data da Caltagirone (vedi Tabella 8 e 9). In questo caso, infatti, la variazione che si osserva è importante per le infiorescenze dove si passa da 1,4‰ (2019) a 14,5‰ (2020), mentre per i semi la variazione è molto piccola passando da 1,4‰ (2019) a 0,1‰ (2020). Questa grande differenza del  $\delta^{34}\text{S}$  può essere ricondotta a diverse ragioni: in primis al cambio del fertilizzante impiegato e in secondo luogo al cambio della zona di coltivazione: infatti, essendo una coltura biologica ogni anno viene effettuata la rotazione della zona (Zazzo *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2021). Altro dato interessante che si evince dai dati del 2020 (Tabella 9) è il valore simile di due gruppi di aree: (1) Monno (BS), Seren del Grappa (BL), Fiesso d'Artico (VE) e (2) Udine, Sassari e Camigliatello Silano (CS). Nel primo gruppo (1) i campioni sono relativamente vicini, ma comunque accomunati da suoli di tipo A – Suoli delle Alpi e delle Prealpi, tranne per Fiesso d'Artico (VE) che poggia su suoli di tipo D – Suoli della Pianura Padana e Colline associate. Nel gruppo (2) la similitudine nei valori del  $\delta^{34}\text{S}$  potrebbe essere spiegata dalla natura carbonatica comune delle rocce (Costantini *et al.*, 2012). Per Udine e Sassari i valori di  $\delta^{34}\text{S}$  del 2020 confermano quanto riscontrato nel 2019.

Per quanto concerne i rapporti isotopici dell'idrogeno e dell'ossigeno che si riscontrano nelle precipitazioni, essi sono influenzati da fattori climatici e geografici che ne possono impoverire o arricchire i loro valori (Gat, 1996), mentre per quel che riguarda la materia organica vegetale i valori di  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  riflettono la fonte primaria dell'acqua utilizzata (irrigazione o suolo) e possono essere influenzati da un processo di arricchimento durante l'evapotraspirazione e dai processi di sintesi della cellulosa (Carter & Chesson, 2017). Per il 2018/19 i valori medi di  $\delta^2\text{H}$  variano da -200 a -68‰, con i valori più bassi rilevati in tutti e cinque i campioni di olio di semi di canapa considerati (Tabella 8), mentre i valori medi di  $\delta^{18}\text{O}$  variano da 17,9 a 28,7‰ (Tabella 8). Considerando i soli campioni di infiorescenza, che ricordiamo essere la parte di pianta più numerosa (dal punto di vista del campionamento) e quindi più significativa, si può notare un aumento dei valori medi del  $\delta^{18}\text{O}$  da nord a sud (Figura 34), fenomeno legato alle condizioni meteorologiche e agli associati frazionamenti dinamici nel ciclo idrologico.

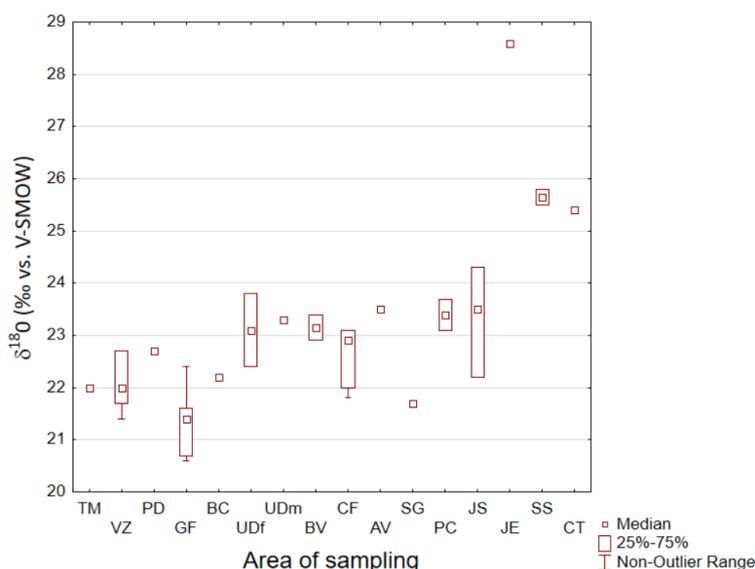
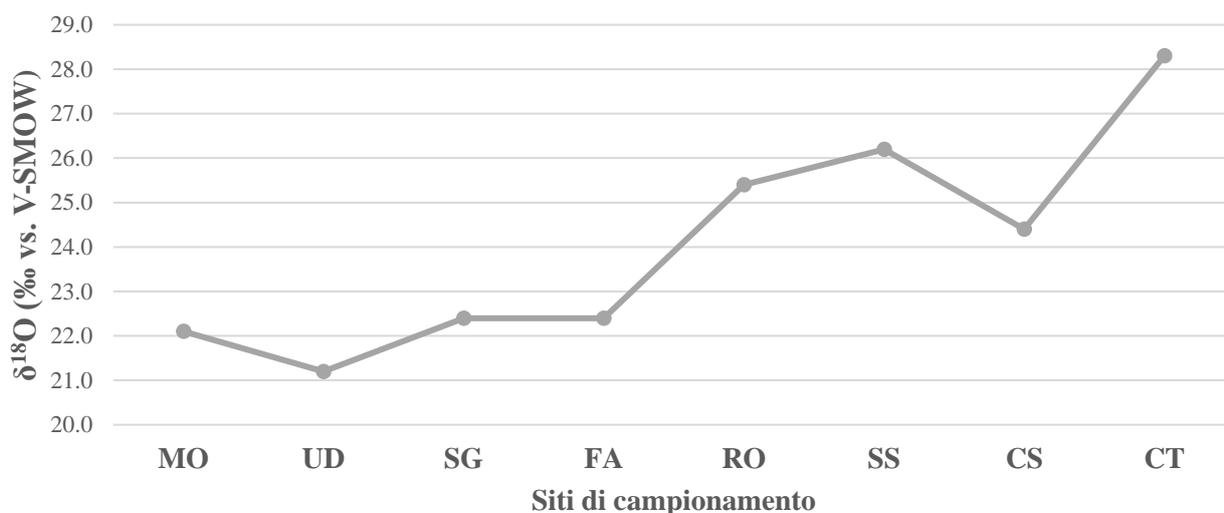


Figura 34: Box-plot dei valori medi del  $\delta^{18}\text{O}$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel 2018 e 2019.

TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

I valori di  $\delta^{18}\text{O}$  più alti sono stati rilevati nei siti di campionamento dell'Italia centrale e meridionale: Jesi, Sassari e Caltagirone (Tabella 8) e questo aspetto può essere correlato a fattori quali i valori delle precipitazioni (Giustini *et al.*, 2016) e agli effetti dei climi più caldi sui processi di evapotraspirazione, che arricchiscono ulteriormente i valori del  $\delta^{18}\text{O}$ . Nei campioni del 2020, per quel che riguarda i valori medi del  $\delta^{18}\text{O}$  il range va da 20,0 a 28,3‰, a conferma di quanto osservato nel 2018/19. Viene confermata inoltre la tendenza positiva dei valori passando dalle aree più a nord verso quelle del sud Italia, come si evince dal grafico sotto riportato (Figura 35).

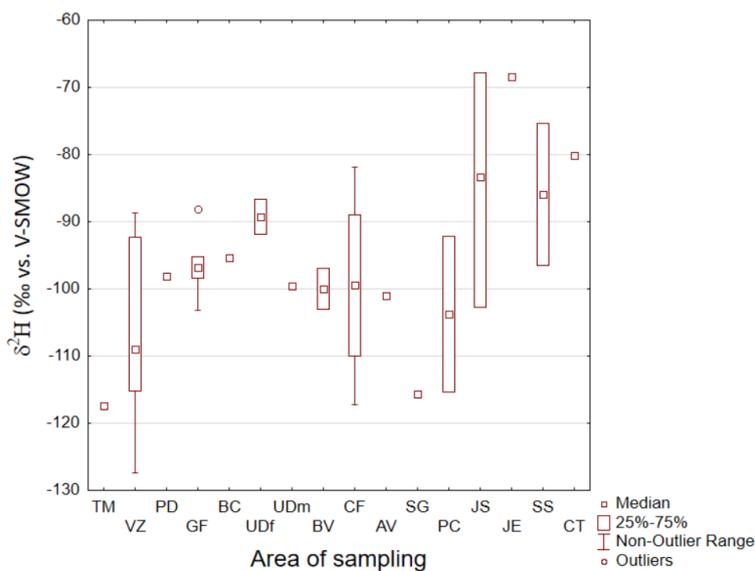
## Infiorescenze 2020



**Figura 35:** Grafico dei valori medi del  $\delta^{18}\text{O}$  dei campioni di infiorescenze raccolte nel 2020.

MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone.

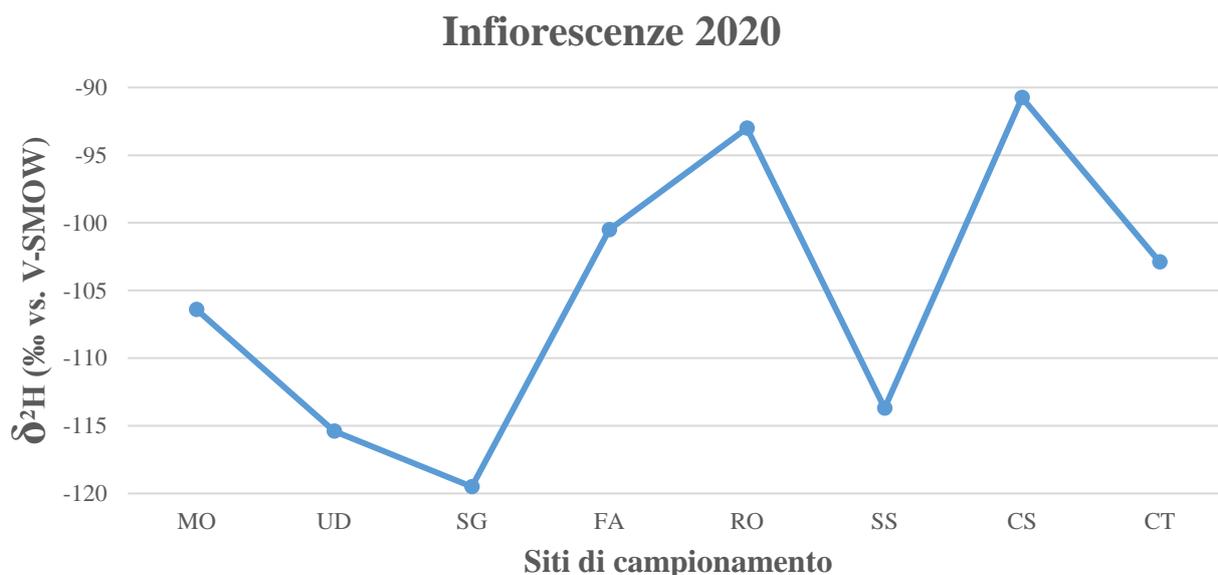
Per le aree campionate sia nel 2019 sia nel 2020, ovvero Predaia (TN), Udine, Sassari e Caltagirone (CT), i valori di  $\delta^{18}\text{O}$  per le varie parti della canapa, rimangono sostanzialmente invariati (Tabella 9). Una tendenza analoga, se pur meno evidente, si nota anche nei valori medi di  $\delta^2\text{H}$  (vedi Figura 36), che sono fortemente influenzati, nella materia organica, dalla composizione isotopica dell'acqua assorbita dalla pianta nonché dal metabolismo fotosintetico della cellulosa.



**Figura 36:** Box-plot dei valori medi del  $\delta^2\text{H}$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel 2018 e 2019.

TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

In questo caso l'influenza della latitudine è meno evidente. Anche per l'idrogeno, come per lo zolfo, il campione raccolto a Jesi (AN) rappresenta un *outlier* e il suo valore medio  $\delta^2\text{H}$  è il meno negativo, con un valore di -68‰. Ciò potrebbe essere correlato ai valori di precipitazione caratteristici delle zone costiere. Per quel che riguarda i campioni del 2020, presentano una serie di valori di  $\delta^2\text{H}$  compresi tra -162 e -83‰ (Tabella 9), tendenzialmente meno negativi se paragonati ai valori 2018/2019 (-200 ÷ -55‰). Prendendo in considerazione le sole infiorescenze (Figura 37), come per i campioni del 2019, non si osserva una chiara tendenza passando dalle aree settentrionali a quelle più meridionali. Analizzando le aree che sono state oggetto di campionamento nel biennio 2019-2020 (Predaia, Udine, Seren del Grappa e Caltagirone), si nota una generale positivizzazione passando dal 2019 al 2020 (vedi Tabella 8 e Tabella 9 per raffronto). Tale fenomeno è più marcato nelle aree meridionali. Questa positivizzazione inter-annuale può essere spiegata dalle temperature medie annuali più elevate registrate nel 2020 che, quindi, potrebbero aver influito sui processi di evapotraspirazione, arricchendo i rapporti isotopici dell'idrogeno (Giustini *et al.*, 2016).



**Figura 37:** Grafico dei valori medi del  $\delta^2\text{H}$  dei campioni di infiorescenze raccolte nel 2020.

MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone.

Un altro dato interessante, che si evince dai valori dei rapporti isotopici dell'idrogeno dei campioni del 2020, è quello derivante dai semi (SD) (Tabella 9): quest'ultimi, infatti, rappresentano i valori più negativi registrati, sia a livello generale, sia all'interno della pianta stessa (quindi rispetto alle altre parti, quali radice, stelo o infiorescenze). Questo può essere spiegato dalla presenza elevata della

componente lipidica (olio) che abbassa i valori di  $\delta^2\text{H}$  nei semi, come riportato in Schmidt *et al.* (2003).

#### 4.1.1 L'olio di canapa

Nel corso delle campagne 2018 e 2019 sono stati raccolti alcuni campioni di olio di canapa, forniti ed estratti direttamente dai coltivatori. I campioni (5) sono stati raccolti nelle aree di Predaia (TN), Jolanda di Savoia (FE), Jesi (AN), Sassari e Caltagirone (CT) e sono state eseguite le analisi isotopiche di idrogeno e ossigeno. Ordinando gli olii analizzati secondo la latitudine (da nord a sud), si notano dei trend positivi (Figura 38), aspetto che può essere correlato ai processi di evapotraspirazione, più spinti man mano che ci si sposta verso climi più caldi e che causano l'arricchimento nei rapporti isotopici di idrogeno e ossigeno.

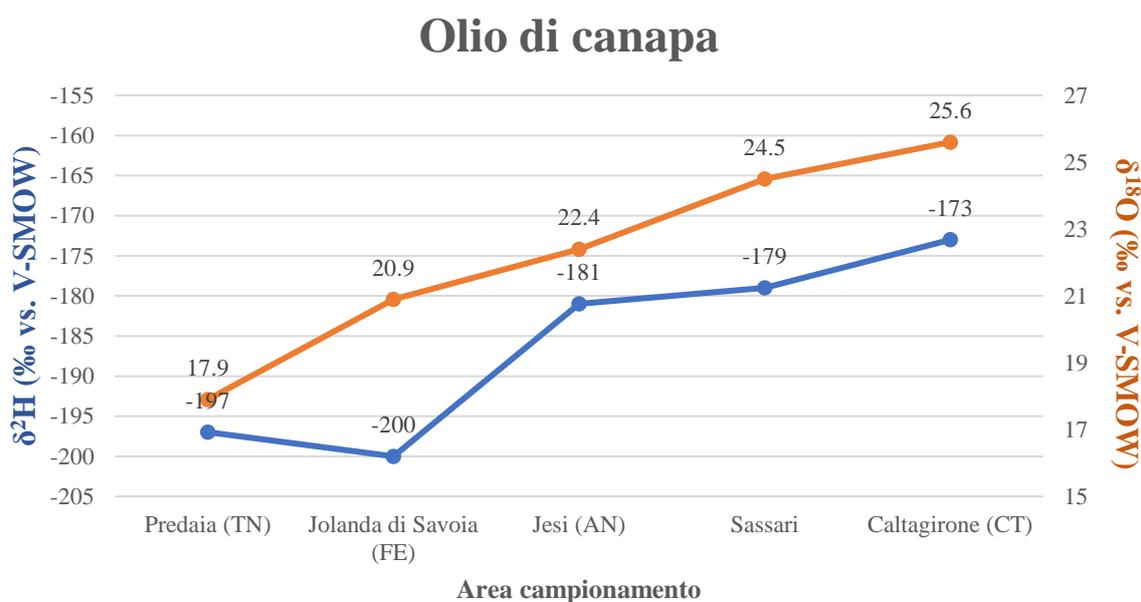
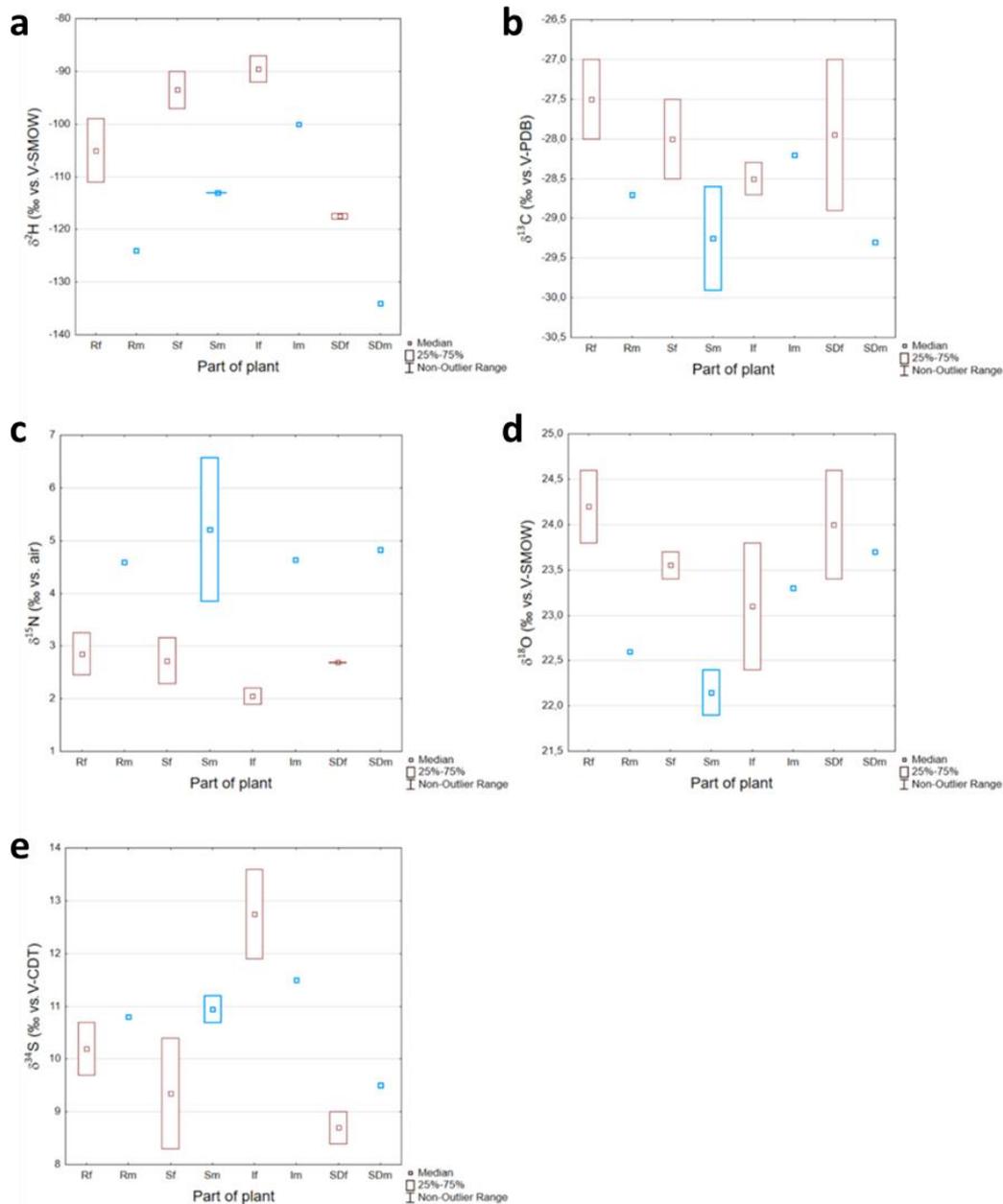


Figura 38: Grafico dei valori di  $\delta^2\text{H}$  e di  $\delta^{18}\text{O}$  dei campioni di olio campionati.

Un altro dato interessante che si evince osservando i valori di  $\delta^2\text{H}$  e di  $\delta^{18}\text{O}$  degli olii di canapa è l'impoverimento passando dai semi (SD) agli olii stessi (O), come riportato in Tabella 8. Per quel che concerne l'idrogeno, si registra una negativizzazione media dei valori del  $\delta^2\text{H}$  del 65%, mentre per il  $\delta^{18}\text{O}$  del 2,6%. Questo è collegabile alla riduzione della componente cellulosica a favore di quella lipidica nel passaggio dal seme all'olio (Schmidt *et al.*, 2003).

## 4.1.2 Il caso studio di Udine

Nell'area di Udine è stato condotto un focus specifico sulle parti della pianta e sul tipo di fertilizzazione: le stesse piante, infatti, sono state sottoposte a fertilizzazione chimica (fertilizzante NPK) e a fertilizzazione organica con letame bovino.



**Figura 39:** Box-plot dei valori medi di  $\delta^2\text{H}$  (a),  $\delta^{13}\text{C}$  (b),  $\delta^{15}\text{N}$  (c),  $\delta^{18}\text{O}$  (d) e  $\delta^{34}\text{S}$  (e) dei campioni di canapa raccolti nel 2019 a Udine. Le barre in azzurro evidenziano i campioni sottoposti a fertilizzazione organica (letame bovino).

R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, f=fertilizzazione con concime sintetico NPK, m=fertilizzazione con letame bovino

L'aspetto della fertilizzazione influenza particolarmente i valori di  $\delta^{15}\text{N}$  e nello specifico le diverse parti di canapa indagate (dalle radici ai semi) per le quali è stato impiegato concime organico,

mostrano un arricchimento medio del 2,3‰ rispetto a quelle in regime convenzionale, come ben evidenziato dalla [Figura 39c](#). Contrariamente a quanto osservato per l'azoto, i rapporti isotopici dell'idrogeno ([Figura 39a](#)) nelle parti di pianta a fertilizzazione organica hanno valori medi più negativi rispetto a quelli che si osservano nelle parti della pianta coltivate con concime d'origine chimica. Lo stesso fenomeno, anche se meno evidente, si osserva per  $\delta^{13}\text{C}$  e per  $\delta^{18}\text{O}$  (vedi [Figura 39b e 39d](#)). Il  $\delta^{34}\text{S}$  presenta anch'esso valori che sono più positivi per le parti di canapa sottoposte a fertilizzazione con letame bovino (organico), eccezion fatta per le infiorescenze ([Figura 39e](#)).

Analizzando le variazioni dei rapporti isotopici tra le varie parti della pianta di canapa, risulta interessante il  $\delta^2\text{H}$  che mostra un incremento dei valori dalle radici alle infiorescenze, per poi diminuire verso i semi (vedi [Tabella 10](#) e [Figura 39a](#)): ciò avviene per entrambi i tipi di fertilizzazioni (*f* e *m*). Per il  $\delta^{13}\text{C}$ , per i campioni a concimazione convenzionale, invece, si osserva un leggero decremento dei valori passando dalle radici alle infiorescenze, mentre si registra un lieve arricchimento verso i semi ([Figura 38b](#)). Lo stesso andamento e nelle stesse parti della pianta si nota anche per il  $\delta^{18}\text{O}$  ([Figura 38d](#)). Per gli altri due isotopi,  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{34}\text{S}$ , non si registrano *trend* significativi tra le varie parti della pianta, né per i campioni sottoposti a fertilizzazione organica, né per quelli a fertilizzazione convenzionale ([Tabella 10](#) e [Figura 39c e 39e](#)).

**Tabella 10:** Rapporti isotopici (valori medi e deviazione standard Dev.Std. espressi in ‰) dei campioni di canapa industriale raccolti a Udine nel 2019.

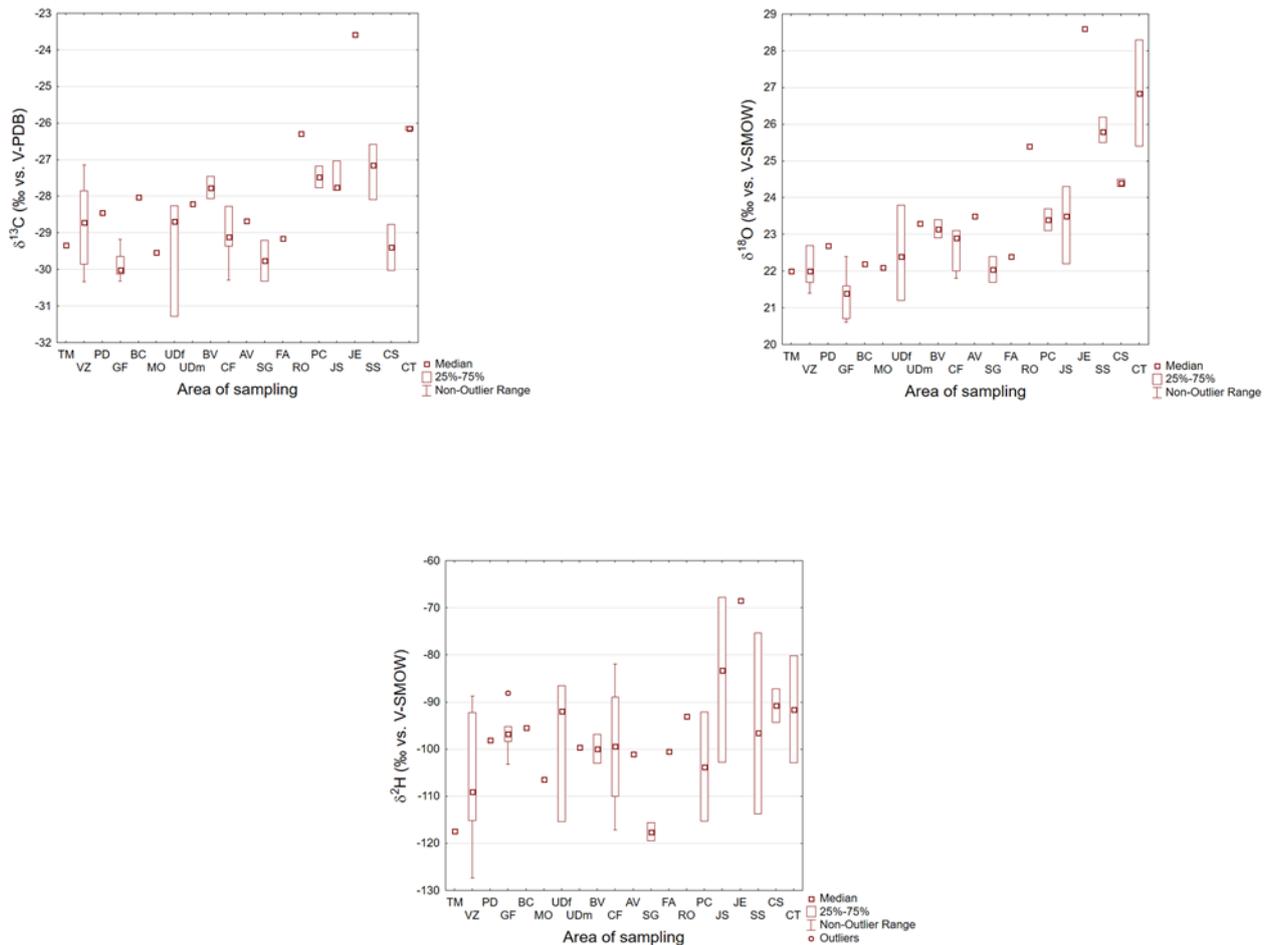
Campione			$\delta^2\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{18}\text{O}$		$\delta^{34}\text{S}$	
Area	Parte*	n	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std	Media	Dev.Std
Udine	SDf	2	-117	1	-27,9	1,4	2,7	0,01	24,0	0,8	8,7	0,5
	SDm	1	-134		-29,3		4,8		23,7		9,5	
	If	2	-89	4	-28,5	0,3	2	0,2	23,1	1	12,7	1,2
	Im	1	-100		-28,2		4,6		23,3		11,5	
	Sf	2	-94	5	-28,0	0,7	2,7	0,6	23,6	0,2	9,3	1,5
	Sm	2	-113	0	-29,2	0,9	5,2	1,9	22,2	0,4	10,9	0,4
	Rf	2	-105	9	-27,5	0,7	2,9	0,6	24,2	0,6	10,2	0,7
	Rm	2	-125	0	-28,9	0,3	4,9	0,5	22,8	0,2	11,1	0,4

\*R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, f=fertilizzazione con concime sintetico NPK, m=fertilizzazione con letame bovino

### 4.1.3 Considerazioni

Dopo aver analizzato in dettaglio i rapporti isotopici  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  delle varie parti della canapa, dalla radice ai semi all'olio, in diverse annate (2018, 2019 e 2020) e in diverse aree dell'Italia, che ci hanno permesso di definire gli intervalli di variazione caratteristici di questa pianta ([Tabella 8](#) e [Tabella 9](#)), si possono fare alcune considerazioni conclusive sui diversi modelli di

distribuzione dei dati. Da sottolineare che i campionamenti non sono stati omogenei negli anni e nella tipologia di campioni: la parte più rappresentativa della canapa, in questo studio, è l'infiorescenza, in quanto campione comune a tutte le aree indagate. L'analisi dei dati isotopici dei cinque bioelementi mostra caratteristiche peculiari che possono essere collegate all'origine geografica del campione, alle pratiche di fertilizzazione e alle condizioni climatiche delle aree di crescita delle piante di canapa.



**Figura 40:** Box-plot dei valori medi di  $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{18}O$  e  $\delta^2H$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel triennio 2018-2019-2020.

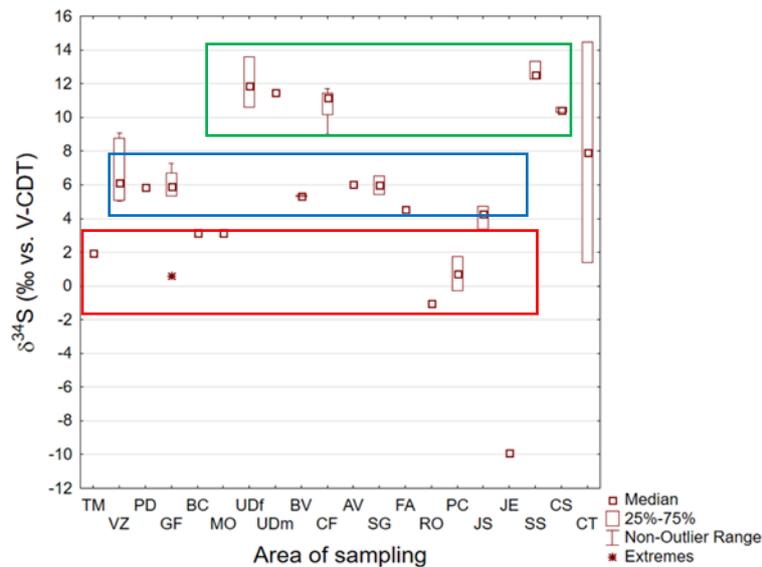
TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), MO=Monno (BS), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

In particolare,  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{18}O$ , e in misura minore  $\delta^2H$ , mostrano valori chiaramente dipendenti dalle condizioni climatiche e dalla distribuzione latitudinale delle aree studiate, come si può evincere dai box plot sotto riportati (Figura 40) che riassumono i dati per le infiorescenze nei 3 anni (2018, 2019 e 2020).

L'azoto ( $\delta^{15}N$ ), restituisce valori che riflettono le pratiche di fertilizzazione convenzionali o organiche, anche se in taluni casi i campioni a regime biologico possono rientrare nei valori della

fertilizzazione convenzionale, ciò dovuto al tipo di pratiche impiegate in campo (come già discusso nei paragrafi precedenti).

Il  $\delta^{34}\text{S}$  mostra valori che raggruppano campioni talvolta diversi e geograficamente lontani, probabilmente secondo la natura comune dei *bedrocks* e della tipologia dei suoli. Nella [Figura 41](#) si possono osservare alcuni gruppi di campioni di infiorescenze con valori simili. Jesi (AN) si dimostra essere un *outlier*, come evidenziato anche per altri isotopi.



**Figura 41:** Box-plot dei valori medi di  $\delta^{34}\text{S}$  dei campioni di infiorescenze raccolti nel triennio 2018-2019-2020.

TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), MO=Monno (BS), UD = Udine, BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren della Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

Infine, il focus sull'olio di canapa ha permesso di evidenziare un marcato impoverimento dei valori medi di  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  rispetto a quelli rilevati nei campioni di semi, probabilmente determinato dall'elevato contenuto di lipidi nell'olio, come riportato in [Schmidt et al. \(2003\)](#), mentre l'approfondimento su Udine ha restituito interessanti informazioni sul comportamento degli isotopi tra le varie parti della pianta, dalla radice ai semi, e sull'incidenza che le pratiche di fertilizzazione hanno sulle parti della pianta. Tutti questi dati verranno impiegati assieme ai rapporti isotopici dello stronzio e agli elementi in traccia e le terre rare nella valutazione finale di questo studio per la caratterizzazione della canapa.

#### **4.1.4 Possono i processi produttivi influenzare il frazionamento isotopico dei campioni di canapa?**

Al termine della valutazione dei dati ottenuti dalle analisi isotopiche dei campioni di canapa raccolti nel triennio 2018-2020, si riportano alcune informazioni sui processi produttivi ai quali la canapa ad uso alimentare viene sottoposta e che potrebbero generare frazionamenti isotopici all'interno della matrice considerata. La canapa ad uso alimentare viene generalmente sottoposta ai seguenti passaggi, come riportato nelle [Linee Guida di Federcanapa \(2021b\)](#): trebbiatura (manuale o meccanizzata); prima lavorazione della granella (vagliatura per rimuovere le impurità, essiccazione artificiale o manuale per ridurre l'umidità del seme, ammassamento in sacchi, trasporto); seconda pulitura e stoccaggio (eliminazione delle particelle estranee e dei semi non idonei, stoccaggio in ambienti freddi o celle frigo a umidità e temperatura controllata o silos). Per ottenere l'olio di canapa, il seme viene sottoposto ad estrazione meccanica a freddo, con temperature che raggiungono i 40°C ([Faugno et al., 2019](#)). In alternativa, viene praticata l'estrazione in CO<sub>2</sub> supercritica ([Ahangari et al., 2021](#); [Aiello et al., 2020](#)), la macerazione assistita ad ultrasuoni ([Esmaeilzadeh et al., 2020](#); [Rezvankhah et al., 2018](#)) e tramite microonde ([Cavalloro et al., 2021](#)). L'olio viene successivamente sottoposto a decantazione, conservazione e imbottigliamento, fasi che possono durare diverse settimane.

Allo stato attuale, in letteratura, non sono presenti studi condotti sui frazionamenti isotopici degli elementi leggeri (H, C, N, O, S) della materia organica della canapa lungo la filiera di produzione per uso alimentare. Tuttavia, non è stato possibile approfondire queste valutazioni durante il Dottorato per questioni legate sia alla limitatezza temporale, sia alla pandemia da COVID-19. A tal proposito, possono essere avanzate solo delle considerazioni preliminari: possibili frazionamenti isotopici potrebbero verificarsi laddove si verificano fenomeni di degradazione, ovvero sia nelle fasi di stoccaggio di semi (altamente fermentescibili), olio e farina. Quest'ipotesi è corroborata da studi compiuti da [Benner et al. \(1987; 1991\)](#) sulla *Spartina alterniflora*, dove si evidenzia come i rapporti isotopici  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  possano essere influenzati da processi biogeochimici, quali la decomposizione. Per gli studi futuri che verranno condotti sulla tracciabilità isotopica della *C. sativa* ad uso alimentare si consiglia, pertanto, di prevedere un campionamento mirato lungo l'intero processo produttivo, possibilmente a monte e a valle delle principali fasi di processamento, cosicché tutte variabili che possono intervenire nel frazionamento isotopico degli elementi leggeri vengano considerate nell'elaborazione finale dei dati.

#### **4.1.5 “Isotopic characterization of Italian industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) intended for food use: a first exploratory study”**

Per quanto riguarda i dati dei rapporti isotopici del 2018 e del 2019, è stata pubblicata sulla rivista *Separations*, all'interno dello *Special Issue "Advances in the Analysis of Food Constituents, Residues, and Contaminants"*, una *Short Communication* dal titolo “*Isotopic characterization of Italian industrial hemp (Cannabis sativa L.) intended for food use: a first exploratory study*” i cui autori sono: Marco CALVI, Luana BONTEMPO, Sarah PIZZINI, Lorenzo CUCINOTTA, Federica CAMIN, Barbara STENNI.

Nella *Short Communication* vengono analizzati i rapporti isotopici  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{34}\text{S}$  delle diverse parti della pianta di canapa come radici, fusti, infiorescenze e semi, campionate in otto diverse regioni d'Italia, e vengono inoltre considerati i campioni di olio.

In questo studio, la canapa industriale italiana (*Cannabis sativa L.*) destinata all'uso alimentare è stata caratterizzata isotopicamente per la prima volta e i dati hanno restituito importanti informazioni sull'origine geografica dei campioni, sulle condizioni climatiche di crescita delle piante e sulle pratiche di concimazione a cui esse sono state sottoposte.

Il mio ruolo in questo manoscritto è stato quello di raccogliere i campioni, sottoporli a liofilizzazione e prepararli per le analisi. Ho interpretato i dati isotopici, e scritto la maggior parte del manoscritto con la collaborazione degli altri co-autori. Purtroppo, a causa di restrizioni dovute alla pandemia COVID-19 non ho potuto partecipare in prima persona alle analisi isotopiche che sono state portate a termine presso i laboratori della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige. La versione integrale dell'articolo pubblicata sulla rivista *Separations* è stata riportata nella sezione Allegati ([Allegato 3](#)).

#### 4.1.6 Rapporti isotopici dello Sr

Per quanto riguarda lo stronzio, sono stati determinati i rapporti isotopici nei soli campioni raccolti nella campagna del 2020, dove sono state considerate le varie parti della pianta di canapa (radice, stelo, infiorescenze, semi) e il suolo. Questo tipo di analisi è stata eseguita solo su questi campioni in primis per motivi temporali dettati dalla pandemia, e in secondo luogo perché solo i campioni del 2020 includono i suoli, fondamentali per le analisi dello stronzio. Il range dei rapporti isotopici  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  va da 0,70821 a 0,71830, come riportato in [Tabella 11](#).

*Tabella 11*: Rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  dei campioni raccolti nel 2020. \*MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, SU=Suolo, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi.

Area	*Parte	<sup>87</sup> Sr/ <sup>86</sup> Sr	**± 2xDev.Std
<i>Predaia (TN)</i>	PRSD	0,70821	0,00008
<i>Monno (BS)</i>	MOSU	0,71559	0,00007
	MOS	0,71830	0,00008
	MOISD	0,71645	0,00008
	MOSD	0,71814	0,00008
<i>Udine</i>	UDSU	0,70833	0,00009
	UDR	0,70865	0,00008
	UDS	0,70833	0,00008
	UDI	0,7083	0,00008
<i>Seren del Grappa (BL)</i>	SGSU	0,70964	0,00005
	SGS	0,70891	0,00008
	SGI	0,7089	0,00008
<i>Fiesso d'Artico (VE)</i>	FASU	0,71046	0,00008
	FAS	0,70976	0,00008
	FAISD	0,71001	0,00008
<i>Rovigo</i>	ROSU	0,71001	0,00009
	ROI	0,70971	0,00008
<i>Sassari</i>	SSSU	0,70918	0,00009
	SSR	0,71015	0,00008
	SSS	0,70908	0,00008
	SSI	0,70901	0,00008
	SSSD	0,70991	0,00008
<i>Camigliatello Silano (CS)</i>	CSSU	0,71309	0,00008
	CSR	0,7117375	0,00008
	CSS	0,71174	0,00008
	CSI	0,71174	0,00008
<i>Caltagirone (CT)</i>	CSSD	0,70915	0,00008
	CTI	0,709	0,00008

\*\*L'incertezza sulla misura corrisponde a 2 volte la Deviazione Standard (Dev.Std).

Balzano all'occhio i valori dell'area di Monno (BS, Lombardia), che si distaccano abbondantemente da tutti gli altri, con un range di 0,71559 ÷ 0,7183, e dell'area di Camigliatello Silano (CS, Calabria), con un intervallo di valori compreso tra 0,70901 e 0,719015 (Figura 42).

## $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$

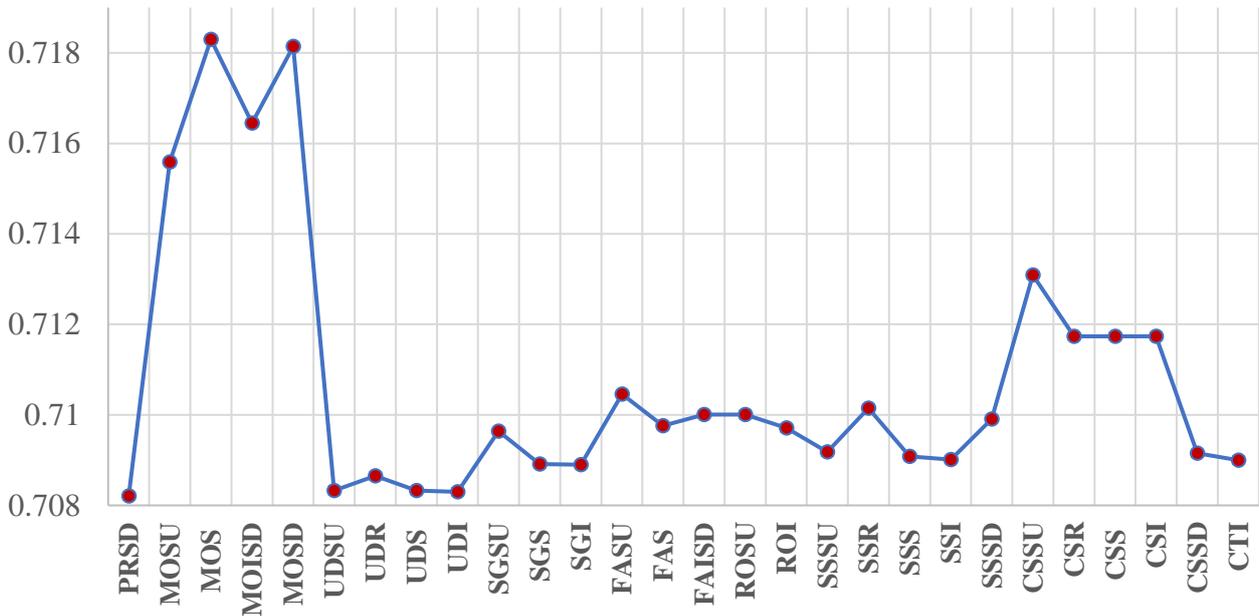


Figura 42: Rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  dei campioni raccolti nel 2020.

PD=Predaia (TN), MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, SU=Suolo, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi.

Le altre zone di campionamento prese in considerazione presentano valori piuttosto simili, tranne per Predaia (TN, Trentino-Alto Adige) e Udine (Friuli-Venezia Giulia) che sono caratterizzate da rapporti isotopici  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  costantemente sullo 0,708. Le differenze e le similitudini messe in evidenza dai rapporti isotopici  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  possono essere collegate alle caratteristiche geolitologiche della zona di provenienza del campione, come evidenziato in alcuni studi sulle mele e sulle acque di bottiglia (Aguzzoni *et al.*, 2020; Zuliani *et al.*, 2020). Analizzando i valori isotopici dei suoli, come da Figura 43, si può evincere che la differenza tra i siti è messa ancor più in risalto o quanto meno confermata: Monno presenta il valore più radiogenico ( $0,71559 \pm 0,00007$ ), seguita da Camigliatello Silano ( $0,71309 \pm 0,00008$ ), mentre il più basso appartiene al sito di Udine ( $0,70833 \pm 0,00009$ ).

## $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ - Suolo

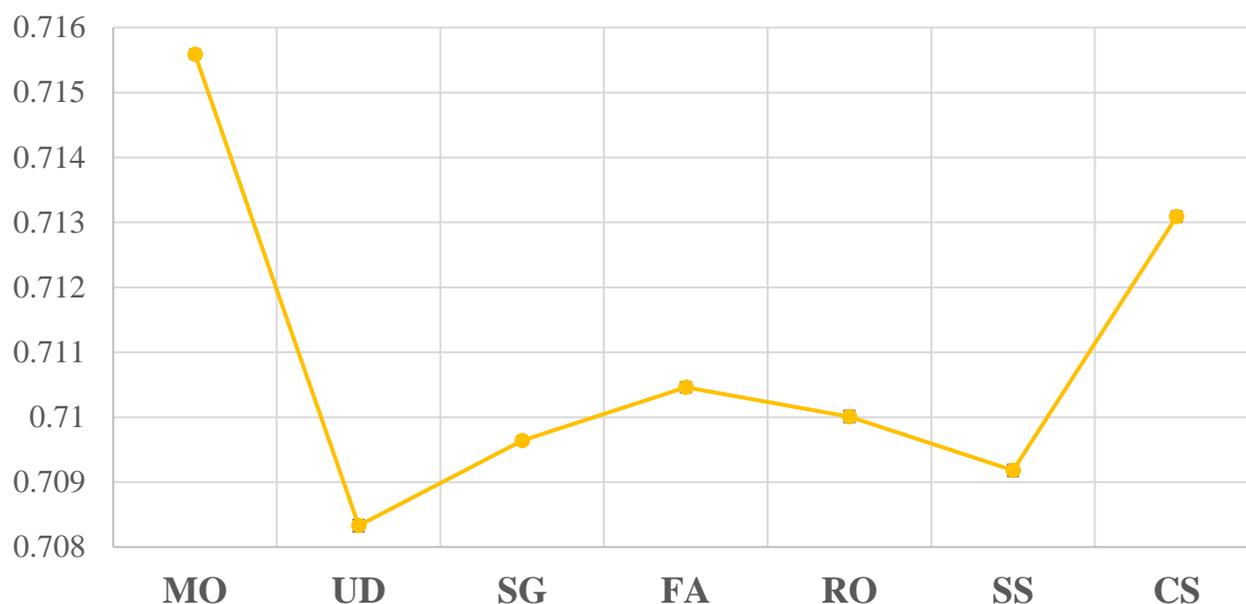


Figura 43: Rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  dei campioni raccolti nel 2020.

MO=Monno (BS), UD=Udine, SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), RO=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS).

L'area di Monno è caratterizzata dalla presenza di calcari e dolomie e da suoli di tipo A – Suoli delle Alpi e delle Prealpi, Camigliatello Silano (CS) da rocce intrusive e metamorfite di medio grado con suoli di tipo E – Suoli degli Appennini centrali e Meridionali, mentre a Udine sono presenti rocce di tipo carbonatico con suoli di tipo D – Suoli della Pianura Padana e coline associate (Costantini *et al.*, 2012; [https://esdac.jrc.ec.europa.eu/images/Eudasm/IT/2012Carta\\_Suoli\\_Italia.jpg](https://esdac.jrc.ec.europa.eu/images/Eudasm/IT/2012Carta_Suoli_Italia.jpg)). Quindi, la differenza nella geolitologia delle aree sopracitate, può essere il fattore discriminante, come è stato definito nello studio sulle mele Golden Delicious condotto da Aguzzoni *et al.* (2020). Il rapporto isotopico dello stronzio può essere inoltre influenzato dalla tipologia di fertilizzanti impiegati, in quanto lo stesso Sr può essere associato al potassio, ai carbonati, ai fosfati e ai solfati del concime (Vitoria, 2004). Per questo studio, però, l' $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  non è stato determinato nei fertilizzanti impiegati nelle 9 aree campionate nel 2020 e non è quindi possibile capire l'influenza della pratica di fertilizzazione sui valori isotopici dello stronzio.

Sicuramente, anche se incompleti, questi primi dati dei rapporti isotopici  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  danno utili informazioni collegabili alla geologia dei siti di campionamento e che verranno impiegati come fattore discriminante per le valutazioni finali di questa tesi per la caratterizzazione della canapa industriale.

## 4.2 Elementi in traccia e Terre Rare

Le concentrazioni degli elementi in traccia e delle terre rare sono state determinate sulle varie parti della pianta di canapa, quali radice, stelo, infiorescenze e semi, raccolte nelle campagne 2018, 2019 e 2020 per comprendere come e quali elementi vengono maggiormente assorbiti nella canapa. Il diverso assorbimento degli elementi in funzione dell'area geografica può dare utili informazioni ai fini della tracciabilità spaziale della canapa industriale coltivata in Italia. Solo per la campagna 2020 è stato possibile analizzare i suoli per poter svolgere un'analisi più approfondita sul contenuto di elementi in traccia e terre rare nei suoli e capire le dinamiche di trasferimento verso la pianta.

In generale, come spiegato per le analisi isotopiche, i campioni più abbondanti sono le infiorescenze seguite dagli steli. Solo per alcune aree sono stati forniti anche radici e semi, che hanno permesso una valutazione completa riguardo l'assimilazione ed il trasporto degli elementi in traccia e delle terre rare. A seguire verranno trattati nel dettaglio i dati degli elementi in traccia ([Paragrafo 4.2.1](#)) e delle terre rare ([Paragrafo 4.2.2](#)).

### 4.2.1 Elementi in traccia (TEs)

Nelle Figure 44-45, vengono mostrate le concentrazioni totali dei TEs all'interno degli steli e delle infiorescenze dei campioni prelevati in Friuli-Venezia Giulia, nelle aree di Gemona del Friuli (UD), Campoformido (UD) e Verzegnis (UD), durante la campagna 2018 (vedi [Tabella A.1](#) in Appendice). Dai grafici si osserva come il comportamento degli elementi in traccia di possa suddividere in due gruppi: Sr, Zn e Cu che presentano concentrazioni maggiori nelle infiorescenze, mentre Cr, Ni e Cd mostrano concentrazioni maggiori nello stelo. È interessante notare come per Sr, Zn e Cu le aree che riportano le concentrazioni maggiori sono sempre Verzegnis e Campoformido (quest'ultimo in regime biologico), mentre Gemona detiene i valori minori e ciò potrebbe essere utile ai fini della tracciabilità geografica della canapa industriale. Altro dato che si evince dai grafici di [Figura 44-45](#) è la concentrazione maggiore di alcune varietà rispetto ad altre: per le infiorescenze sono Ferimon (colore grigio scuro) e Futura (colore blu) a Verzegnis, e Fedora (colore verde) a Campoformido, mentre per gli steli è Zenit (colore verde scuro) sempre per Verzegnis, che mostra la concentrazione maggiore per tutti e sei gli elementi.

Per quel che concerne la concentrazione dei singoli elementi rispettano il seguente ordine, sia per le infiorescenze, sia per gli steli:  $Sr > Zn > Cu > Cr > Ni > Cd$ . Lo stronzio è quindi l'elemento più presente nei campioni e la sua concentrazione dipende, molto probabilmente, da quella del suolo ([Gupta & Walther, 2018](#)) su cui la canapa è cresciuta. Seguono Zn e Cu, utili alla fisiologia della pianta ([Vatansever et al., 2017](#)), mentre Cr, Ni e Cd sono presenti in concentrazioni minori.

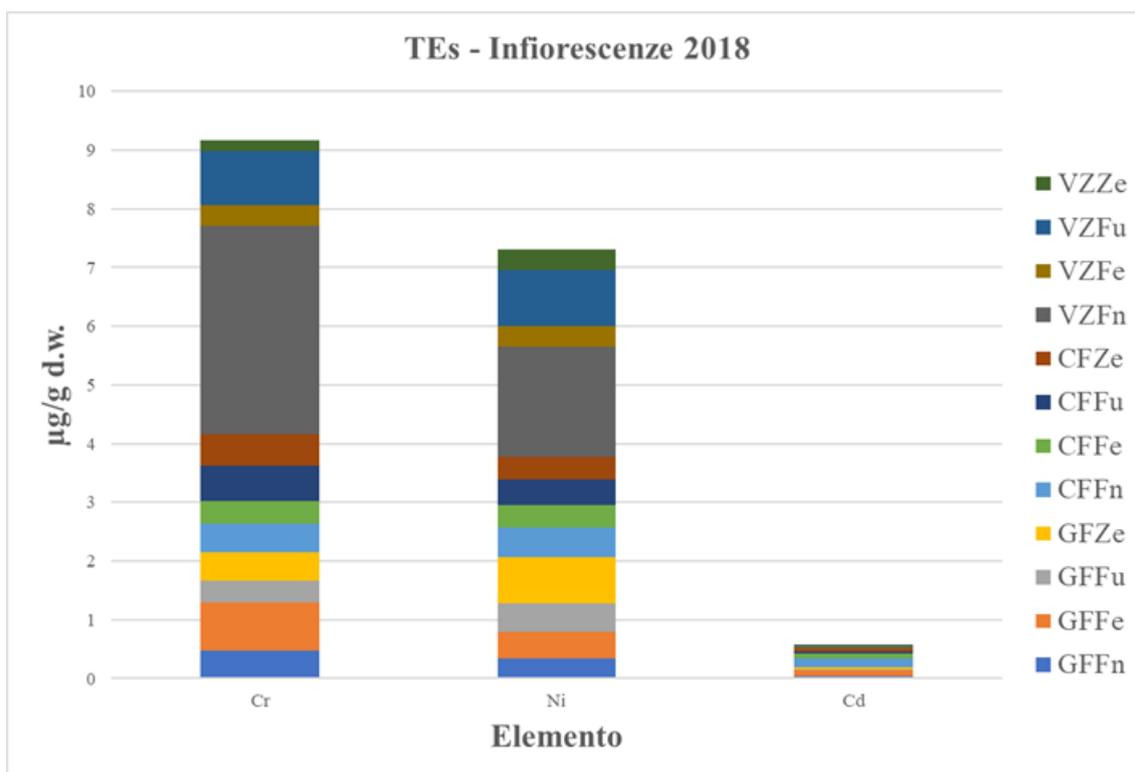
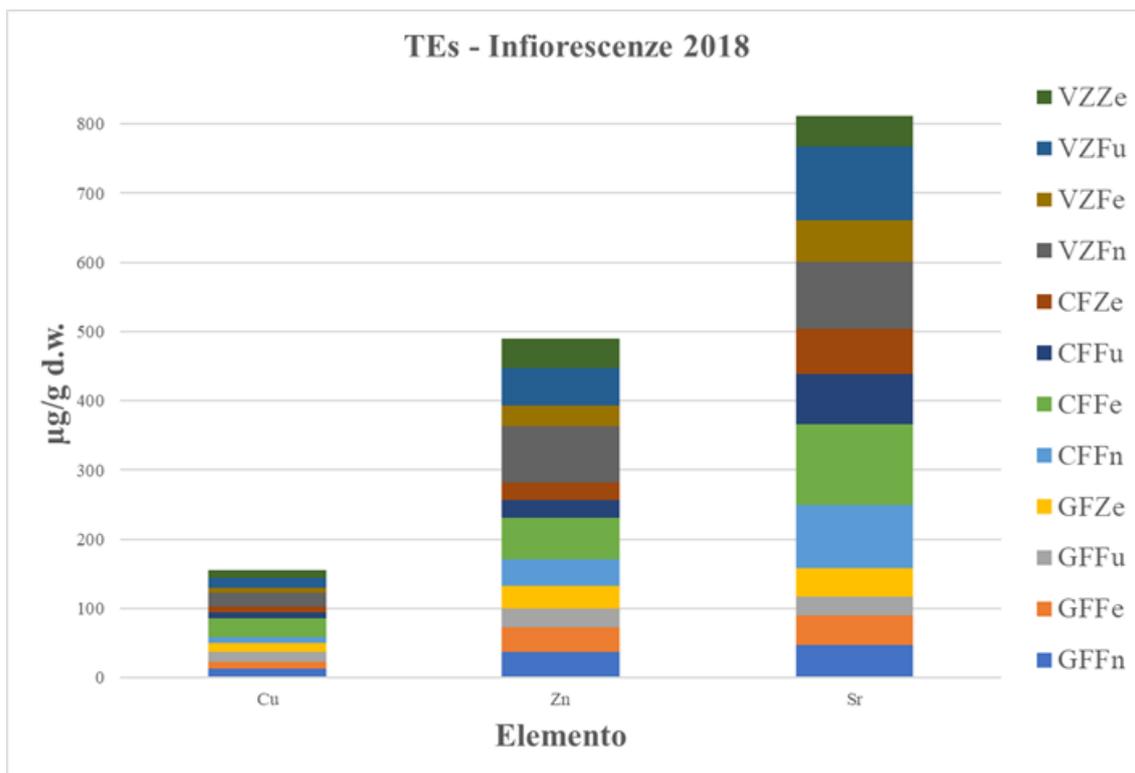
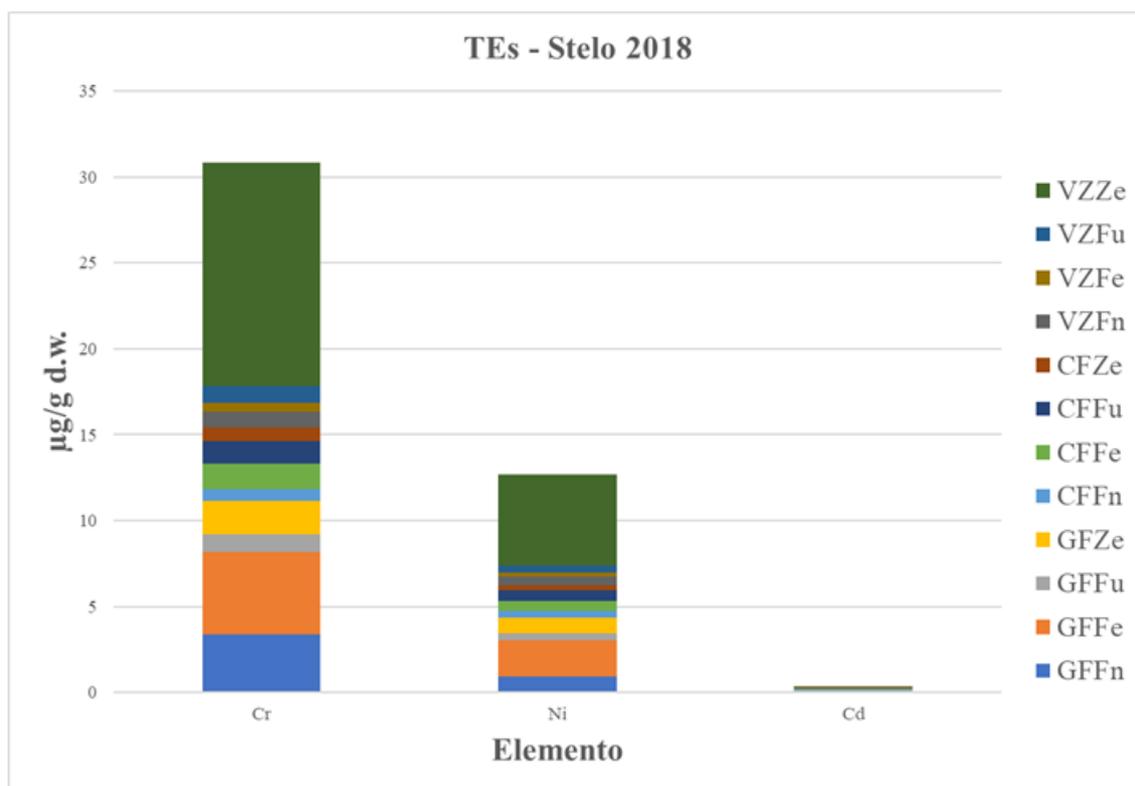
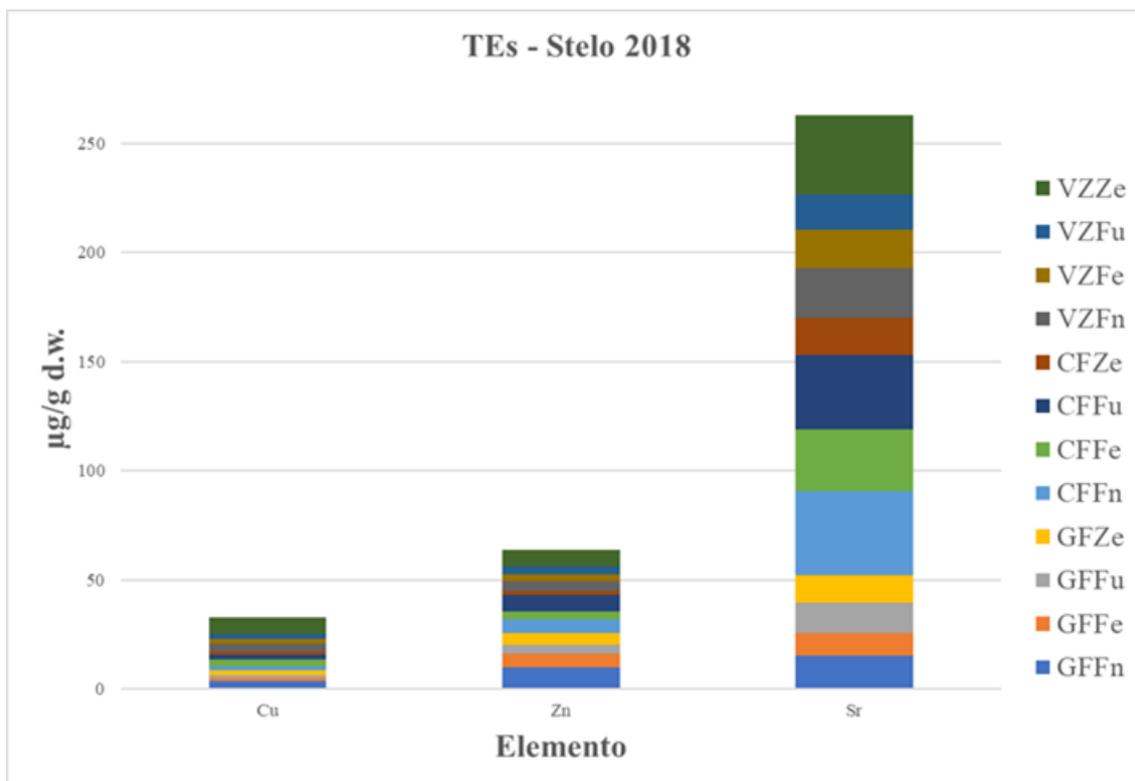


Figura 44: Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni (µg/g) degli elementi in traccia delle infiorescenze nei campioni di canapa raccolti nel 2018.

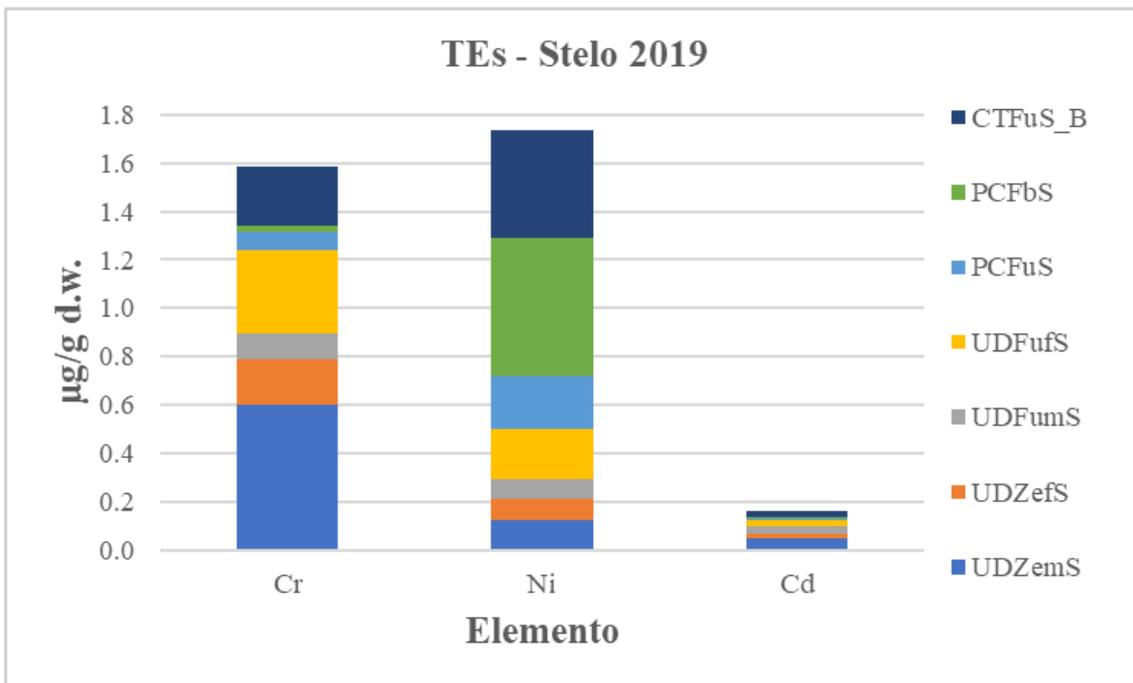
GF=Gemona del Friuli (UD), CF=Campoformido (UD), VZ=Verzegnis (UD), Fn=Ferimon, Fe=Fedora 17, Fu=Futura 75, Ze=Zenit



**Figura 45:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia degli steli nei campioni di canapa raccolti nel 2018.

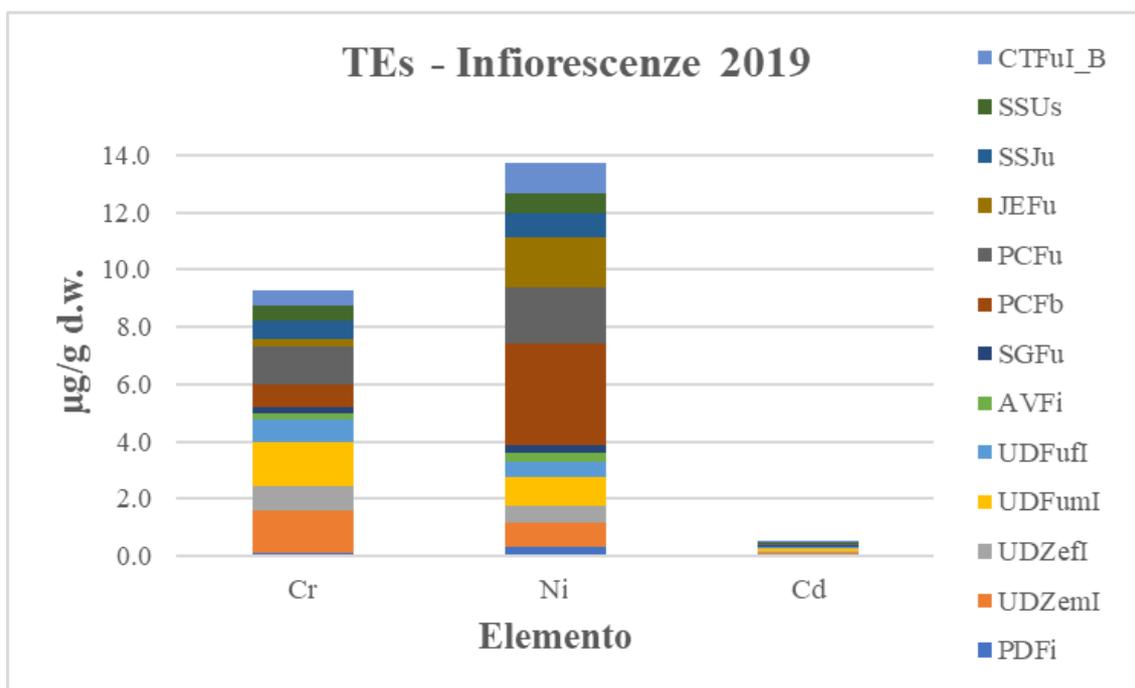
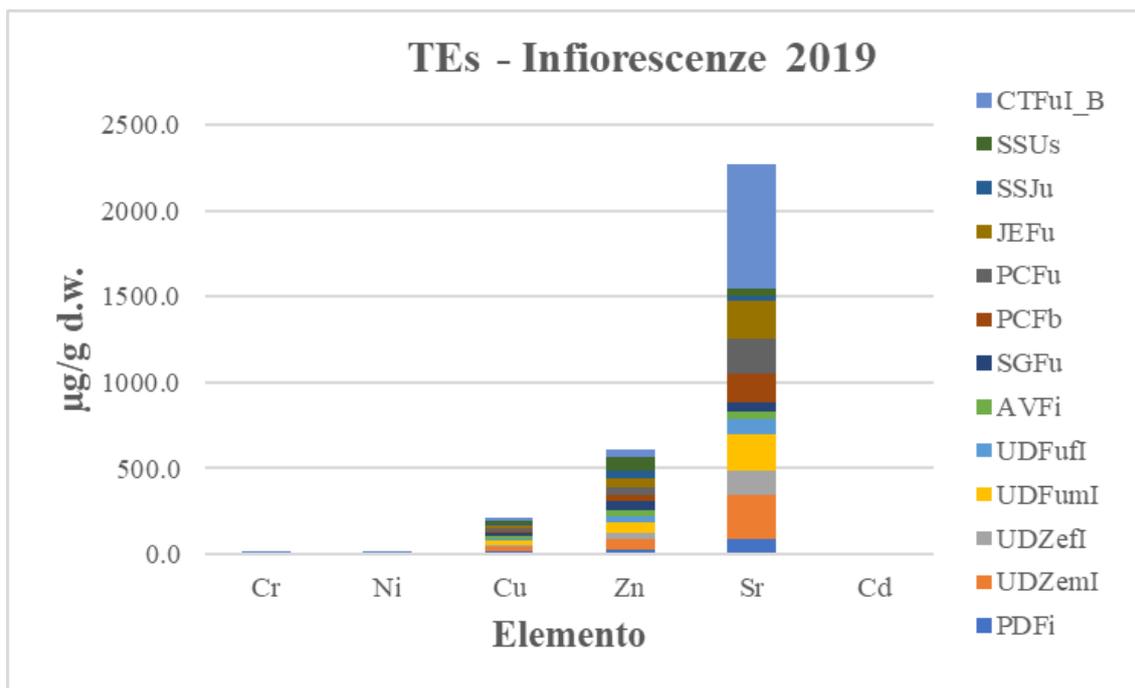
GF=Gemona del Friuli (UD), CF=Campoformido (UD), VZ=Verzegnis (UD), Fn=Ferimon, Fe=Fedora 17, Fu=Futura 75, Ze=Zenit

Per quel che riguarda i campioni del 2019, le analisi degli elementi in traccia sono state eseguite su diverse parti della canapa, dalla radice ai semi, provenienti da diverse parti d'Italia (vedi [Tabella A.2](#) riportata in Appendice per i dati completi). Non è stato possibile raccogliere tutte le parti della pianta per tutte le aree, per cui inizialmente verranno analizzate le aree complete di steli, infiorescenze e semi, mentre verrà riservato un focus per Udine e Caltagirone (CT), quali siti complete di tutte le parti. In generale, come si osserva dalle [Figure 46-47](#), le infiorescenze accumulano una concentrazione di tutti gli elementi in traccia considerati più elevata rispetto agli steli, mentre nei campioni del 2018 ciò succedeva solo per Sr, Zn e Cu. L'elemento che più abbonda negli steli e nelle infiorescenze è lo Sr, seguito da Zn e Cu, mentre Cr, Ni e Cd hanno concentrazioni molto inferiori. Il sito di Caltagirone (Sicilia) spicca per la concentrazione di Sr in entrambe le parti considerate e, dato che lo stronzio deriva dai suoli e dai *bedrocks* del sito considerato ([Tommasini et al., 2018](#)), può essere un elemento discriminante per la tracciabilità geografica del campione. Anche per i siti di Jesi e di Piacenza si possono fare le stesse considerazioni, ma solo per le infiorescenze. Per Zn e Cu non vi è una così evidente differenziazione nelle concentrazioni nei campioni oggetto dello studio, nonostante anche la loro concentrazione sia collegata generalmente al *parent material* ([Ali et al., 2020](#)). Focalizzandosi su Ni e Cr, il primo è il più abbondante, sia tra le infiorescenze, sia negli steli. Per il Ni evidente è il sito di Piacenza, con una concentrazione che spicca sugli altri campioni nelle infiorescenze (gli steli non sono presenti) ([Figura 47](#)). Anche il Ni, in minor entità rispetto allo stronzio, potrebbe essere un utile elemento per la discriminazione geografica. Per quel che concerne il Cr, Udine presenta le concentrazioni maggiori sia per infiorescenze che per steli, seguito da Piacenza (solo infiorescenze) e Caltagirone.



**Figura 46:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia degli steli dei campioni di canapa raccolti nel 2019. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

PD=Predaia (TN), UD=Udine, AV=Altopiano della Vigolana (TN), SG=Seren del Grappa (BL), PC=Piacenza, JE=Jesi (AN), SS=Sassari, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Usò 31, <sup>b</sup>=regime biologico, <sup>m</sup>=fertilizzazione organica

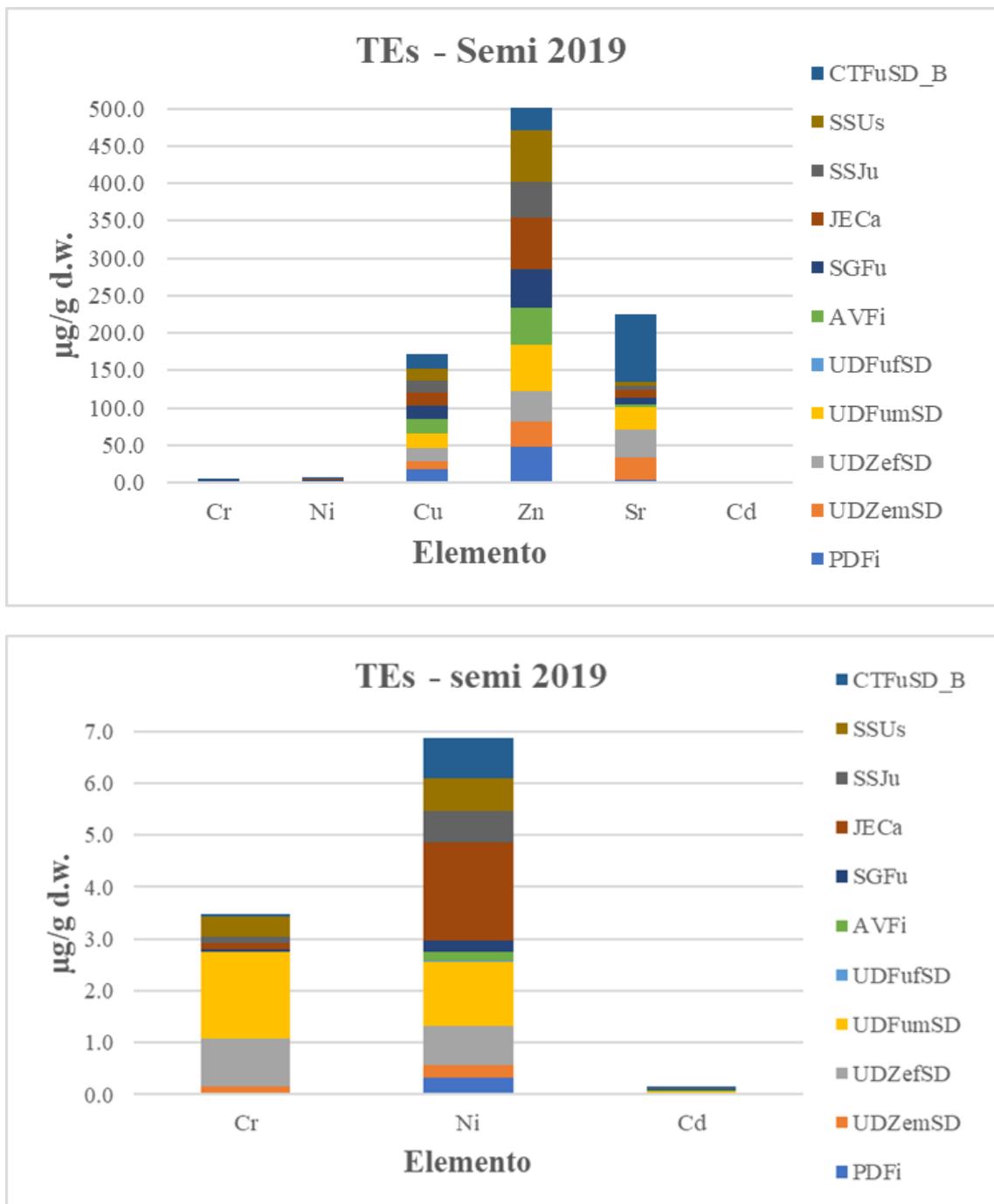


**Figura 47:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia delle infiorescenze dei campioni di canapa raccolti nel 2019. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

PD=Predaia (TN), UD=Udine, AV=Altopiano della Vigolana (TN), SG=Seren del Grappa (BL), PC=Piacenza, JE=Jesi (AN), SS=Sassari, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, b=regime biologico, m=fertilizzazione organica

Le analisi degli elementi nei semi (Figura 48) mostrano delle concentrazioni medie più basse rispetto alle infiorescenze e si nota una prevalenza dello Zn (rispetto a quanto osservato per steli ed

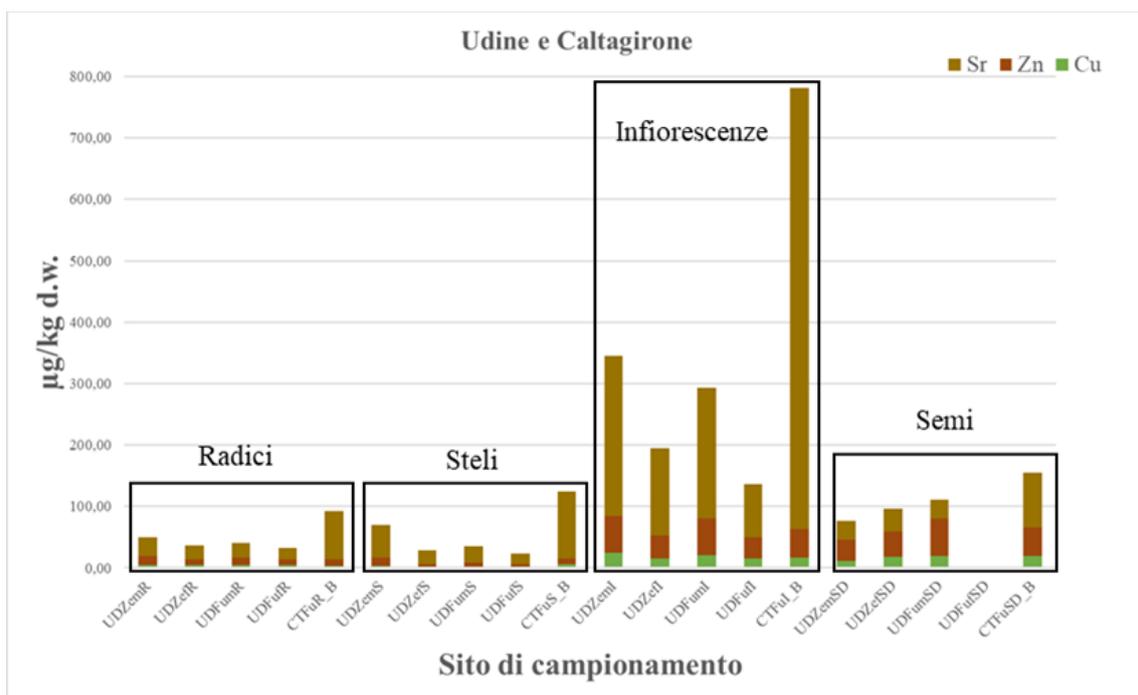
infiorescenze), seguito da Sr e Cu. Il Ni prevale sul Cr, mentre il Cd mostra sempre valori molto bassi (al di sotto dei limiti riportati nel [Reg. CE 1881/2006](#)).

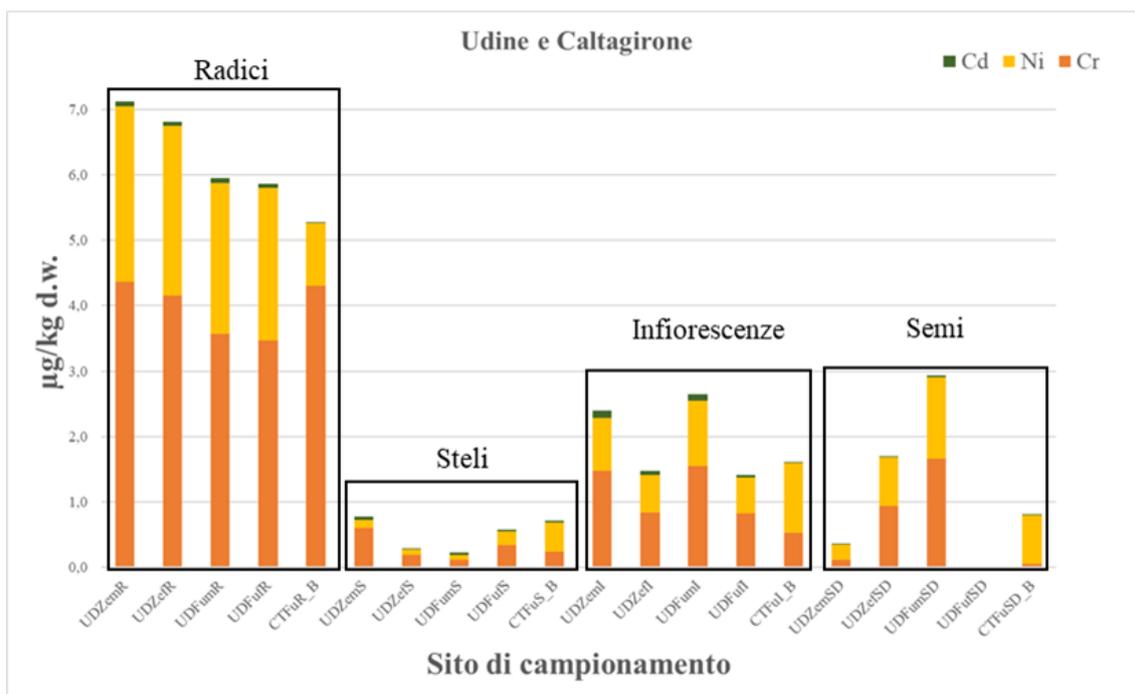


**Figura 48:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei semi di canapa raccolti nel 2019. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

PD=Predaia (TN), UD=Udine, AV=Altopiano della Vigolana (TN), SG=Seren del Grappa (BL), PC=Piacenza, JE=Jesi (AN), SS=Sassari, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, m=fertilizzazione organica.

Focalizzandosi sullo Zn, a livello grafico non si nota un sito che spicca su tutti gli altri per concentrazione, cosa invece che evince dalla colonna dello Sr: qui, il sito di Caltagirone (colore blu) mostra una concentrazione molto alta e si distingue da Udine ed in particolare da tutti gli altri siti considerati. Il Cr evidenzia una concentrazione maggiore per il sito di Udine, come dimostrato nelle altre parti della pianta, mentre il Ni fa esaltare il campione di Jesi (AN). Questi due elementi potranno essere utili nell'analisi delle componenti principali nel [Paragrafo 4.3](#). Passando ai due siti di campionamento Caltagirone e Udine che sono completi di tutte le parti (radice, stelo, infiorescenza e semi) è interessante notare come lo Sr sia sempre l'elemento predominante e allo stesso tempo l'elemento che caratterizza Caltagirone (CT) da Udine ([Figura 49](#)). Andamento diverso, invece, per Ni, Cr e Cd ([Figura 49](#), grafico in basso). Il Cr è l'elemento che prevale per concentrazione, ma senza evidenziare particolari differenze tra le due aree, mentre le radici sono la parte che più accumula Cr e Ni, seguite da infiorescenze, semi e stelo. Per il sito di Udine, non si osservano differenze significative in funzione del tipo di fertilizzazione (m=fertilizzazione organica) e del tipo di varietà (Zenit e Futura 75).



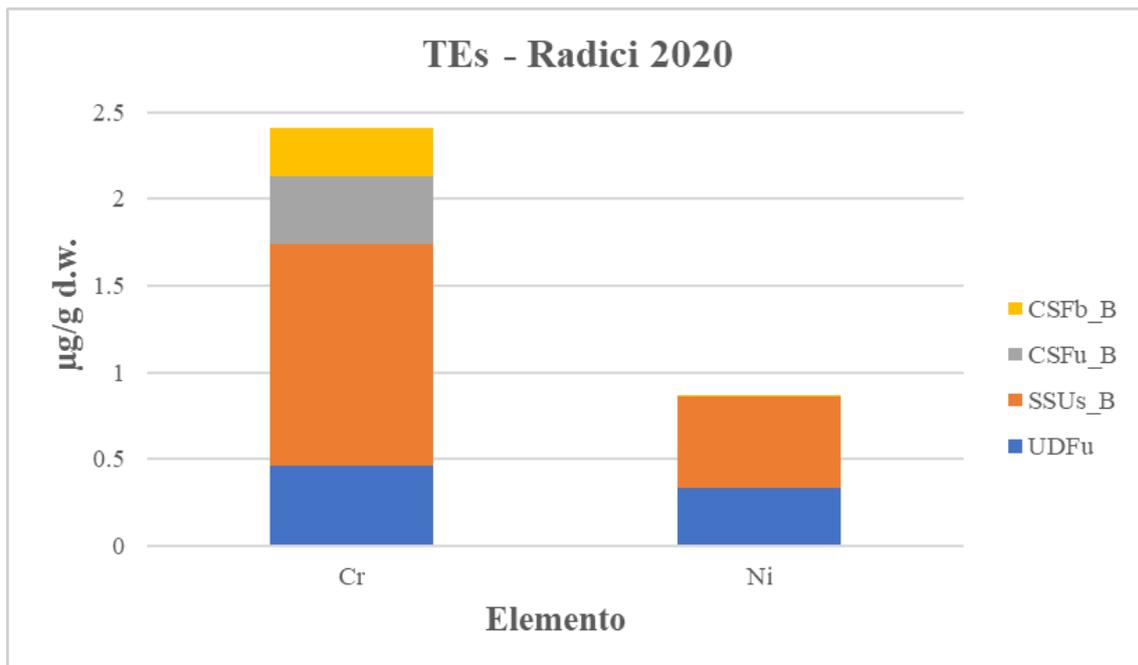
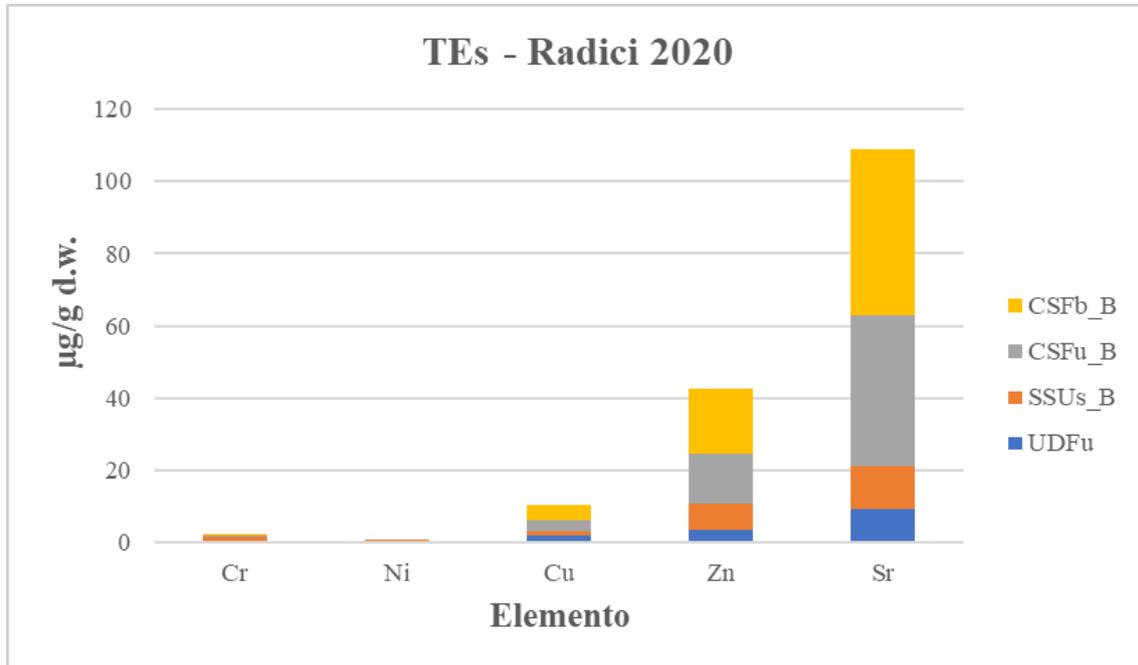


**Figura 49:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni (µg/g) degli elementi in traccia delle diverse parti di canapa raccolti nei siti di Caltagirone e Udine nel 2019. Il grafico in alto è relativo agli elementi Sr, Zn e Cu, mentre il grafico sotto riporta le concentrazioni di Cr, Ni e Cd.

UD=Udine, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, m=fertilizzazione organica, \_B=certificato biologico.

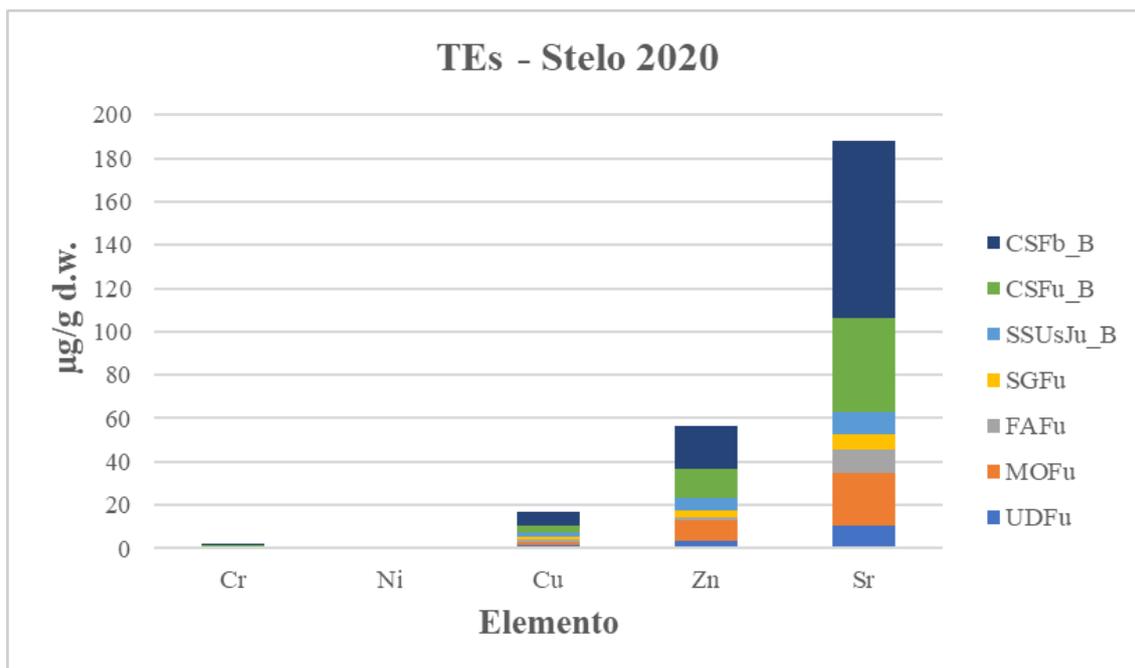
Per quel che riguarda i campioni della campagna 2020, non è stato possibile ripetere tutti i campionamenti eseguiti nel 2019, tranne per i siti di Udine, Seren del Grappa (BL), Sassari e Caltagirone (CT). Sotto, si riportano i grafici dei campioni del 2020 nelle [Figure 50-51-52-53](#) (vedi [Tabella A.3](#) in Appendice per i valori completi). Il campione di Caltagirone Infiorescenza (CTFuI\_B), mostra delle concentrazioni elevatissime e sarà escluso dalle rappresentazioni grafiche. Tale valore anomalo potrebbe essere collegato a diversi fattori, quali contaminazioni nella fase di preparazione dei campioni o a livello analitico. Da una prima analisi dei grafici si osserva come Sr, Zn e Cu siano gli elementi con la concentrazione maggiore. È interessante osservare come la loro concentrazione aumenti dalle radici verso le infiorescenze, per poi abbassarsi nei semi (come osservato nel 2019). Nello specifico, gli elementi Sr, Zn e Cu sono caratterizzanti dei siti di Camigliatello Silano (Calabria) e Monno (Lombardia) in relazione alla loro diversa concentrazione. Per i semi, anche se sono stati considerati solo le aree di Caltagirone, Sassari e Monno, lo Zn è l'elemento a concentrazione maggiore ed anche qui si può notare una distinzione in funzione della concentrazione e quindi della zona geografica. Per quanto riguarda Ni e Cr, come si evince dalle [Figure 50-51-52-53](#), il loro andamento è diverso dagli elementi sopra discussi. La loro concentrazione diminuisce dalle radici agli steli, per poi crescere verso le infiorescenze (dove si osserva una concentrazione più elevata). Nel dettaglio, il Cr è più abbondante rispetto al Ni e si può notare come, soprattutto per il Cr, ci sia

una distinzione per le aree studiate: nelle radici Sassari e Camigliatello Silano sono ben distinguibili, negli steli e nelle infiorescenze lo stesso accade per i siti di Monno e Udine, mentre nei semi si osserva una netta separazione tra le aree per Cr e Ni. Queste informazioni possono essere utili ai fini della tracciabilità spaziale dei campioni.



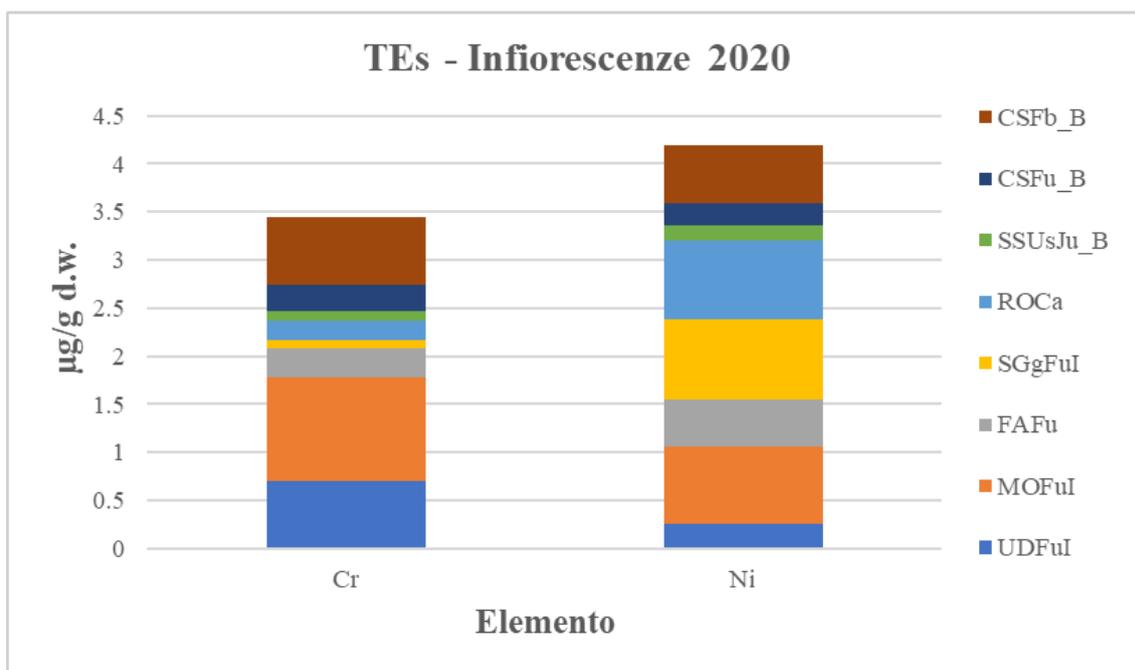
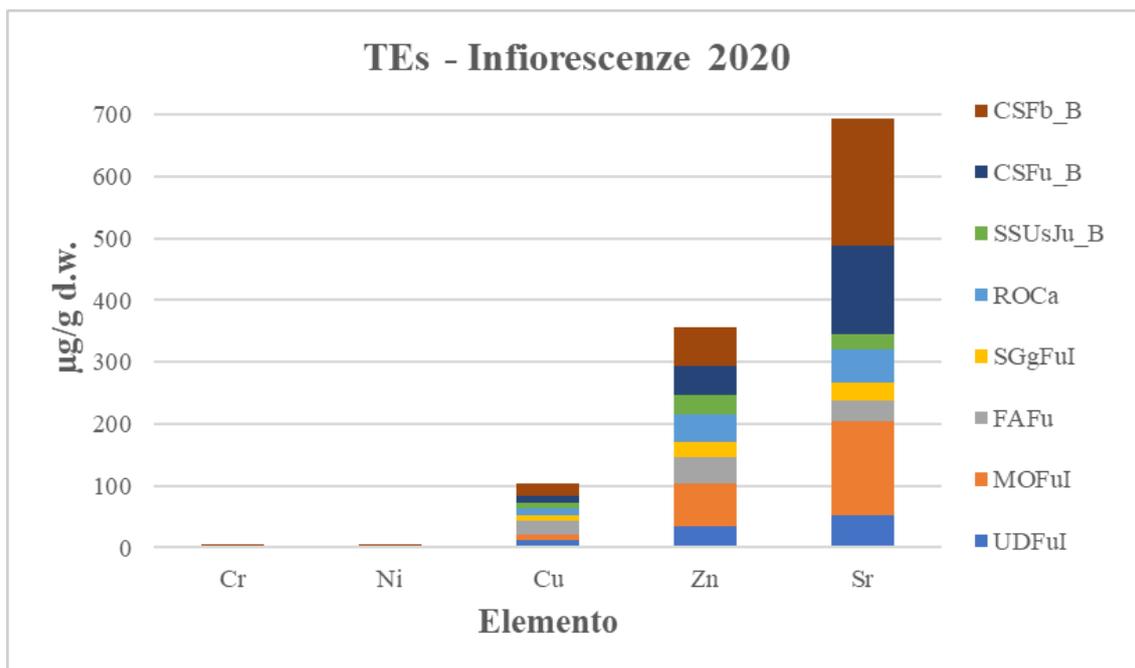
**Figura 50:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di radici raccolti nel 2020. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.



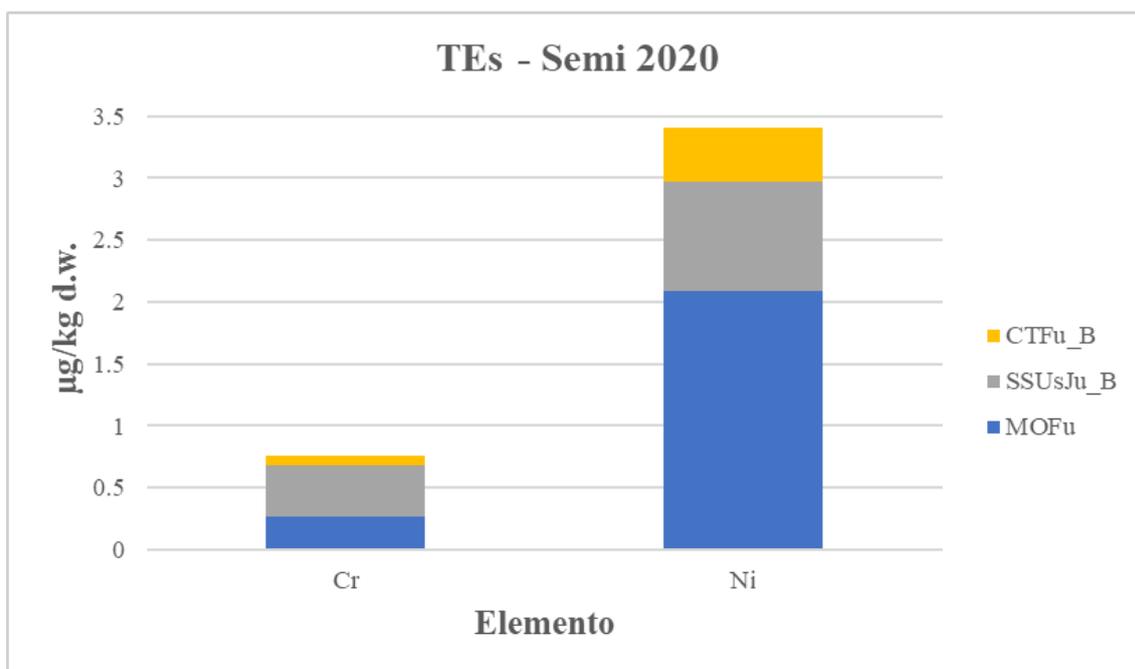
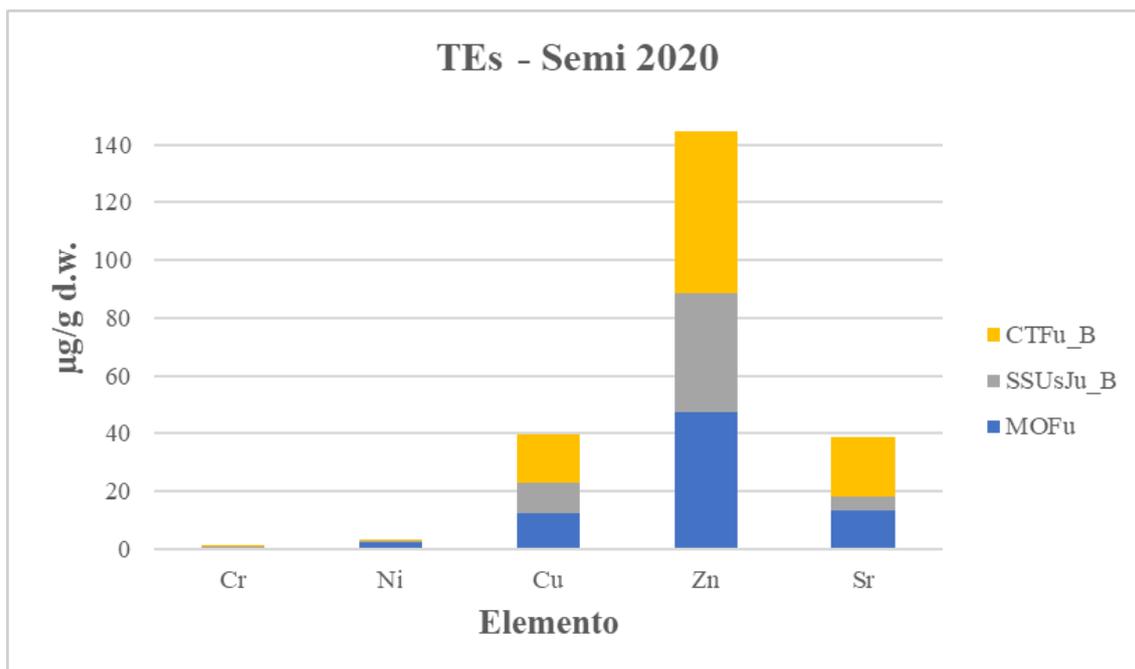
**Figura 51:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di stelo raccolti nel 2020. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.



**Figura 52:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di infiorescenze raccolti nel 2020. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

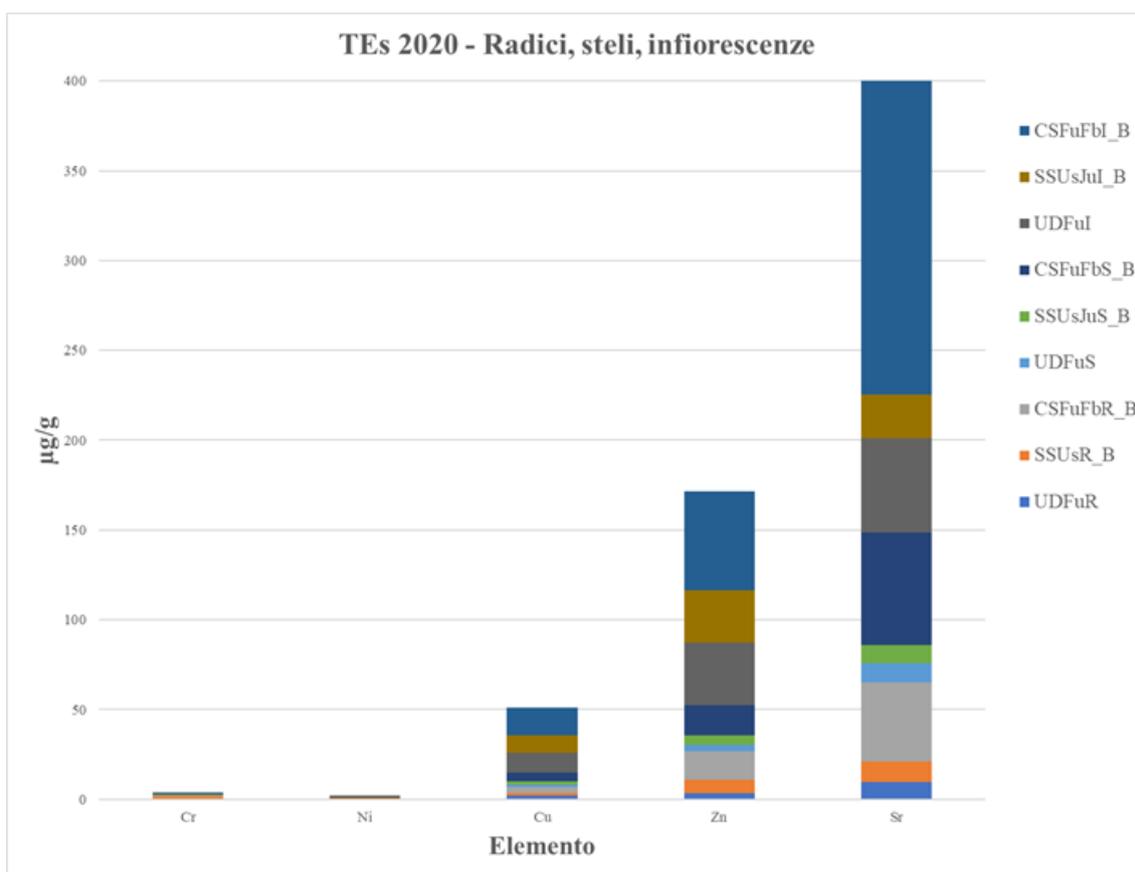
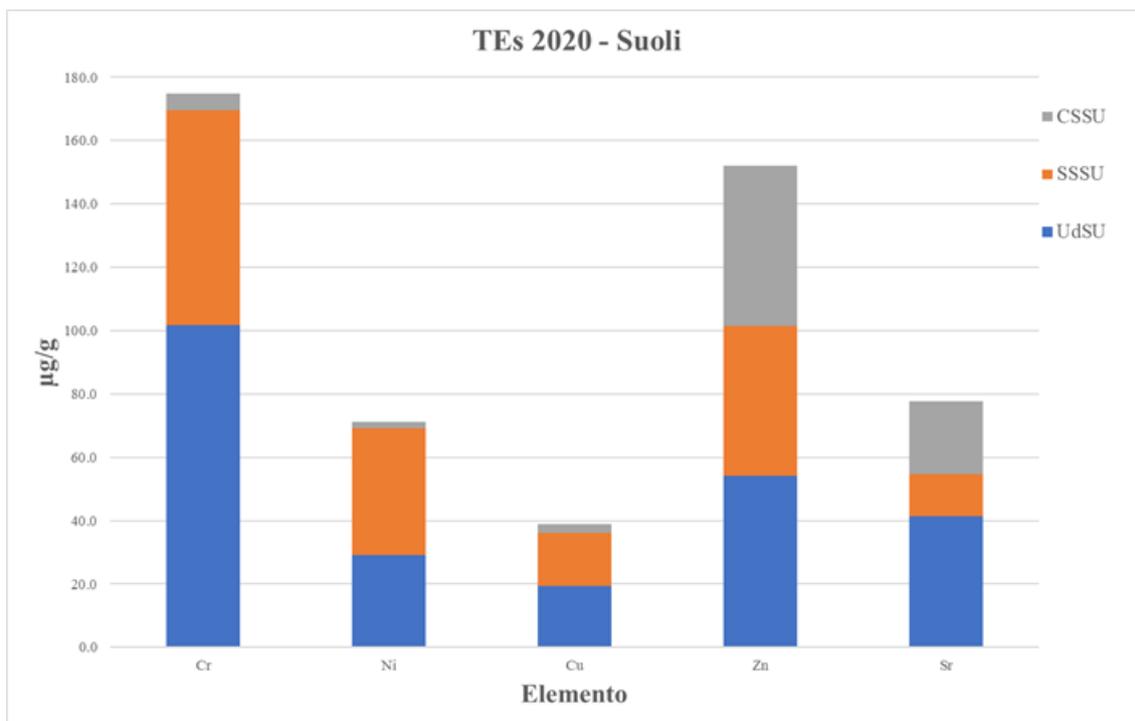
UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.



**Figura 53:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di semi raccolti nel 2020. I grafici sulla destra riportano i dati relativi a Cr, Ni e Cd con scala differente rispetto ai grafici di sinistra, per poter apprezzare meglio le variazioni di tali elementi nei campioni.

UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Usò 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.

Nella campagna 2020 è stato possibile ottenere campioni di suolo di alcune aree di provenienza delle piante di canapa per comprendere in modo più approfondito il comportamento di Sr, Zn, Cu e Ni nel passaggio dal suolo verso le parti apicali della canapa. Sono state prese in esame i siti di Udine, Sassari e Camigliatello Silano, come riportato in [Figura 54](#).



**Figura 54:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di suolo (sopra) e di radici, steli e infiorescenze raccolti nel 2020 per le aree di Udine, Sassari e Camigliatello Silano.

UD=Udine, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.

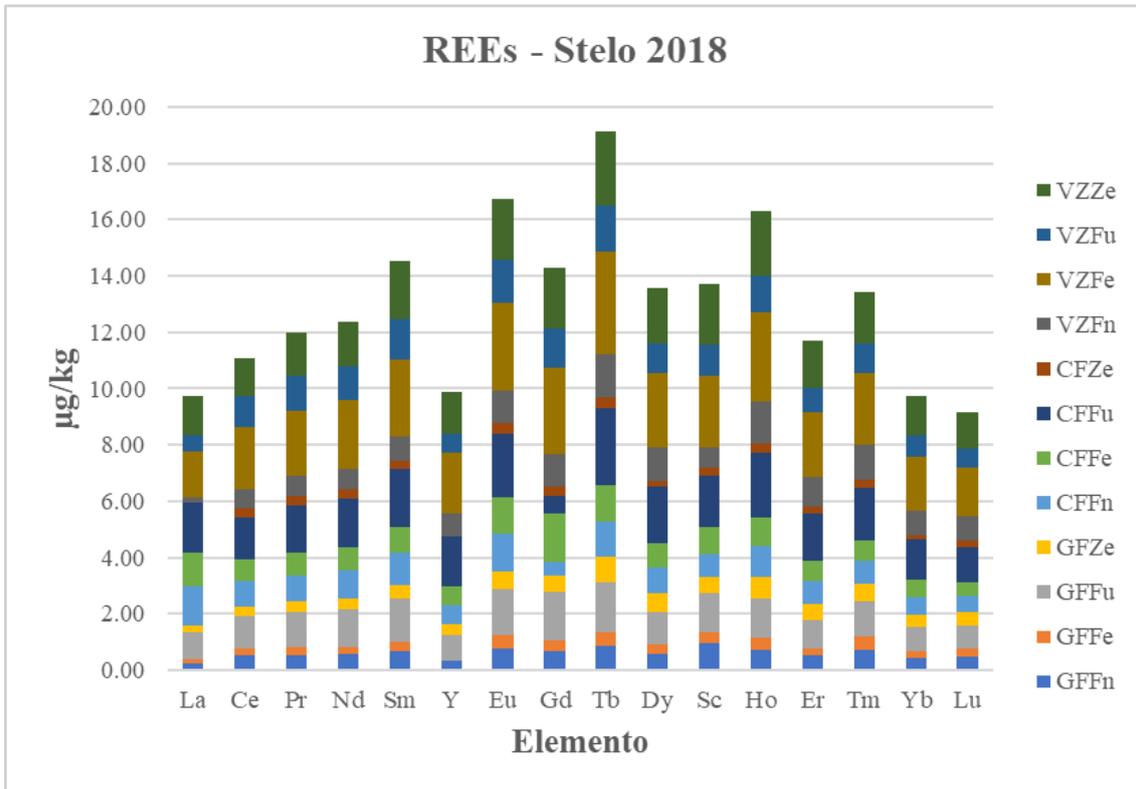
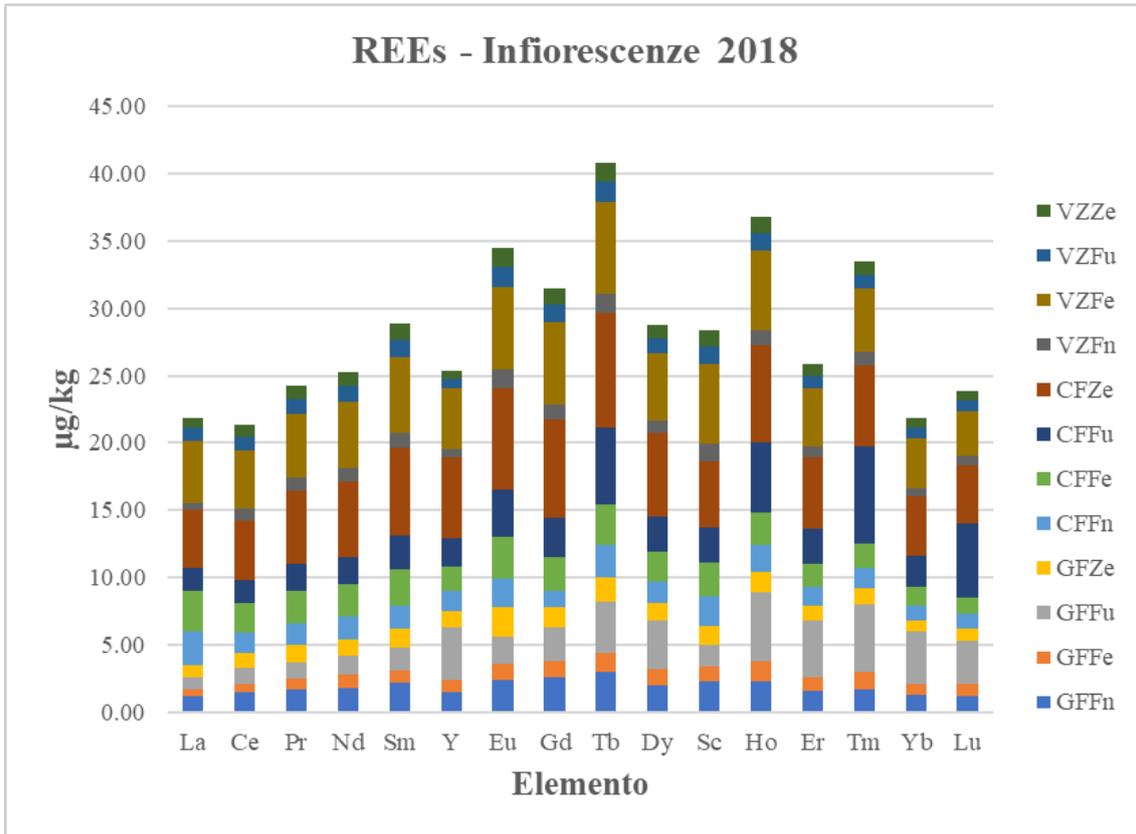
Cr e Ni per la maggior parte rimangono nel suolo, Sr, Zn e Cu fanno registrare concentrazioni maggiori nella pianta rispetto al suolo. Il comportamento di Cr, Cu e Zn è in linea secondo quanto riportato per la *Cannabis sativa* da [Placido et al. \(2022\)](#). Ancora una volta, lo Sr si conferma un elemento interessante: il grafico conferma l'assorbimento di tale elemento dal suolo ai tessuti della canapa ([Hoseini et al., 2012](#)) ed essendo un elemento collegato alle caratteristiche geolitologiche della zona di provenienza può essere un fattore discriminante dal punto di vista della tracciabilità spaziale ([Aguzzoni et al., 2020](#); [Zuliani et al., 2020](#)).

Altra informazione utile è il tasso di trasferimento dal suolo alla pianta (TF=*Transfer Factor*, calcolato secondo [Mirecki et al., 2015](#)): esso si presenta sempre  $> 1$  nel rapporto *Conc. Infiorescenza/Conc. Suolo* per i tre siti ed è particolarmente enfatizzato per Camigliatello Silano.

Infine, come già osservato precedentemente, le concentrazioni di Sr, Cu e Zn sembrano essere funzione della provenienza del campione: ad esempio Camigliatello Silano (CS) presenta generalmente le concentrazioni maggiori per ogni parte considerata per tutti e tre gli elementi.

#### 4.2.2 Terre rare (REEs)

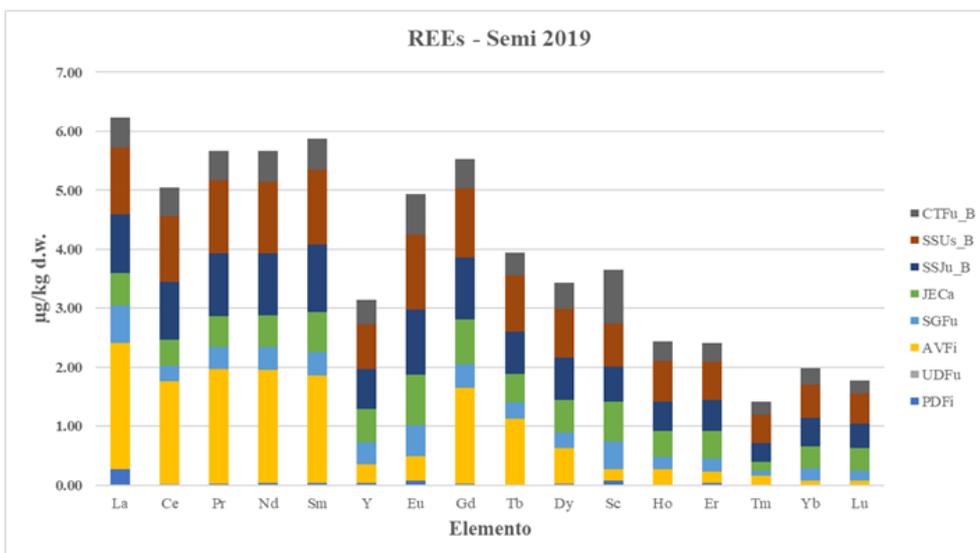
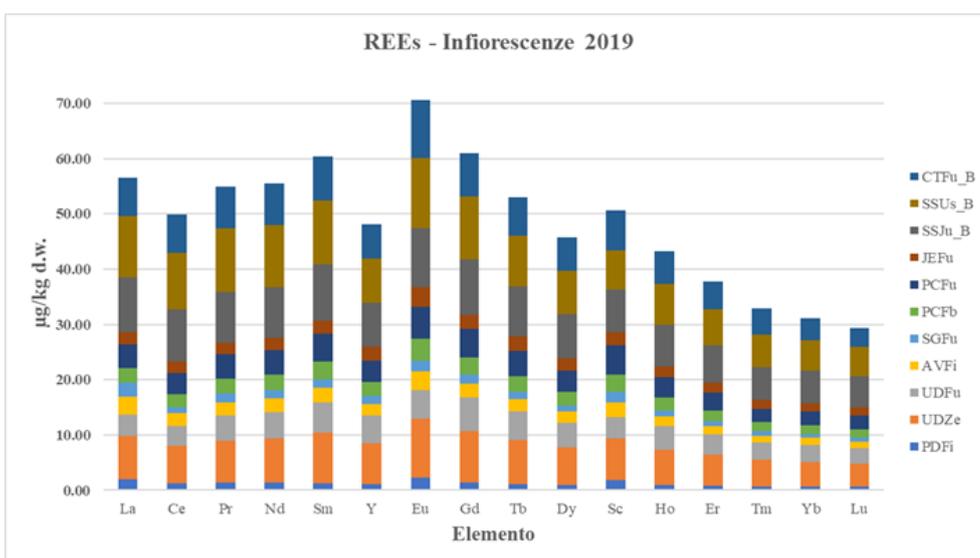
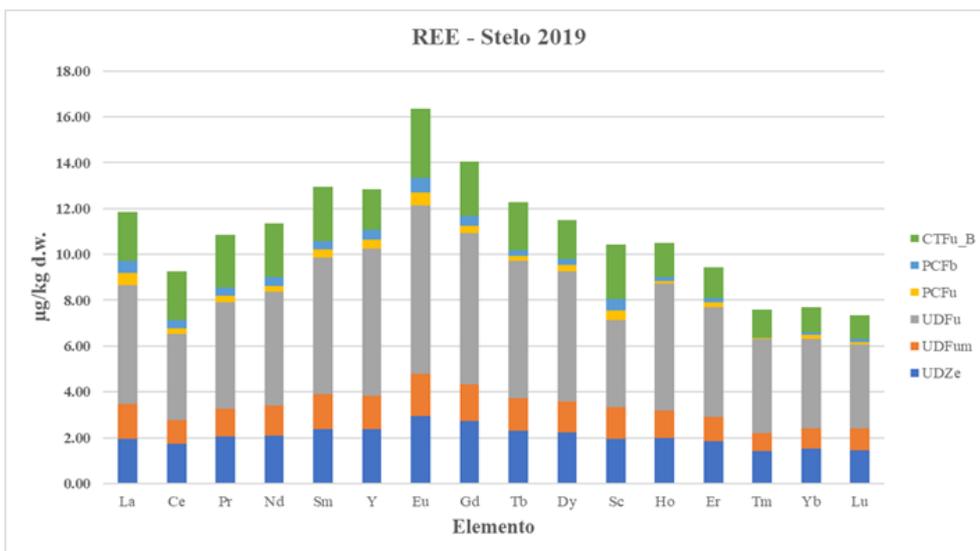
Nel presente paragrafo verranno commentati i dati ottenuti dalle analisi delle REEs dei campioni raccolti nel 2018, 2019 e 2020. Per quanto concerne i campioni del 2018, di seguito si riporta il grafico relativo alle infiorescenze e agli steli ([Figura 55](#)), mentre i valori normalizzati sono riportati in [Appendice \(A.4 in appendice\)](#). Da un primo ai grafici si nota come la concentrazione delle REEs sia mediamente più elevata nelle infiorescenze ( $\Sigma 452,87 \mu\text{g/kg}$ ) rispetto agli steli ( $\Sigma 207,42 \mu\text{g/kg}$ ). Altro dato interessante è la predominanza di terre rare pesanti (HREEs) e medie (MREEs), sia per le infiorescenze sia per gli steli, sulle leggere (LREEs) (dato confermato anche dalle sommatorie, come riportato in [Tabella A.4](#)). Osservando i grafici di [Figura 55](#) si apprezza un dato utile ai fini della tracciabilità geografica: i campioni di Verzegnis e Campofornido (biologico) presentano le concentrazioni maggiori per tutti gli elementi delle terre rare considerate (per infiorescenze e per steli), cosa che li potrebbe caratterizzare rispetto al sito di Gemona del Friuli (come già evidenziato nel paragrafo precedente per gli elementi in traccia). Inquadrando i singoli elementi, spicca su tutti il Tb, seguito da Eu e Ho. La presenza di Tb può essere collegata al suo impiego come semiconduttore, mentre l'Ho viene utilizzato nelle tecnologie nucleari e nell'elettronica ([Baron, 2020](#)). Eccetto l'Eu, una delle terre rare più abbondanti ed elemento che gioca un ruolo essenziale nelle piante, Tb e Ho potrebbero essere dei *markers* dell'inquinamento ambientale di una specifica zona e quindi impiegabili quali "traccianti" geografici.



**Figura 55:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) degli elementi in traccia di infiorescenze (sinistra) e steli (destra) dei campioni di canapa raccolti nel 2018, suddivisi in LREE (Light Rare Earth Elements), MREE (Medium Rare Earth Elements) e HREE (Heavy Rare Earth Elements).

GF=Gemona del Friuli (UD), CF=Campoformido (UD), VZ=Verzegnis (UD), Fn=Ferimon, Fe=Fedora 17, Fu=Futura 75, Ze=Zenit.

Relativamente alle varietà, degne di nota sono la Fedora nel sito di Verzegnis, e la Zenit per Campofornido; entrambe mostrano le concentrazioni più alte per infiorescenze e per steli. Passando alle terre rare (REEs) dei campioni del 2019 (vedi [Tabella A.5](#) per i valori normalizzati), sotto si riportano i grafici divisi per parte della pianta ([Figura 56](#)) divisi secondo le terre rare *Light* (LREEs), *Medium* (MREEs) e *Heavy* (HREEs). Seppur non tutti i siti di campionamento siano completi di tutte le parti della canapa, è utile osservare dalle sommatorie riportate in Appendice ([Tabella A.5](#)) la predominanza delle MREEs (soprattutto nelle radici), come accade per i campioni del 2018. Seguono le LREEs, di poco sotto la concentrazione delle terre rare medie. Tralasciando le radici, rappresentate solamente dai siti di Caltagirone e Udine, i grafici relativi allo stelo, alle infiorescenze e ai semi ([Figura 56](#)) mostrano andamenti per i singoli elementi che si ripetono per tutti i campioni. Negli steli la distinzione tra i siti di campionamento è piuttosto netta, in quanto Udine ha le concentrazioni più elevate (per tutti e tre i campioni), seguito da Caltagirone (colore verde), mentre Piacenza presenta concentrazioni di molto inferiori, ma comunque distinguibili. Anche nelle infiorescenze, la parte della pianta di canapa che mostra le concentrazioni maggiori di terre rare, si possono notare delle variazioni: in questo caso Sassari mostra le concentrazioni più alte (colore grigio e marrone), seguito in ordine decrescente da Caltagirone (CT), Udine (UD), Piacenza (PC), Jesi (JE), Alta vigolana (AV), Seren del Grappa (SG) e infine Predaia (PD). Nei semi, il campione di Udine, che verrà considerato un *outlier* (UDZe, colore arancione) mostra valori sono molto più alti rispetto agli altri siti e questo potrebbe essere dovuto a diversi fattori, che necessitano di una analisi più approfondita. Escluso il campione UDZe, è Sassari a presentare la concentrazione più elevata nei semi, seguito da Caltagirone, Alta Vigolana e Jesi, Seren del Grappa e Predaia. Da sottolineare che il campione di Alta Vigolana (AV) presenta elevati valori di concentrazione nelle terre rare leggere (LREEs), fattore che potrebbe essere discriminante per la tracciabilità geografica.



**Figura 56:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g/kg}$ ) degli elementi in traccia di stelo, infiorescenze e semi dei campioni di canapa raccolti nel 2019.

PD=Predaia (TN), UD=Udine, AV=Altopiano della Vigolana (TN), SG=Seren del Grappa (BL), PC=Piacenza, JE=Jesi (AN), SS=Sassari, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Usò 31, m=fertilizzazione organica, \_B=certificato biologico.

Il calcolo delle anomalie  $\partial Ce$  e  $\partial Eu$  (Figura 57) evidenzia le anomalie di alcuni campioni, soprattutto per l'Eu. I campioni degni di nota sono Piacenza per lo stelo, PCFu ( $\partial Ce=1,3$  e  $\partial Eu=1,7$ ) e PCFb, ( $\partial Eu=1,7$ ), Predaia per l'infiorescenza ( $\partial Eu=1,8$ ) e per i semi ( $\partial Eu=2,8$  – che mostra anche un impoverimento per il Ce ( $\partial Ce=0,3$ ) ed infine Alta Vigolana che mostra un depauperamento del Ce, con un valore di  $\partial Ce$  pari a 0,2 per i semi. Anche le anomalie  $\partial Ce$  e  $\partial Eu$  possono fornire dati utili ai fini di una tracciabilità geografica delle piante.

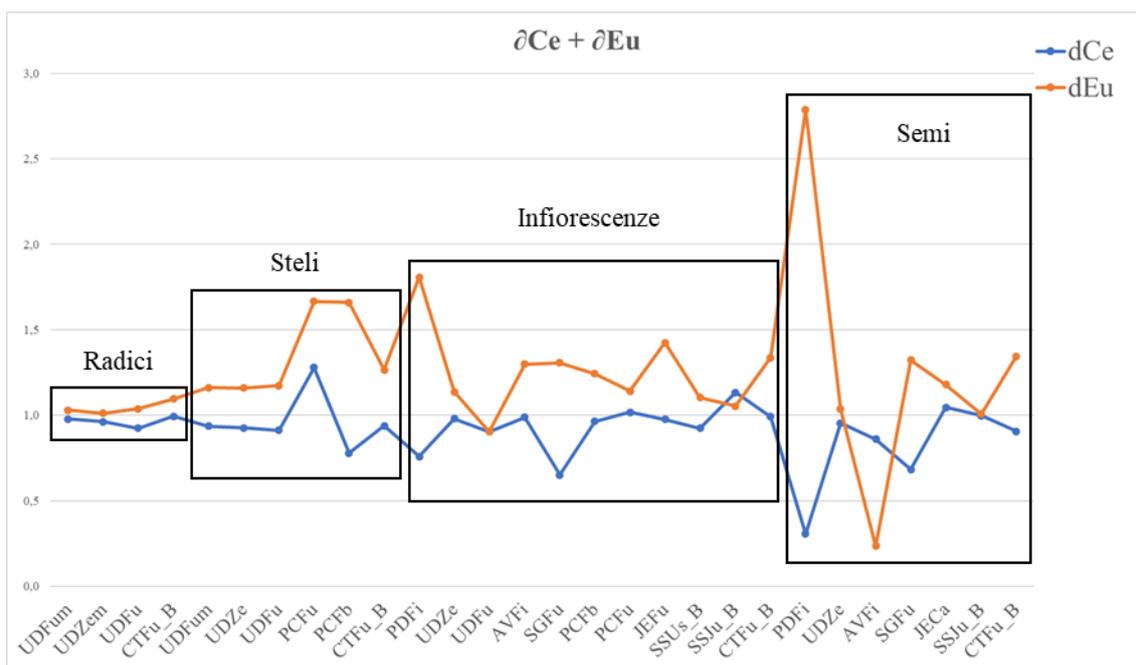
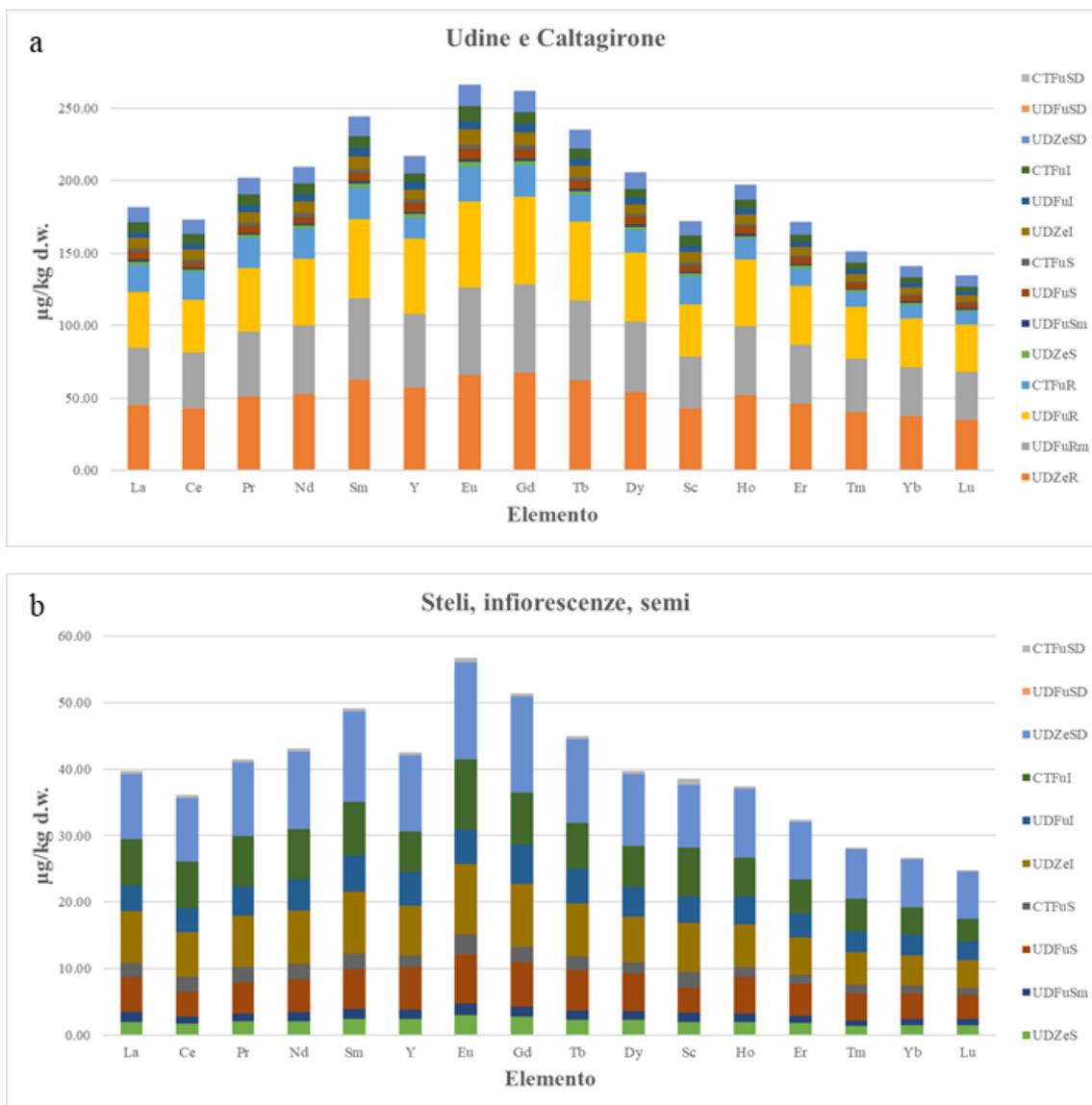


Figura 57: Anomalie del Ce (linea blu) e dell'Eu (linea arancione) calcolate per i campioni di radici, stelo, infiorescenze e semi.

Per Caltagirone e Udine, i siti di cui sono state campionate tutte le parti della pianta, si riporta un focus (Figura 58) per evidenziare le differenze nell'assorbimento delle terre rare passando dalle radici ai semi. Le radici sono la parte della pianta di canapa che più accumula terre rare per entrambi i siti e Caltagirone mostra concentrazioni inferiori rispetto a Udine, potenziale indice di una minor concentrazione di REEs nel sito siciliano. Nel grafico "b", dove sono state escluse le radici, si osserva che la distribuzione delle terre rare è maggiore verso le parti apicali della canapa, ma senza osservare particolari differenze tra le due aree. Differenze significative si notano nei semi: Udine (colore azzurro) mostra elevate concentrazioni, maggiori rispetto alle infiorescenze, mentre Caltagirone (colore grigio chiaro) riporta concentrazioni molto basse.



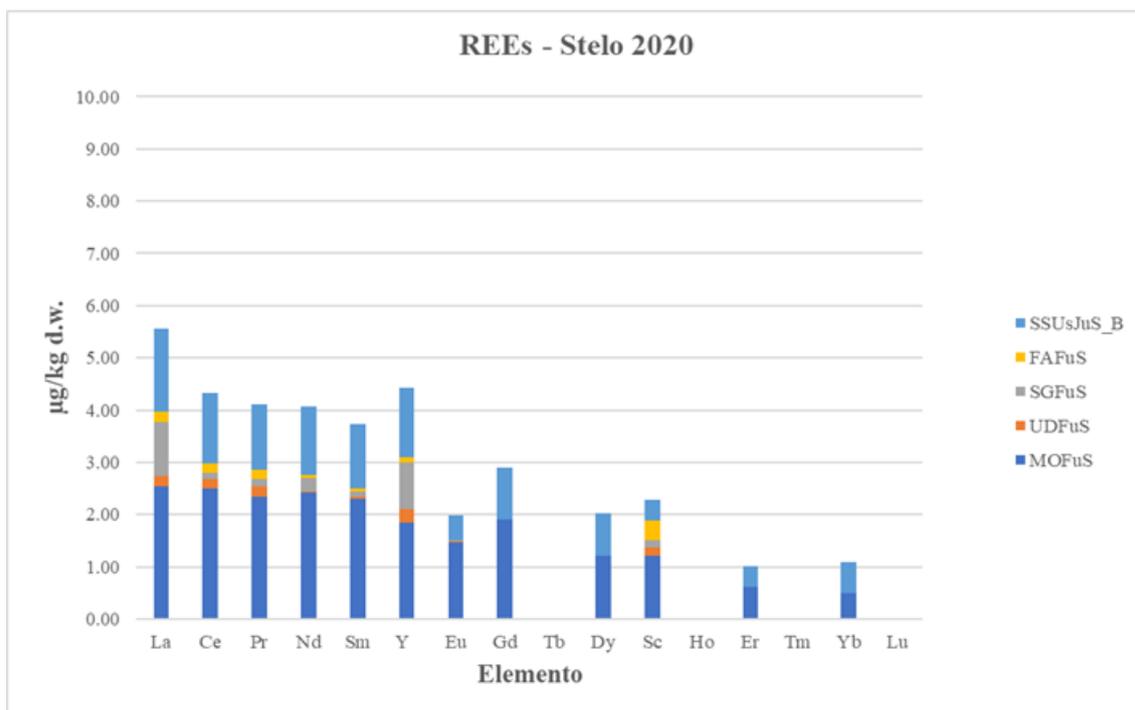
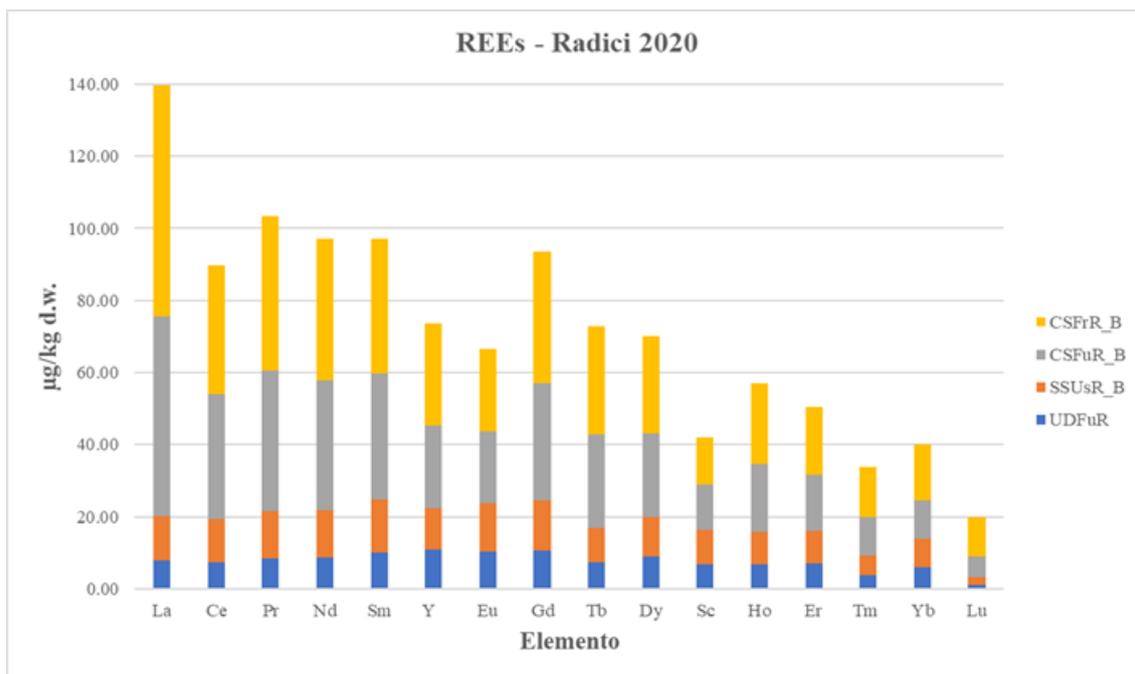
**Figura 58:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) degli elementi in traccia di tutte le parti campionate a Udine e Caltagirone nel 2019. Nel grafico in alto (a) sono state riportate tutte le parti (radice, stelo, infiorescenze, semi), mentre in quello sotto (b) sono state eliminate le radici per comprendere meglio la distribuzione degli elementi.

UD=Udine, CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, R=Radici, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, <sub>m</sub>=fertilizzazione organica.

Passando alle terre rare dei campioni 2020 (vedi [Tabella A.6](#) per i valori normalizzati), non tutti i siti di campionamento sono completi di tutte le parti della canapa: i campioni più abbondanti dal punto di vista numerico appartengono alle infiorescenze e agli steli, mentre radici e semi sono stati raccolti solo in determinate zone. Il campione Caltagirone Infiorescenza (CTFu\_B) non verrà considerato nelle rappresentazioni grafiche, in quanto *outlier*. Dalle [Figure 59-60](#) si evince come le terre rare leggere (LREEs) siano predominanti rispetto alle altre e ciò viene confermato dalle sommatorie riportate in appendice nella [Tabella A.6](#).

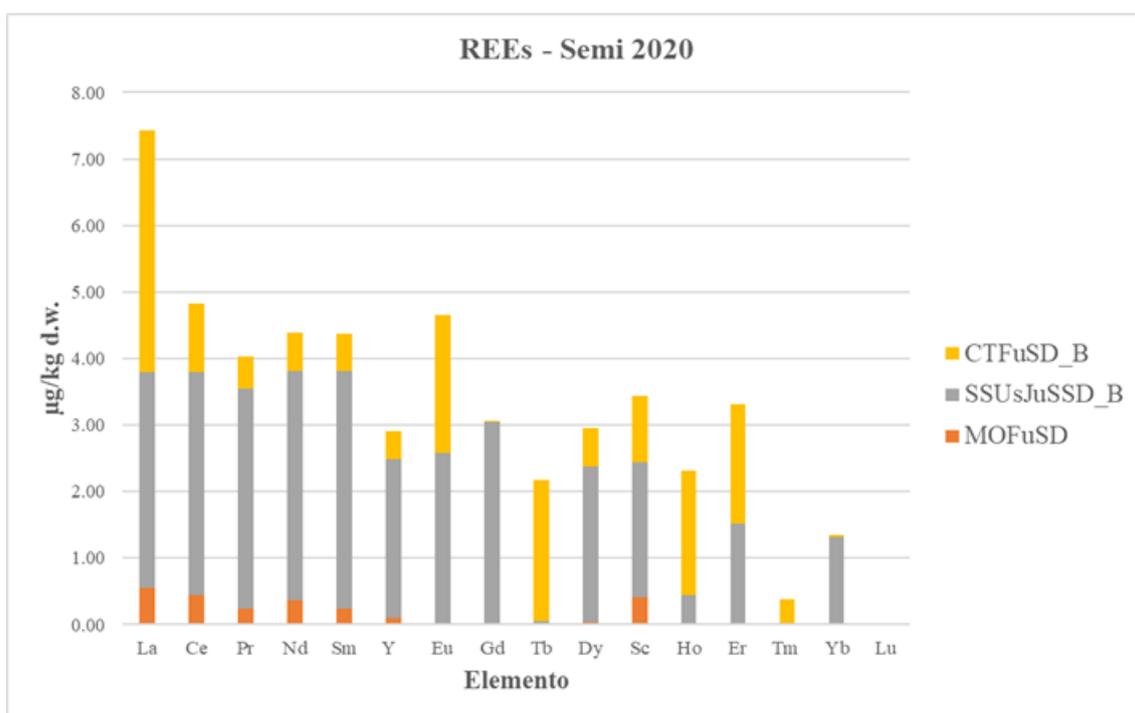
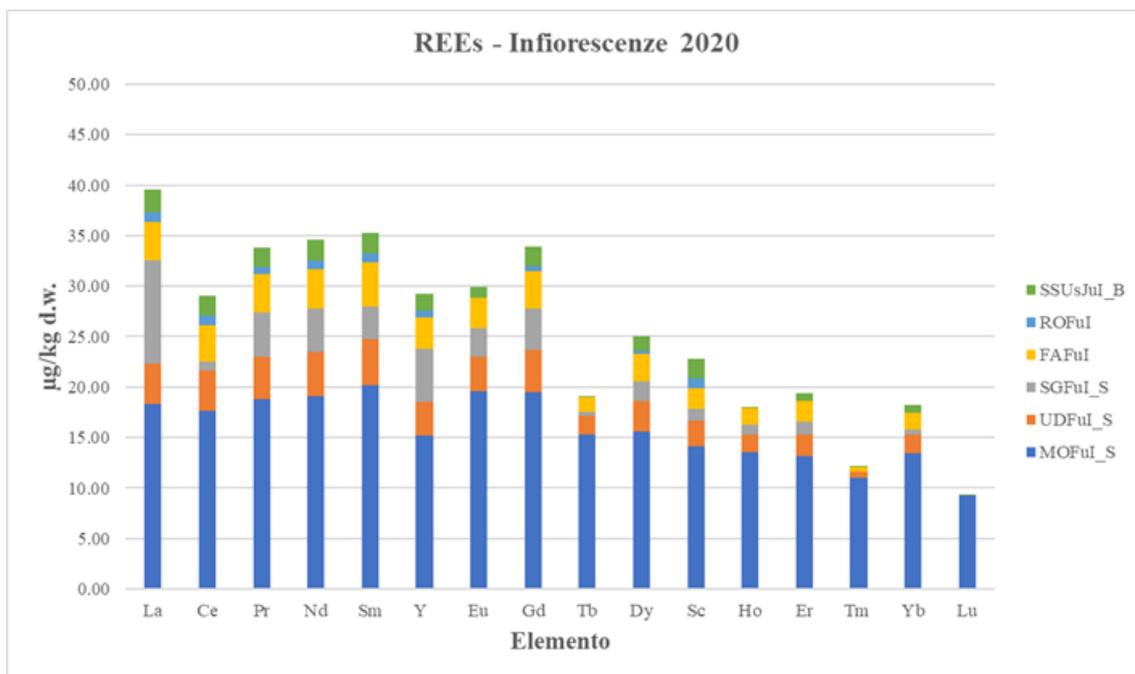
In generale, come già commentato per i campioni del 2019, le terre rare seguono questo andamento: concentrazioni che si abbassano da radice a stelo, concentrazioni che si alzano notevolmente da stelo

a infiorescenze, mentre nei semi si registrano concentrazioni di REEs irrisorie. Analizzando i grafici a colonne di radici, stelo e infiorescenze, si osserva come le concentrazioni di REEs possano fornire informazioni sulla tracciabilità spaziale, come già osservato per gli elementi in traccia e in generale per le analisi dell'anno 2019. Le concentrazioni più elevate corrispondono sempre al sito di Camigliatello Silano (CS). Seguono le aree di Monno (MO), Sassari, Udine e via via le altre con concentrazioni sempre minori. Le concentrazioni nelle piante di canapa possono essere funzione delle composizioni degli strati rocciosi e delle condizioni meteorologiche dell'area considerata ([Kotelnikova et al., 2021](#); [Migaszewski & Gałuszka, 2015](#)). Nei semi si osserva un comportamento differente (anche se i campioni esaminati sono solo tre: Camigliatello Silano (giallo) mostra concentrazione altalenanti negli elementi, Sassari (grigio) presenta le concentrazioni più elevate, mentre Monno quelle minime (in arancione)).



**Figura 59:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) degli elementi in traccia di radici e stelo dei campioni di canapa raccolti nel 2020.

UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.



**Figura 60:** Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) degli elementi in traccia di infiorescenze e semi dei campioni di canapa raccolti nel 2020.

UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 3I, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.

Per quel che riguarda il calcolo delle anomalie  $\partial\text{Eu}$  e  $\partial\text{Ce}$  dei campioni 2020, si riportano i risultati in (Figura 61): per entrambi gli elementi sono state notate delle deviazioni dal cosiddetto *smooth trend*; l'Eu mostra una anomalia negativa e i campioni mostrano tutti una deplezione, che risulta rilevante in alcuni campioni, come ad esempio Seren del Grappa Stelo (SGFuS), Fiesso d'Artico

(FAFuS), Rovigo Infiorescenza (ROCaI) e Monno Semi (MOFuSD) con valori prossimi allo zero. D'altra parte, per quanto concerne  $\delta Ce$ , si osserva un arricchimento nei campioni UDFuS e FAFuS, mentre si osserva un decremento nei campioni SGFuS e SGFuI. Le anomalie  $\delta Eu$  e  $\delta Ce$  possono quindi fornire delle informazioni utili alla tracciabilità geografica delle piante di canapa.

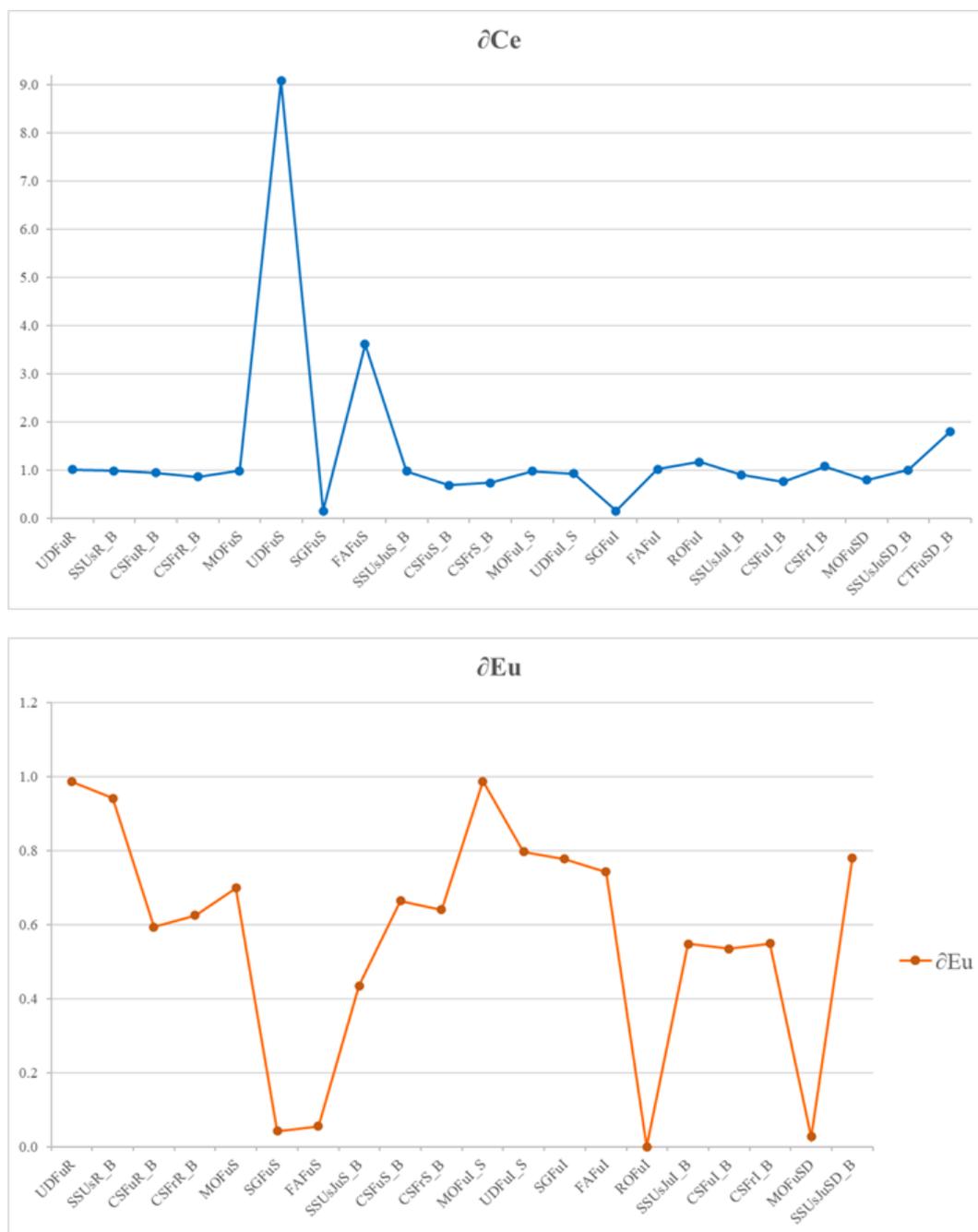


Figura 61: Anomalie del Ce (linea blu) e dell'Eu (linea arancione) calcolate per i campioni di radici, stelo, infiorescenze e semi del 2020.

UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Usso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.

Anche per le terre rare sono stati analizzati alcuni campioni di suoli, Sassari e Camigliatello Silano, per avanzare alcune ipotesi sul comportamento delle REEs nel passaggio dal suolo alla pianta (Figura 62).

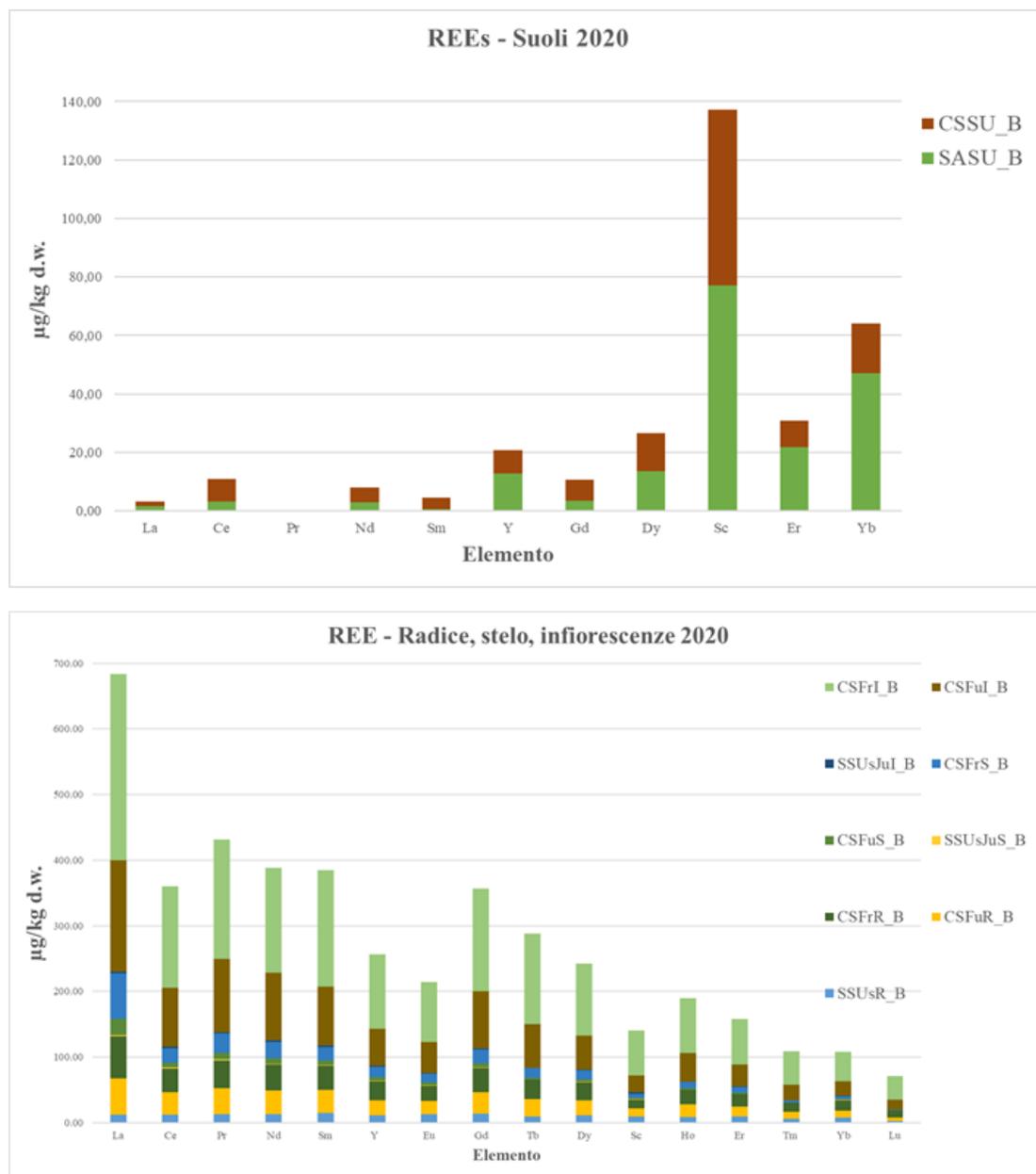


Figura 62: Grafici a colonne in pila che riportano le concentrazioni (µg/kg) delle terre rare dei campioni di suolo (sopra) e di radici, steli e infiorescenze (sotto) raccolti nel 2020 per le aree di Sassari e Camigliatello Silano.

SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ju=Jubileum, Us=Usa 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, \_B=regime biologico.

Nello specifico, nel suolo si nota una preponderanza di Sc, seguito da Yb e Er. Nella pianta si evince un grande aumento nella concentrazione di tutte le terre rare, tra cui spiccano le leggere (LREEs). Anche in questa situazione, come osservato per gli elementi in traccia e in generale nei campionamenti degli anni precedenti, si possono apprezzare concentrazioni maggiori nelle

infiorescenze e, più in generale, i due siti di Sassari e Camigliatello, evidenziano concentrazioni tra loro differenti, indice che la variabilità spaziale è potenzialmente funzione della concentrazione degli elementi.

Nel paragrafo successivo, verranno fatte alcune considerazioni finali sui dati ottenuti dall'analisi degli elementi in traccia e delle terre rare sui campioni del 2018, 2019 e 2020.

### 4.2.3 Considerazioni

Osservando i dati ottenuti dall'analisi degli elementi in traccia e delle terre rare dei campioni raccolti nel 2018, 2019 e 2020 si possono fare alcune considerazioni conclusive che verranno impiegate nell'analisi finale delle componenti principali ([Paragrafo 5.5](#)), assieme ai dati ottenuti dagli rapporti isotopici di C, N, H, O, S e dai rapporti isotopici dello Sr ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ). Bisogna sottolineare che i campionamenti non sono stati omogenei negli anni e nella tipologia di campioni a causa di diversi problemi dettati in primis dalla pandemia COVID-19.

Il quadro generale evidenzia come sia elementi in traccia, sia terre rare danno informazioni che sono collegabili, in via preliminare, alla distribuzione spaziale dei campioni esaminati. Le infiorescenze sono la parte della canapa che più concentra gli elementi in traccia e le terre rare considerate, ad esclusione degli elementi Cr e Ni nei campioni 2018, che accumulano maggiormente negli steli. Lo stronzio restituisce risultati importanti da tutte e tre le campagne (2018, 2019 e 2020) ed è sicuramente un elemento molto interessante in quanto, spesso, la sua concentrazione è ricollegabile alle caratteristiche geolitologiche di un'area e di conseguenza può essere utilizzato come fattore discriminante dal punto di vista della tracciabilità spaziale ([Aguzzoni et al., 2020](#); [Zuliani et al., 2020](#)). In minor entità anche Zn, Cu e Ni potrebbero essere associabili alle caratteristiche di un determinato sito. Altra informazione che si estrapola dall'ampia mole di dati analizzati deriva dai semi: in generale essi mostrano le concentrazioni minori sia per le TEs (in cui prevale lo Zn), sia per le REEs, indice che buona parte di questi elementi viene stoccata in steli ed infiorescenze.

Infine, l'analisi dei suoli dà alcuni importanti spunti sull'assorbimento di alcuni elementi da parte della canapa e di conseguenza sull'origine di certi elementi che vengono trovati nella pianta. Tutto questo, però, necessita di ulteriori e più ampi approfondimenti per comprendere meglio le dinamiche che potrebbero associare le concentrazioni di TEs e REEs alla tracciabilità spaziale dei campioni di canapa.

#### **4.2.4 “Distribution pattern of Rare Earth Elements in four different industrial hemp cultivars (*Cannabis sativa L.*) grown in Friuli Venezia Giulia, Italy”**

Per quanto riguarda i dati delle terre rare (REEs) relativi ai campioni del 2018, è stata prodotta e sottomessa alla rivista *Environmental Science and Pollution Research* di Springer una *Short Original Communication* dal titolo “**Distribution pattern of Rare Earth Elements in four different industrial hemp cultivars (*Cannabis sativa L.*) grown in Friuli Venezia Giulia, Italy**” i cui autori sono: Marco CALVI, Fabiana CORAMI, Marta RADAELLI, Sarah PIZZINI, Barbara STENNI. Il manoscritto è attualmente in fase di revisione.

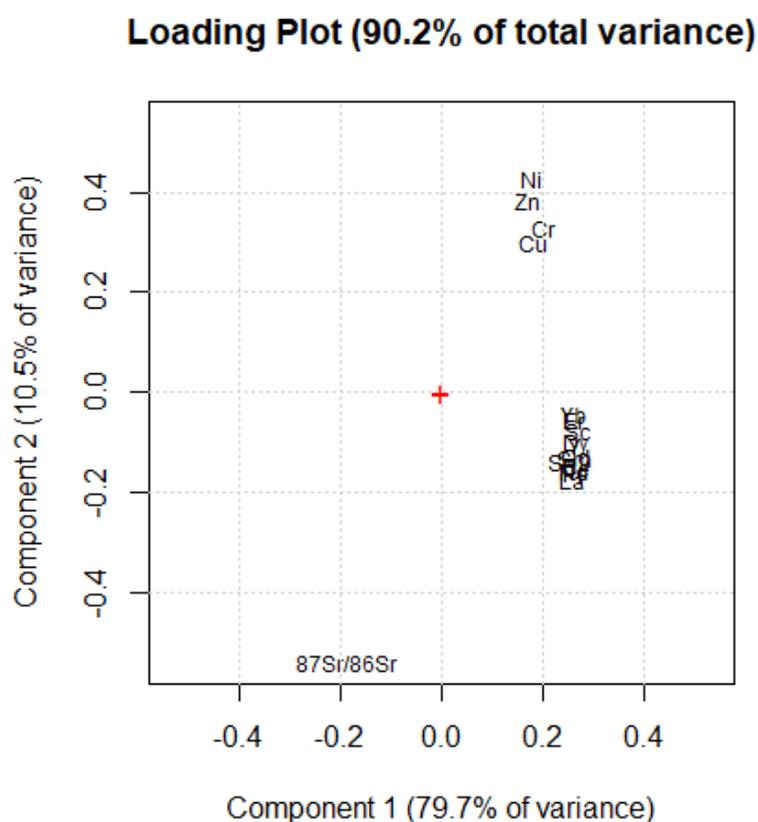
Nella *Short Communication* sono stati valutati i pattern qualitativi e quantitativi di distribuzione delle terre rare (REEs) nella canapa industriale italiana (*Cannabis sativa L.*) destinati all'uso alimentare. La concentrazione delle REE è stata valutata in infiorescenze e steli di quattro cultivar di canapa industriale (Fedora 17, Ferimon, Futura 75, e Zenit) coltivate in tre diverse aree del Friuli-Venezia Giulia. Le quattro varietà considerate sono state coltivate in regime convenzionale in due siti di campionamento (Gemona del Friuli e Verzegnis) e in regime biologico nel terzo (Campofornido). I risultati di questo studio preliminare ci hanno permesso di acquisire indicazioni utili e fornire nuovi dati su una coltura emergente ancora in fase di studio, con la possibilità di impiegare le REEs come strumento per futuri studi di tracciabilità.

Il mio ruolo in questo manoscritto è stato quello di raccogliere i campioni, seguire tutte le fasi di preparazione e digestione dei campioni e le analisi di laboratorio. Ho interpretato i dati analitici e scritto la maggior parte del manoscritto con la collaborazione degli altri co-autori. La versione integrale dell'articolo è stata inserita nella sezione Allegati ([Allegato 4](#)).

### 4.3 Analisi delle componenti principali

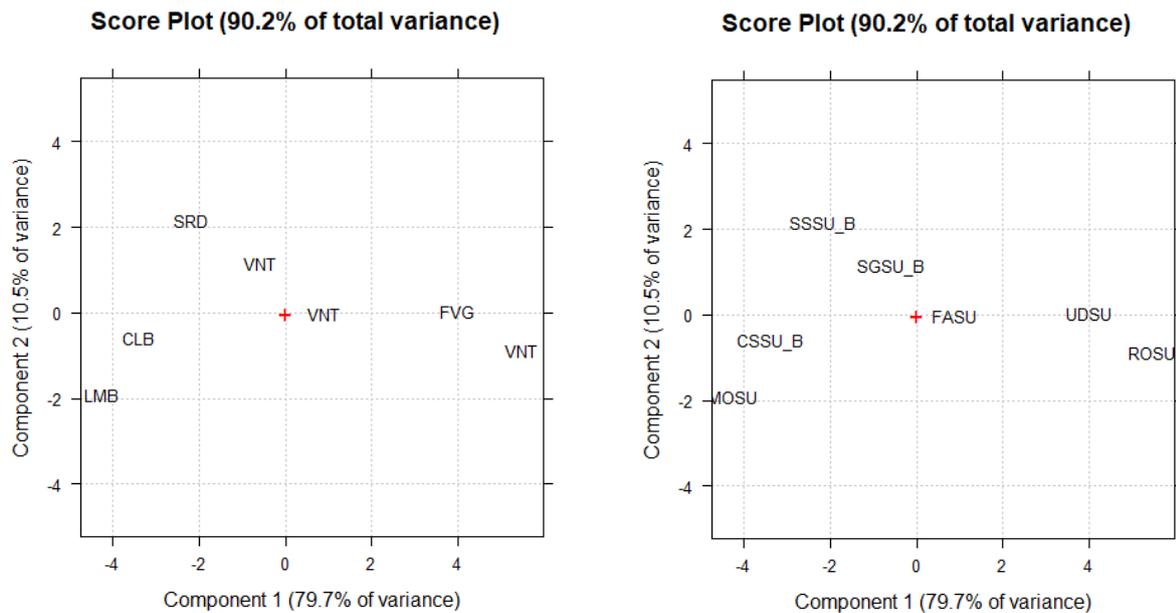
Le difficoltà di campionamento riscontrate durante il dottorato di ricerca, esposte nel [Paragrafo 3.1](#), non hanno permesso di ottenere, per ogni anno di campionamento ed area d'indagine considerata, un *dataset* a densità uniforme che potesse consentire l'applicazione dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA – *Principal Component Analysis*) all'intero *set* di dati ottenuti. Pertanto, per analizzare la struttura dei dati e la loro distribuzione nello spazio delle componenti principali sono state generate differenti matrici a dimensionalità via via crescente, come specificato nel seguito della discussione. Data la diversità numerica delle classi  $c$  prese in considerazione volta per volta (area di campionamento, regime di coltivazione, parte della pianta analizzata), i risultati statistici qui ottenuti sono da considerarsi preliminari ed indicativi, ma possono dimostrarsi comunque utili nel delineare alcuni aspetti chiave su cui impostare studi futuri che permettano, grazie anche al disegno sperimentale, un campionamento quantitativamente più omogeneo e robusto, tale da consentire delle analisi di classificazione per la tracciabilità della canapa e dei prodotti da essa derivati. Ogni matrice considerata è stata autoscalata ed è stata privata del campione di infiorescenze di Caltagirone raccolto nel 2020 (CTFu\_B), considerato un *outlier*, e dei campioni di olio, per i quali sono stati acquisiti solamente i dati relativi ai valori di  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ . L'*autoscaling* consiste nella centratura dei dati unita alla normalizzazione a varianza unitaria. Le nuove variabili così trasformate hanno quindi media pari a zero e deviazione standard pari a uno.

Una prima rapida indagine effettuata su una matrice  $7 \times 17$  contenente i soli campioni di suolo e, come variabili, le concentrazioni di TEs, ad esclusione del Cd, di REEs, ad esclusione di Eu, Tb, Ho, Tm e Lu, e il rapporto isotopico dello stronzio, ha evidenziato, come atteso, il ruolo chiave svolto dalle REEs e dallo stronzio nella caratterizzazione dei suoli. I gruppi di variabili considerate, infatti, sono risultate ben separate in prima (79,7% di varianza spiegata) e seconda componente principale (10,5% di varianza spiegata) come evidenziato dal *loading plot* di [Figura 63](#).



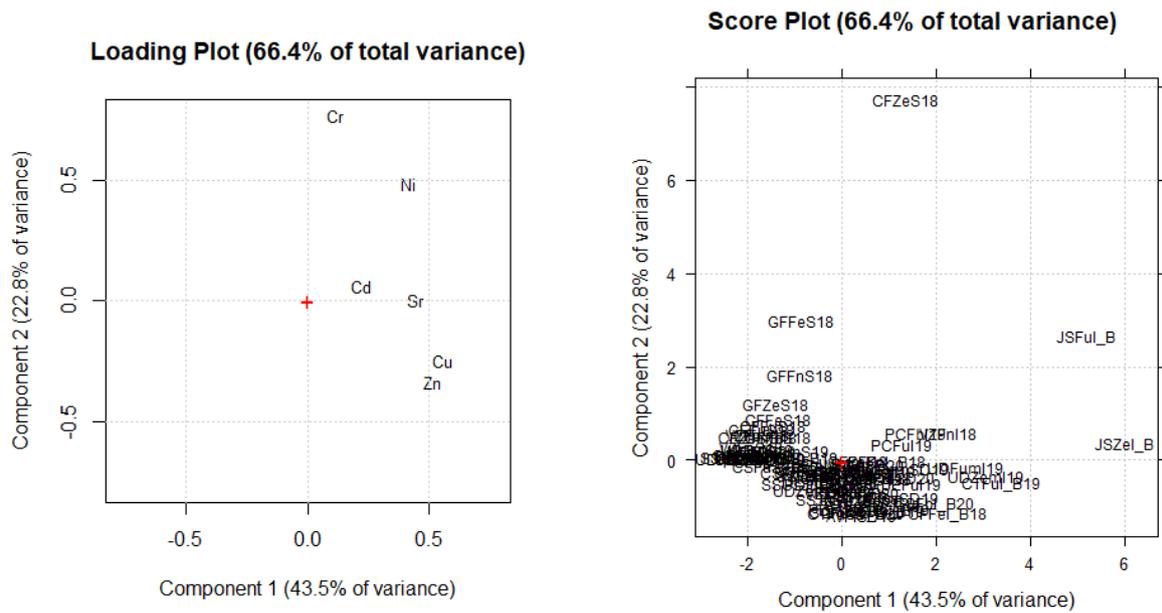
*Figura 63:* Loading plot delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui soli campioni di suolo.

Pur trattandosi di un'analisi condotta su un numero molto ristretto di campioni, le concentrazioni di REEs e il rapporto isotopico dello stronzio sono risultate variabili correlate opposte in prima componente principale, permettendo di separare il ridotto *set* di dati in funzione dell'area di campionamento. Gli *score plots* riportati in [Figura 64](#) mostrano, infatti, come il suolo di Udine (UDSU) e di Rovigo (ROSU) sia caratterizzato da un'alta concentrazione di REEs, contrariamente ai due campioni di suolo prelevati nei siti di campionamento in Lombardia (MOSU) e Calabria (CSSU\_B), che si caratterizzano invece per un valore più elevato di  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ . In questo contesto, il regime di coltivazione seguito nei diversi siti di campionamento non sembra presentare differenze statisticamente significative.

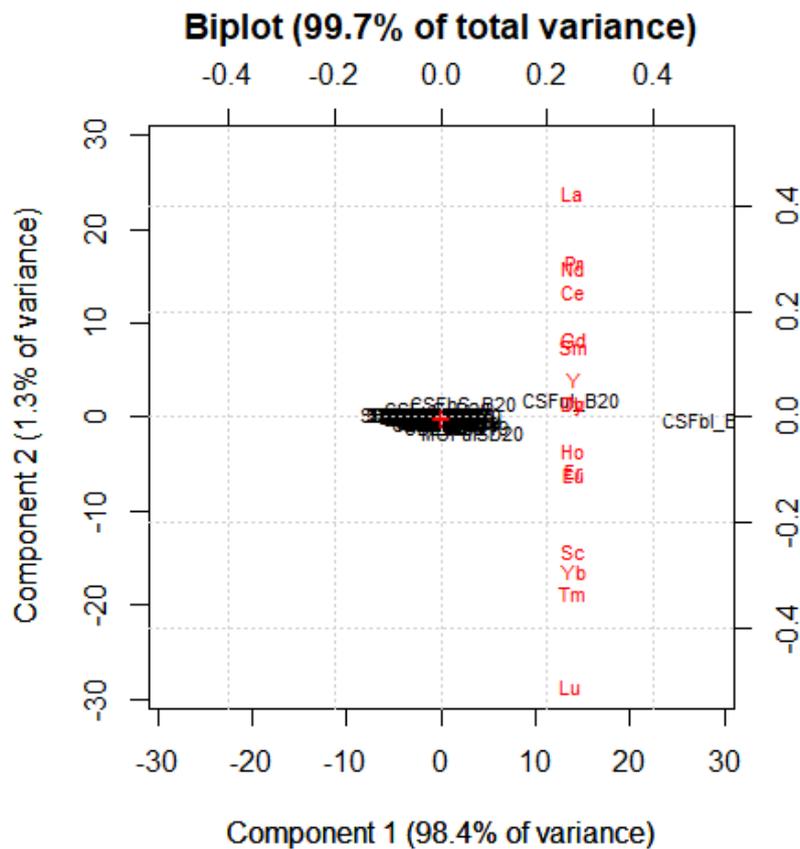


**Figura 64:** Score plots delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui soli campioni di suolo (SU), in cui vengono evidenziate a sinistra le regioni di campionamento (CLB = Calabria, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, SRD = Sardegna, VNT = Veneto) e a destra i siti di campionamento (CS = Camigliatello Silano, FA = Fiesso d'Artico, MO = Monno, RO = Rovigo, SG = Seren del Grappa, SS = Sassari, UD = Udine). *\_B* = campioni in regime di coltivazione biologico.

Considerando i soli campioni di stelo, infiorescenza e semi, che rappresentano le classi dimensionalmente maggiori e più omogenee tra quelle prese in considerazione in questo studio, la PCA applicata alla matrice 76x6 che considera come variabili i soli TE e quella applicata alla matrice 71x16 che considera come variabili le REE, non hanno evidenziato particolari e significative suddivisioni del *set* di campioni valutati. Nel primo caso (TEs come variabili; [Figura 65](#)) si differenziano i campioni di stelo campionati nel 2018 a Campofornido (CFZeS18) e a Gemona del Friuli (GFFeS18 e GFFnS18), che presentano valori molto positivi in seconda componente principale (22,8% di varianza spiegata), guidati soprattutto dall'elevata concentrazione di Cr e Ni per i campioni di Gemona del Friuli e dalla bassa concentrazione di Zn per il campione di Campofornido, così come i campioni di infiorescenze campionati nel 2018 a Jolanda di Savoia (JSFuI\_B e JSZeI\_B), quest'ultimi caratterizzati da elevati valori in prima componente principale (43,5% di varianza spiegata), verosimilmente correlati alle elevate concentrazioni di Sr, Ni, Cu e Zn rilevate in tali campioni ([Figura 65](#)). Nel secondo caso (REEs come variabili; [Figura 66](#)) sono invece i campioni di infiorescenze di Camigliatello Silano a differenziarsi dal resto del *dataset*, come già osservato nei grafici di [Figura 60](#) riportati nel [Paragrafo 4.2.2](#), dato il loro elevato contenuto di REEs ([Figura 66](#)), che concorrono in maniera uniforme a formare ben il 98,4% di varianza spiegata nella sola prima componente principale.



**Figura 65:** Loading plot (a sinistra) e score plot (a destra) delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo (S), infiorescenza (I) e semi (SD), considerando come variabili i soli Trace Elements (TEs).



**Figura 66:** Biplot delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni (in nero) di stelo, infiorescenza e semi, considerando come variabili (in rosso) i soli Rare Earth Elements (REEs).

Più interessante risulta l'applicazione della PCA alle stesse classi di campioni considerando però come variabili i rapporti degli isotopi stabili di H, C, N, O e S (matrice 74x5). I cinque valori isotopici considerati si differenziano infatti in tre diversi gruppi (Figura 67, grafico di sinistra), con la prima componente principale (78,7% di varianza spiegata) che separa il cluster formato da  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  da quello formato da  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ , mentre la seconda componente principale (16,7% di varianza spiegata) separa la variabile legata ai valori di  $\delta^{34}\text{S}$ . Tali campioni risultano nettamente separati in due differenti gruppi in prima componente principale (Figura 67, grafico di destra) in cui è possibile ravvisare delle differenze legate alle aree di crescita dei campioni presi in considerazione.

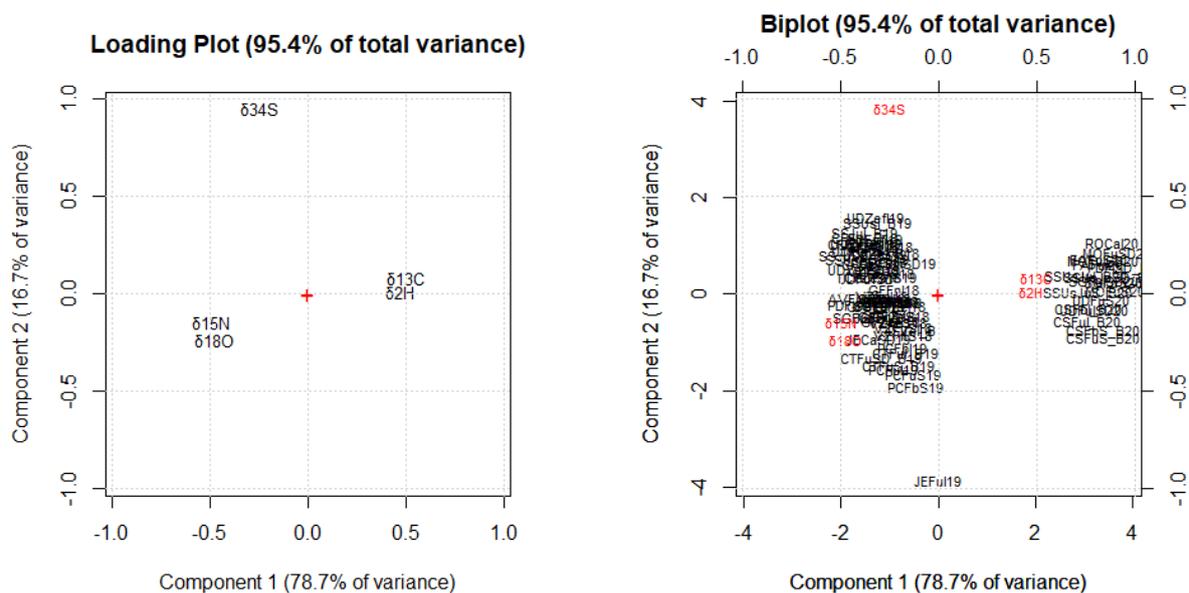
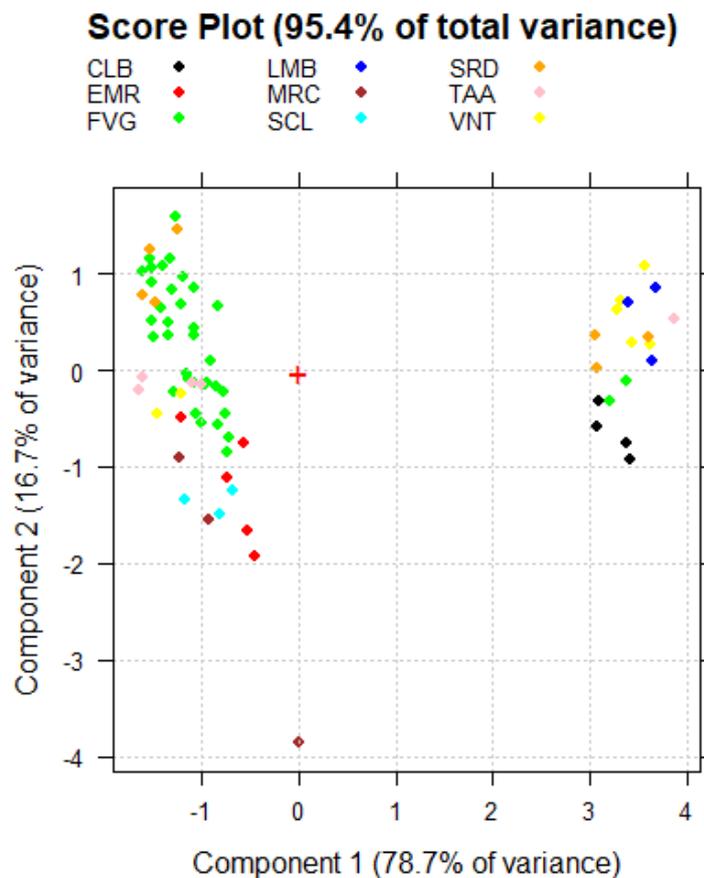


Figura 67: Loading plot (a sinistra) e biplot (a destra) delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni (in nero a destra) di stelo, infiorescenza e semi, considerando come variabili (in rosso a destra) i valori  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{34}\text{S}$ .

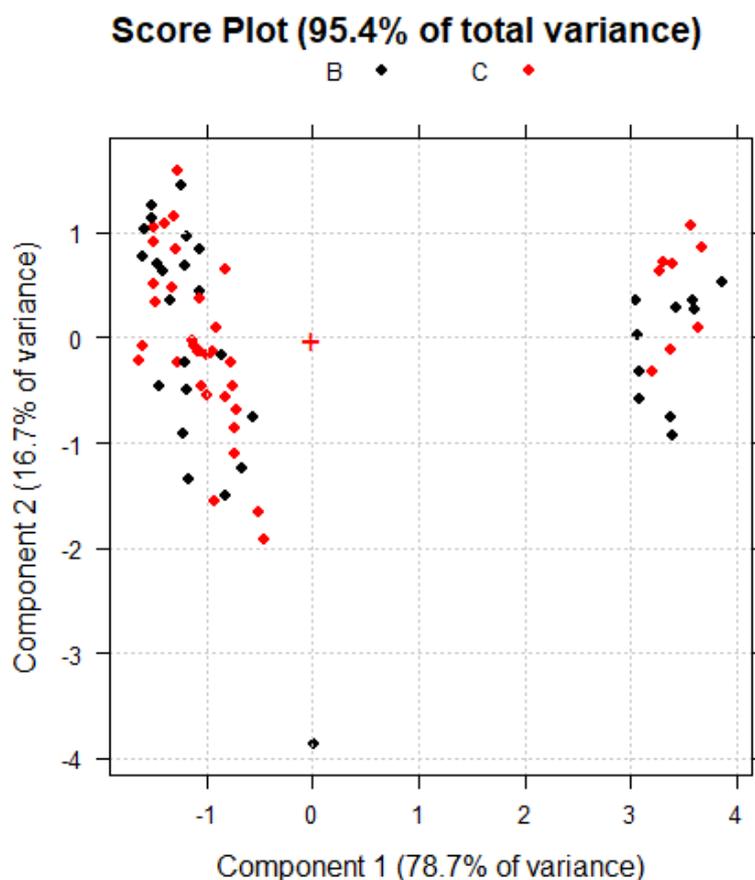
La Figura 68 mostra lo score plot ottenuto suddividendo i campioni in funzione della regione di campionamento: infatti, si può osservare come la quasi totalità dei campioni appartenenti ai siti del Friuli-Venezia Giulia (in verde) popoli il cluster di sinistra, caratterizzato da valori negativi della prima componente principale (e quindi da valori maggiormente positivi di  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ ), mentre tutti i campioni provenienti dalla Calabria (in nero) e dalla Lombardia (in blu) fanno parte del cluster di destra, caratterizzato da valori positivi della prima componente principale (e quindi da valori maggiormente positivi di  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ ). E' interessante notare come al cluster di sinistra appartengano anche i campioni provenienti dall'Emilia Romagna (in rosso), Sicilia (in azzurro) e Marche (in marrone), tra cui il campione-outlier di infiorescenza campionato a Jesi nel 2019 che, come già evidenziato precedentemente (Paragrafo 4.1), si caratterizza per valori maggiormente negativi di  $\delta^{34}\text{S}$ , che allargano la nube di campioni verso valori negativi della seconda componente principale

(verso il basso) e che possono essere, verosimilmente, condotti a differenze legate al substrato roccioso presente nell'area di campionamento.



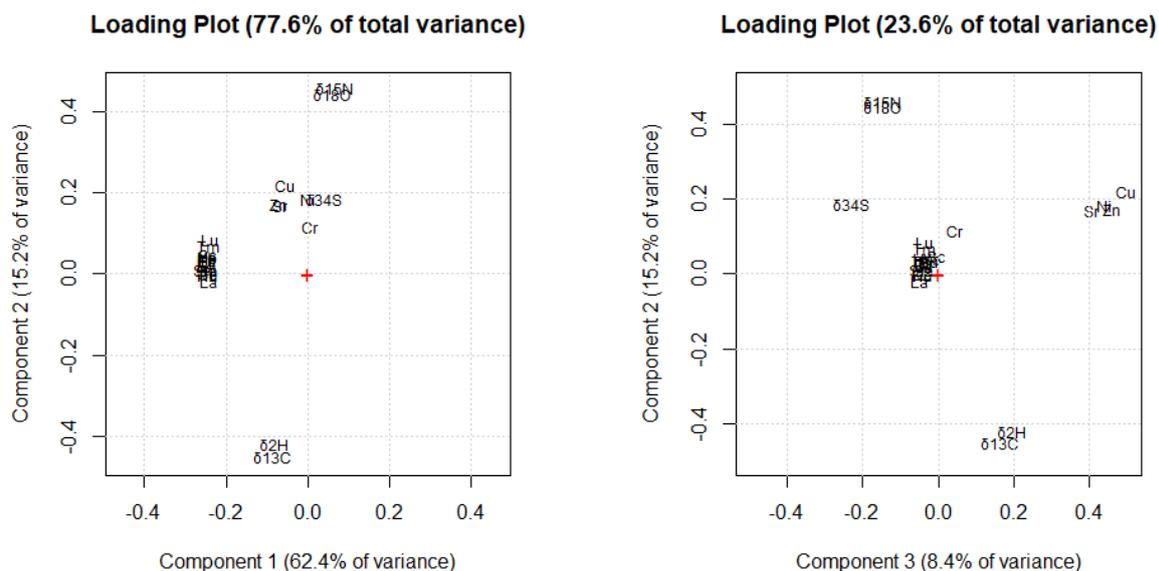
*Figura 68: Score plot delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando come variabili i valori  $\delta^2H$ ,  $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{15}N$ ,  $\delta^{18}O$  e  $\delta^{34}S$ , in cui vengono evidenziate le regioni di campionamento (CLB = Calabria, EMR = Emilia-Romagna, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, MRC = Marche, SCL = Sicilia, SRD = Sardegna, TAA = Trentino-Alto Adige, VNT = Veneto).*

Nonostante il valore di  $\delta^{15}N$  sia stato associato al regime di coltivazione applicato nell'area di campionamento considerata (come discusso nel [Paragrafo 2.1.2](#)), non è stato possibile, in questa sede, evidenziare una separazione tra campioni coltivati in regime biologico ([Figura 69](#), colore nero) e in regime convenzionale ([Figura 69](#), colore rosso), probabilmente per il ricorso, nei siti in biologico, della strategia di fertilizzazione che sfrutta la tecnica della rotazione colturale e l'impiego di piante leguminose che, fissando l'azoto atmosferico, abbassano i valori di  $\delta^{15}N$  della pianta analizzata, facendole così ricadere nel range delle coltivazioni a fertilizzazione convenzionale ([Bontempo et al., 2020](#)).



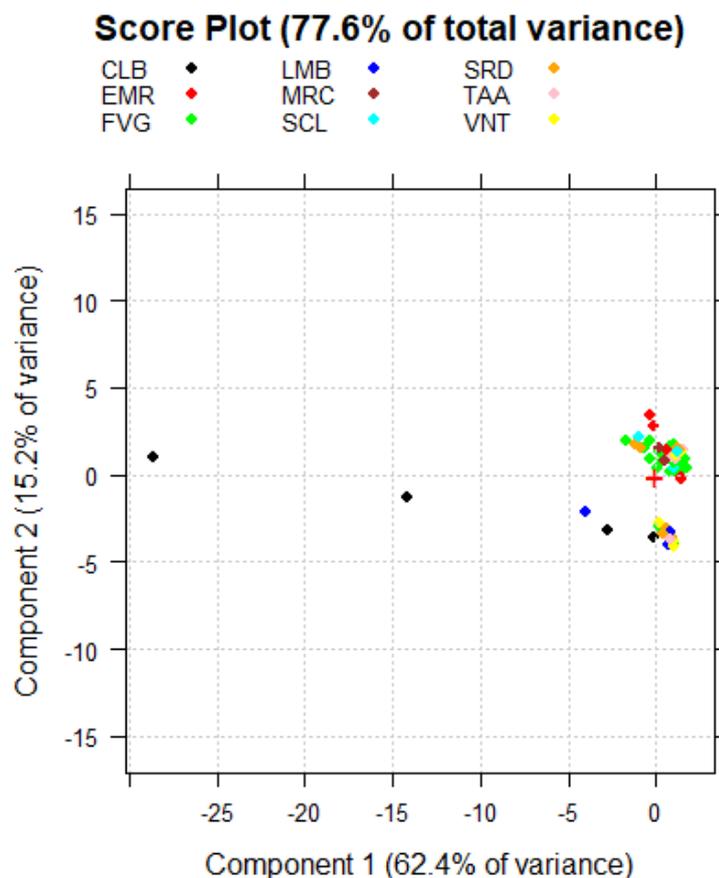
*Figura 69: Score plot delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando come variabili i valori  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{34}\text{S}$ , in cui vengono evidenziati i regimi di coltivazione applicati (B = Biologico, C = Convenzionale).*

Pur rammentando il carattere preliminare ed indicativo dell'analisi multivariata qui esposta, la stessa interessante separazione tra aree di campionamento è stata riscontrata, sebbene in maniera meno evidente, aumentando la dimensionalità del *dataset* ad una matrice 71x26 contenente nuovamente i campioni appartenenti alle tre classi maggiormente rappresentative (steli, infiorescenze e semi), ma tutte le variabili considerate, eccezion fatta per il rapporto isotopico dello stronzio (determinato solo nei campioni del 2020) e della concentrazione di Cd (che presentava un numero significativo di dati mancanti). Dai grafici dei *loadings* riportati in [Figura 70](#) si può notare, anche in questo caso, come i rapporti isotopici  $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$ - $\delta^{13}\text{C}$  siano raggruppati e tra loro correlati opposti in seconda componente principale (15,2% di varianza spiegata), la quale separa anche un *cluster* di variabili formato dalle concentrazioni degli elementi in traccia (TEs) e dal valore di  $\delta^{34}\text{S}$ . Quest'ultimo *cluster* risulta invece separato in terza componente principale (8,3% di varianza spiegata), con il rapporto isotopico dello zolfo caratterizzato da valori negativi e le concentrazioni di Cu, Ni, Sr e Zn da valori positivi. Si separano invece in prima componente principale (62,4% di varianza spiegata) le variabili corrispondenti alle concentrazioni delle terre rare (REEs) prese in esame in questo studio ([Figura 70](#)).



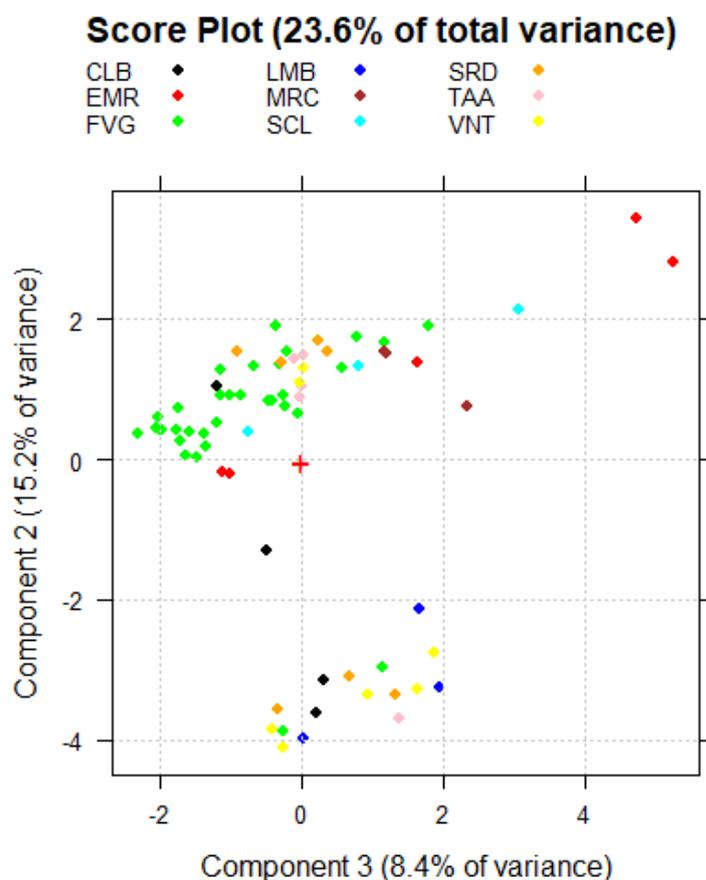
**Figura 70:** Loading plots delle prime tre componenti (seconda vs. prima a sinistra; seconda vs. terza a destra) ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando tutte le variabili chimiche analizzate ad eccezione di Cd e  $^{87}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Sr}$ .

Raggruppando gli *scores* nello spazio delle prime due componenti principali, in funzione della regione di appartenenza, si può notare come la concentrazione di REEs vada a guidare la distribuzione isolando, come già evidenziato in [Figura 66](#), i campioni di infiorescenze campionate a Camigliatello Silano ([Figura 71](#), in nero) per via della loro elevata concentrazione di terre rare e “schiacciando” il resto dei campioni in due *clusters* piuttosto omogenei vicini all'origine (rappresentata da una croce rossa).



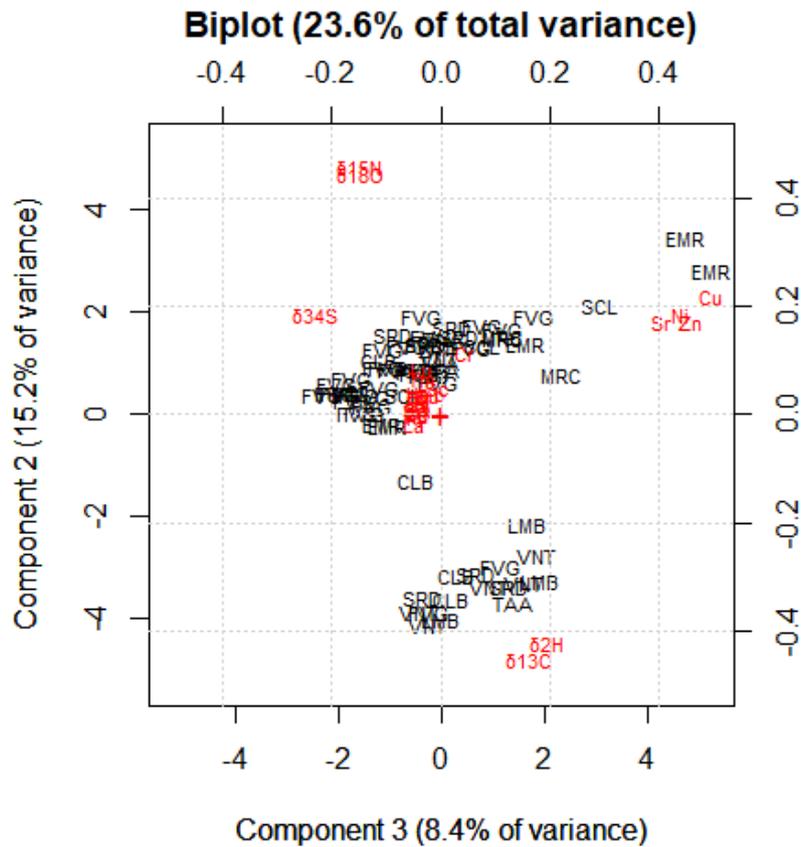
*Figura 71: Score plot delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando tutte le variabili chimiche analizzate ad eccezione di Cd e  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ , in cui vengono evidenziate le regioni di campionamento (CLB = Calabria, EMR = Emilia-Romagna, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, MRC = Marche, SCL = Sicilia, SRD = Sardegna, TAA = Trentino-Alto Adige, VNT = Veneto).*

Prendendo invece in esame la seconda e la terza componente principale, per una varianza spiegata totale pari al 23,6%, gli *scores* dei campioni definiscono nuovamente, come visto per la [Figura 68](#), due grandi gruppi separati in seconda componente principale: un *cluster* a valori positivi che racchiude la quasi totalità dei campioni del Friuli-Venezia Giulia e quelli appartenenti ai siti dell'Emilia Romagna, Marche e Sicilia; un *cluster* a valori negativi in cui sono compresi la maggior parte dei campioni veneti e tutti quelli campionati in Lombardia ([Figura 72](#)).



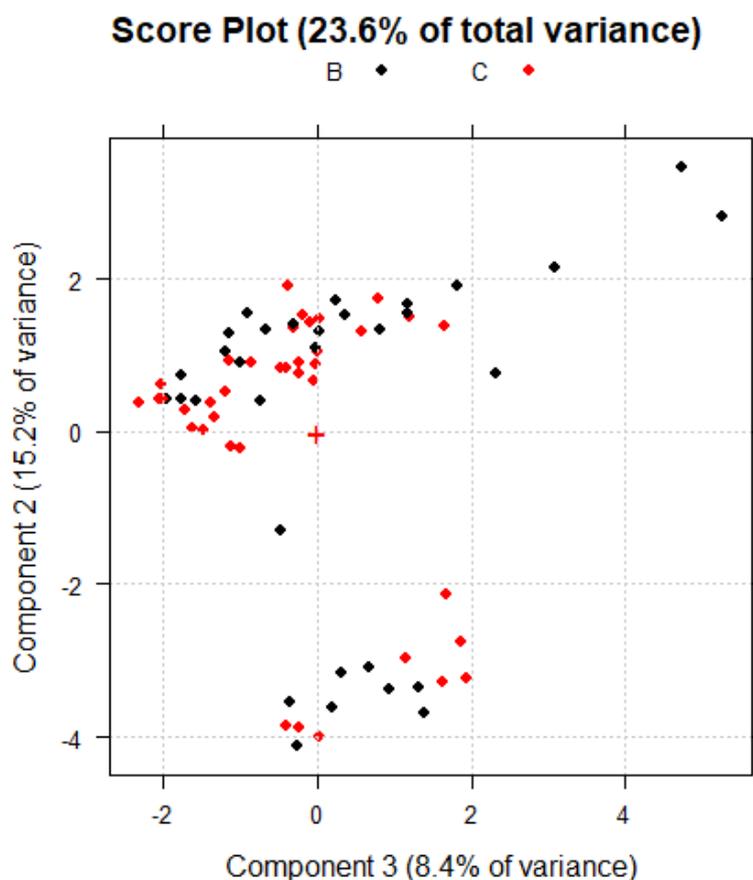
**Figura 72:** Score plot della seconda e terza componente ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando tutte le variabili chimiche analizzate ad eccezione di Cd e  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ , in cui vengono evidenziate le regioni di campionamento (CLB = Calabria, EMR = Emilia-Romagna, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, MRC = Marche, SCL = Sicilia, SRD = Sardegna, TAA = Trentino-Alto Adige, VNT = Veneto).

A differenza di quanto osservato in precedenza (Figura 68), quando le uniche variabili prese in considerazione erano i rapporti degli isotopi stabili di H, C, N, O e S, in questo caso i due gruppi risultano meno compatti e maggiormente dispersi lungo la terza componente principale, soprattutto per quanto riguarda il *cluster* a valori positivi della seconda componente (in alto in Figura 72), la cui distribuzione risulta allargata dal peso delle variabili Cu, Ni, Sr, Zn su alcuni campioni, come visibile dal *biplot* riportato in Figura 73. La distribuzione globale degli *scores* risulta invece fortemente guidata dai rapporti isotopici, in special modo dai valori di  $\delta^2\text{H}$  e di  $\delta^{13}\text{C}$  (Figura 73).



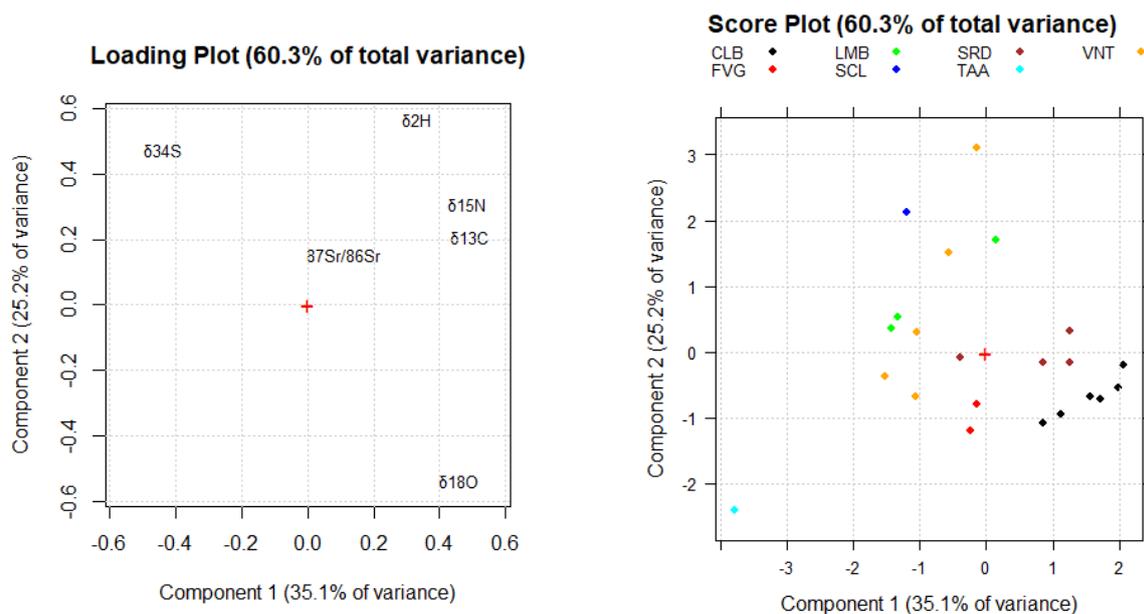
**Figura 73:** Biplot della seconda e terza componente ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando tutte le variabili chimiche analizzate ad eccezione di Cd e  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ , in cui vengono evidenziate le regioni di campionamento (CLB = Calabria, EMR = Emilia-Romagna, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, MRC = Marche, SCL = Sicilia, SRD = Sardegna, TAA = Trentino-Alto Adige, VNT = Veneto).

Quanto detto in precedenza circa il regime di coltivazione applicato nei diversi siti di campionamento considerati, trova riscontro anche in questa analisi dove in nessuno dei due gruppi evidenziati dalla PCA si evince una netta preponderanza dei campioni coltivati in regime biologico (Figura 74, in nero) da quelli in convenzionale (Figura 74, in rosso).

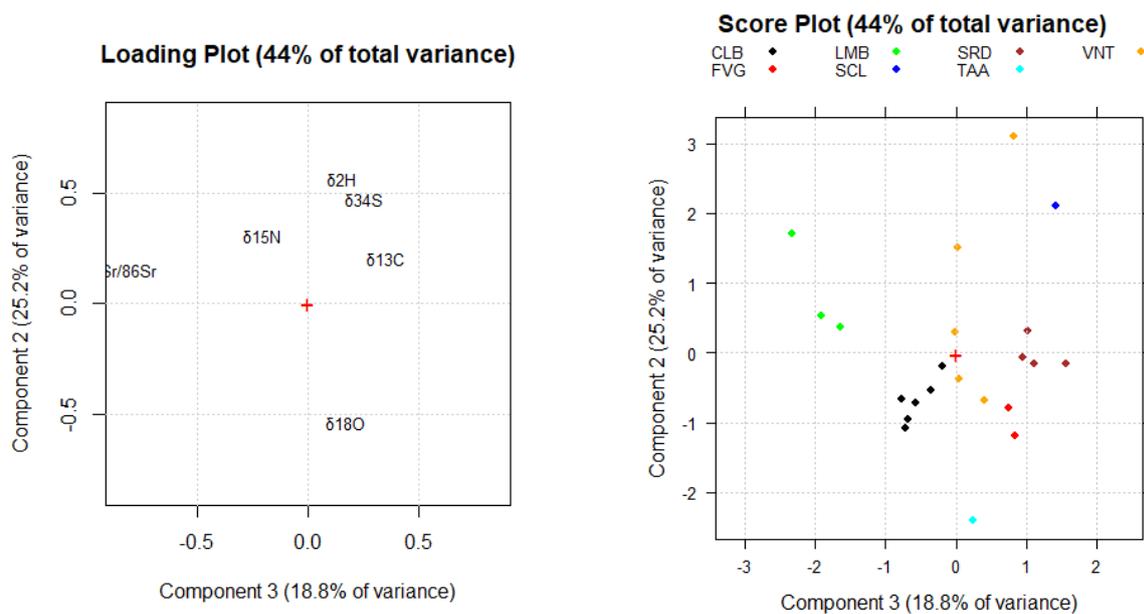


*Figura 74: Score plot della seconda e terza componente ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di stelo, infiorescenza e semi, considerando tutte le variabili chimiche analizzate ad eccezione di Cd e  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ , in cui vengono evidenziati i regimi di coltivazione impiegati (B = Biologico, C = Convenzionale).*

L'importanza ricoperta dai valori dei rapporti isotopici di H, C, N, O, S e Sr nella caratterizzazione geografica di campioni provenienti da aree diverse e, quindi, negli studi di tracciabilità ed autenticazione, è confermata anche da un'ultima PCA eseguita su una matrice a dimensionalità ridotta (22x6) contenente tutti i campioni prelevati nella campagna del 2020, gli unici per i quali sono disponibili i dati chimici di tutte e sei le variabili isotopiche considerate. Pur trattandosi di un numero limitato di campioni, appartenenti a classi di dimensione eterogenea, la distribuzione degli *scores* nello spazio delle prime tre componenti principali (79,1% di varianza spiegata totale) lascia intravedere una buona e promettente suddivisione dei campioni in funzione delle diverse aree di campionamento prese in esame (vedi [Figure 75-76](#)) nonché un'utile indicazione per indirizzare futuri studi sulla canapa.



**Figura 75:** Loading plot (a sinistra) e score plot (a destra) delle prime due componenti ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di radici, stelo, infiorescenza e semi raccolti nel 2020, considerando tutte le variabili isotopiche analizzate. Nel loading plot vengono evidenziate le regioni di campionamento (CLB = Calabria, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, SCL = Sicilia, SRD = Sardegna, TAA = Trentino-Alto Adige, VNT = Veneto).



**Figura 76:** Loading plot (a sinistra) e score plot (a destra) della seconda e terza componente ottenute dall'Analisi delle Componenti Principali eseguita sui campioni di radici, stelo, infiorescenza e semi raccolti nel 2020, considerando tutte le variabili isotopiche analizzate. Nel loading plot vengono evidenziate le regioni di campionamento (CLB = Calabria, FVG = Friuli-Venezia Giulia, LMB = Lombardia, SCL = Sicilia, SRD = Sardegna, TAA = Trentino-Alto Adige, VNT = Veneto).

## 5. Conclusioni e prospettive

I risultati ottenuti da questa tesi di dottorato hanno permesso di caratterizzare chimicamente ed isotopicamente per la prima volta, seppur in via preliminare, la canapa industriale coltivata in Italia. Le diverse analisi condotte sui campioni raccolti nel triennio 2018-2020, benché non sia stato possibile condurre un campionamento omogeneo e costante nel corso degli anni a causa della pandemia da COVID-19, hanno prodotto interessanti risultati ai fini della sua tracciabilità geografica. La valutazione dei valori dei rapporti isotopici di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno e zolfo sembra restituire utili indicazioni e creare una prima distinzione tra i campioni: in particolare, i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  (e in minor misura quelli di  $\delta^2\text{H}$ ) si sono mostrati dipendenti dalla distribuzione latitudinale dei campioni analizzati e, quindi, dalle condizioni climatiche dei siti considerati, mentre il valore di  $\delta^{34}\text{S}$  separa i campioni probabilmente in funzione della natura dei *bedrocks* e del tipo di suoli presenti nei siti di campionamento. Il valore di  $\delta^{15}\text{N}$ , infine, riflette le pratiche di fertilizzazione impiegate, anche se, in alcuni casi particolari, vi è una sovrapposizione tra campioni dichiarati come biologici e convenzionali.

Il rapporto isotopico dello stronzio ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ), sebbene sia stato determinato solo su una ridotta quantità di campioni raccolti nel 2020 (compresi alcuni suoli), ha evidenziato una suddivisione piuttosto netta tra i campioni, ciò in funzione, con buona probabilità, delle caratteristiche geologiche e pedologiche dell'area di provenienza degli stessi.

Dai risultati delle analisi degli elementi in traccia (TEs) e delle terre rare (REEs) considerate in questa ricerca, emergono informazioni che sono collegabili alla distribuzione spaziale dei campioni, anche se in maniera meno evidente rispetto alle analisi isotopiche condotte. TE e REE si concentrano principalmente nelle infiorescenze della canapa, mentre risultano meno concentrate nei semi (seppur quest'ultimi rappresentino un piccolo *set* di campioni). Scendendo maggiormente nel dettaglio, lo stronzio è l'elemento che presenta le concentrazioni più elevate in tutti i campioni raccolti nei tre anni, in radici, steli e, soprattutto, nelle infiorescenze. Allo stesso tempo, le sue concentrazioni sono in grado di discriminare i campioni sulla base della loro provenienza geografica, essendo un elemento molto legato alla geologia di un'area. Lo stesso andamento si osserva per Zn, Cu e Ni, benché in maniera meno evidente. Anche le terre rare sembrano restituire informazioni utili alla discriminazione spaziale dei campioni considerati. Essendo esse legate alle caratteristiche dei suoli e di eventuali fenomeni di inquinamento ambientale, la loro diversa concentrazione può essere utilizzata come fattore di distinzione nella tracciabilità geografica.

L'applicazione dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA) a diversi *set* di dati comprendenti parte o tutte le variabili chimiche analizzate (isotopi stabili dei bioelementi, isotopi stabili dello

stronzio, elementi in traccia e terre rare), ha permesso di ottenere risultati utili nel delineare aspetti chiave per la tracciabilità geografica della canapa e per i suoi prodotti derivati, spesso confermando quanto sopra riportato.

Prendendo in considerazione le classi di campioni dimensionalmente maggiori e più omogenee, ovvero steli, infiorescenze e semi, la PCA applicata alle variabili TEs e REEs non hanno evidenziato particolari suddivisioni, se non in alcuni campioni circoscritti, quali Camigliatello Silano (Calabria), Jolanda di Savoia (Emilia-Romagna), Campofornido e Gemona del Friuli (Friuli-Venezia Giulia), separati, per la maggior parte, da elementi quali Cr, Ni, Cu, Zn e Sr (come discusso nel [Paragrafo 4.2.1](#)).

Di maggiore interesse è, invece, l'applicazione della PCA allo stesso *dataset* ma considerando come variabili i rapporti degli isotopi stabili di carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto e zolfo. In questo caso il *set* di campioni è stato suddiviso in tre *cluster* ben distinti uno dall'altro: la prima componente principale (78,4% della varianza spiegata) separa i campioni sulla base dei valori di  $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ - $\delta^{15}\text{N}$ , mentre la seconda componente (16,7% della varianza spiegata) in funzione dei valori di  $\delta^{34}\text{S}$ . È utile osservare che queste affermazioni in parte confermano quanto già osservato nei [Paragrafi 4.1](#) e [4.1.3](#), soprattutto per  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e per  $\delta^{34}\text{S}$ . Tale suddivisione è messa in evidenza anche in funzione della regione di campionamento che genera due nubi ben distinte: da una parte i campioni appartenenti a Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Marche e Sicilia, mentre dall'altra quelli campionati in Calabria e Lombardia.

Sempre mantenendo le tre classi di campioni (steli, infiorescenze e semi) e allargando il *dataset* a tutte le variabili considerate in questo studio ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  e Cd esclusi), la PCA mette in evidenza la stessa separazione ottenuta con i soli rapporti isotopici dei bioelementi, seppur in maniera meno netta. Questo si verifica perché le REEs vanno a separare, in prima componente (62,4% della varianza spiegata) i campioni di Camigliatello Silano (come già evidenziato in precedenza), comprimendo tutti gli altri. Prendendo in considerazione la seconda e terza componente (23,6% della varianza spiegata) i gruppi di campioni vengono "allargati" lungo la terza componente (Sr, Cu, Zn e Ni), facendo così diminuire la capacità di raggruppamento dei campioni in funzione dell'area di provenienza.

Anche l'ultima PCA eseguita su tutti i campioni raccolti nel 2020 e considerando tutte e sei le variabili isotopiche ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$  e  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ) conferma, nonostante il numero limitato di campioni, l'importanza ricoperta da questi elementi nella suddivisione dei campioni in funzione dei siti di campionamento considerati.

In conclusione, si può affermare come gli analiti più interessanti per la tracciabilità della canapa industriale italiana siano gli isotopi stabili di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno e zolfo che,

unitamente a quelli dello stronzio, permettono di dividere i campioni sulla base della loro provenienza geografica.

I risultati ottenuti nell'ambito di questa tesi di dottorato sulla caratterizzazione chimica e isotopica della *C. sativa*, potranno essere utilizzati come base di partenza per ulteriori studi di tracciabilità dei prodotti finiti dalla canapa industriale. A tal riguardo, si suggerisce di prevedere campionamenti lungo tutta la filiera produttiva, così da non tralasciare fattori che potrebbero influenzare i risultati sia delle analisi isotopiche, sia delle analisi di terre rare ed elementi in traccia. Questo potrà permettere a centri di ricerca e/o organi di controllo nazionali di eseguire un'analisi di classificazione per la tracciabilità geografica dei prodotti derivati dalla canapa più accurata, al fine di salvaguardare consumatori e produttori da eventuali adulterazioni.

Il metodo d'indagine potrà poi essere applicato anche a settori al di fuori di quello agroalimentare, quali tessile, cosmetico e farmaceutico, che stanno trovando nella canapa una risorsa sempre più importante.

## Bibliografia

- Aceto, M., Gulino, F., Calà, E., Robotti, E., Petrozziello, M., Tsolakis, C., & Cassino, C. (2020). Authentication and traceability study on barbera d'asti and nizza docg wines: The role of trace-and ultra-trace elements. *Beverages*, 6(4), 63. <https://doi.org/10.3390/beverages6040063>
- Aceto, M., Calà, E., Musso, D., Regalli, N., & Oddone, M. (2019). A preliminary study on the authentication and traceability of extra virgin olive oil made from Taggiasca olives by means of trace and ultra-trace elements distribution. *Food chemistry*, 298, 125047. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125047>
- Adesina, I., Bhowmik, A., Sharma, H., & Shahbazi, A. (2020). A review on the current state of knowledge of growing conditions, agronomic soil health practices and utilities of hemp in the United States. *Agriculture*, 10(4), 129. <https://doi.org/10.3390/agriculture10040129>
- Aguzzoni, A., Bassi, M., Pignotti, E., Robatscher, P., Scandellari, F., Tirlir, W., & Tagliavini, M. (2020). Sr isotope composition of Golden Delicious apples in Northern Italy reflects the soil  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio of the cultivation area. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(9), 3666-3674. DOI 10.1002/jsfa.10399
- Aiello, A., Pizzolongo, F., Scognamiglio, G., Romano, A., Masi, P., & Romano, R. (2020). Effects of supercritical and liquid carbon dioxide extraction on hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(6), 2472-2480. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14498>
- Ahangari, H., King, J. W., Ehsani, A., & Yousefi, M. (2021). Supercritical fluid extraction of seed oils— A short review of current trends. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 249-260. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.066>
- Ali, W., Mao, K., Zhang, H., Junaid, M., Xu, N., Rasool, A., ... & Yang, Z. (2020). Comprehensive review of the basic chemical behaviours, sources, pr <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122720>

- Antonucci, F., Figorilli, S., Costa, C., Pallottino, F., Raso, L., & Menesatti, P. (2019). A Review on blockchain applications in the agri-food sector. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6129-6138. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9912>
- Arienzo, I., Rucco, I., Di Vito, M. A., D'Antonio, M., Cesarano, M., Carandente, A., ... & Rickards, O. (2020). Sr isotopic composition as a tool for unraveling human mobility in the Campania area. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 12(8), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01088-0>
- Bailoni, L., Bacchin, E., Trocino, A., & Arango, S. (2021). Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed and co-products inclusion in diets for dairy ruminants: a review. *Animals*, 11(3), 856. <https://doi.org/10.3390/ani11030856>
- Baldini, M., Zuliani, F., Barbiani, G., & Cattivello, C. (2016). Coltivazione di varietà di canapa industriale nel medio Friuli: nuove opportunità per una “vecchia” coltura. *Notiziario ERSA – Regional Agency for Rural Development bulletin*, 3, 41-49. <http://www.ersa.fvg.it/export/sites/ersa/aziende/informazione/notiziario/allegati/2016/3/COLTIVAZIONE-CANAPA.pdf>. Accessed July 2020.
- Bandoniene D, Zettl D, Meisel T and Maneiko M. (2013). Suitability of elemental fingerprinting for assessing the geographic origin of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) seed oil. *Food Chem* 136:1533–1542 (2013). 8 Joebstlv D, Bandoniene D, Meisel T and Chatzistathis S, Identification of the geographical origin of pumpkin seed oil by the use of rare earth elements and discriminant analysis. *Food Chem* 123:1303–1309 (2010).
- Barbeta, A., Burlett, R., Martín-Gómez, P., Fréjaville, B., Devert, N., Wingate, L., ... & Ogée, J. (2022). Evidence for distinct isotopic compositions of sap and tissue water in tree stems: consequences for plant water source identification. *New Phytologist*, 233(3), 1121-1132. <https://doi.org/10.1111/nph.17857>

- Barbour M.M. (2007). Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Funct. Plant Biol.* 2007, 34, 83. <https://doi.org/10.1071/FP06228>
- Bateman, A. S., & Kelly, S. D. (2007). Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in environmental and health studies*, 43(3), 237-247. <http://dx.doi.org/10.1080/10256010701550732>
- Bau M., Schmidt K., Pack A., Bendel V., Kraemer D. (2018). The European Shale: An improved data set for normalisation of rare earth element and yttrium concentrations in environmental and biological samples from Europe. *Applied Geochemistry*, 90: 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.01.008>.
- Becker, J. (2007). *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*.
- Benner, R., Fogel, M. L., & Sprague, E. K. (1991). Diagenesis of belowground biomass of *Spartina alterniflora* in salt-marsh sediments. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1358-1374. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.7.1358>
- Benner, R., Fogel, M., Sprague, E. et al. Depletion of  $^{13}\text{C}$  in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710 (1987). <https://doi.org/10.1038/329708a0>
- Bonetto, F. (2014). Traceability of foodstuffs by chemical characterization using trace elements (REEs) and isotope ratios. PhD thesis, University Ca' Foscari of Venice. <http://hdl.handle.net/10579/4646>
- Bontempo, L., Paolini, M., Franceschi, P., Ziller, L., García-González, D. L., & Camin, F. (2019). Characterisation and attempted differentiation of European and extra-European olive oils using stable isotope ratio analysis. *Food chemistry*, 276, 782-789. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.077>
- Bontempo, L., van Leeuwen, K. A., Paolini, M., Laursen, K. H., Micheloni, C., Prenzler, P. D., ... & Camin, F. (2020). Bulk and compound-specific stable isotope ratio analysis for authenticity testing of organically grown tomatoes. *Food chemistry*, 318, 126426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126426>

- <sup>b</sup>Bontempo, L., Camin, F., Perini, M., Ziller, L., & Larcher, R. (2020). Isotopic and elemental characterisation of Italian white truffle: A first exploratory study. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111627. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111627>
- Brand, W. A., & Coplen, T. B. (2012). Stable isotope deltas: tiny, yet robust signatures in nature. *Isotopes in environmental and health studies*, 48(3), 393-409. <https://doi.org/10.1080/10256016.2012.666977>
- Burger, A., & Lichtscheidl, I. (2019). Strontium in the environment: Review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. *Science of the Total Environment*, 653, 1458-1512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.312>
- Camin, F., Boner, M., Bontempo, L., Fauhl-Hassek, C., Kelly, S. D., Riedl, J., & Rossmann, A. (2017). Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.007>
- Carter, J. F., & Chesson, L. A. (2017). *Food Forensics. Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin*. CRC Press. ISBN: 9780367782085.
- Cartier, L. E., Ali, S. H., & Krzemnicki, M. S. (2018). Blockchain, Chain of Custody and Trace Elements: An Overview of Tracking and Traceability Opportunities in the Gem Industry. *Journal of Gemmology*, 36(3). <http://doi.org/10.15506/JoG.2018.36.3.212>
- Catalano, V., Moreno-Sanz, P., Lorenzi, S., & Grando, M. S. (2016). Experimental review of DNA-based methods for wine traceability and development of a single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assay for quantitative varietal authentication. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(37), 6969-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02560>
- Cavalloro, V., Martino, E., Linciano, P., & Collina, S. (2021). Microwave-Assisted Solid Extraction from Natural Matrices. In *Microwave Heating-Electromagnetic Fields Causing Thermal and Non-Thermal Effects*. IntechOpen

- Celetti, D. (2007). *La canapa nella Repubblica Veneta: produzione nazionale e importazioni in età moderna* (Vol. 122). Ist. Veneto di Scienze.
- Clarke, R., & Merlin, M. (2016). *Cannabis: evolution and ethnobotany*. Univ of California Press.
- Coldiretti (2018). *Via libera alla cannabis a tavola, campi decuplicati*. <https://www.coldiretti.it/economia/via-libera-alla-cannabis-tavola-campi-decuplicati>. Accessed July 2020.
- Coldiretti (2018). *Balzo del 58% nei reati a tavola nel 2018*. <https://www.coldiretti.it/economia/balzo-del-58-nei-reati-tavola-nel-2018>. Accessed October 2021.
- Condon, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., & Farquhar, G. D. (2004). Breeding for high water-use efficiency. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2447-2460. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh277>
- Costantini, E. A. C., L'Abate, G., Barbetti, R., Fantappiè, M., Lorenzetti, R., & Magini, S. (2012). *Soil Map of Italy*. National Research Council and Minister of Agriculture Food and Forestry. <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/content/carta-dei-suoli-ditalia-soil-map-italy>.
- Cotruvo Jr, J. A. (2019). The chemistry of lanthanides in biology: recent discoveries, emerging principles, and technological applications. *ACS Central Science*, 5(9), 1496-1506. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00642>
- Cottica, D., & Cipolato, A. (2020). Il processo di lavorazione della canapa nel mondo romano: Novità archeologiche e approcci transdisciplinari. In *Redefining ancient textile handcraft structures, tools and production processes: proceedings of the VIIth International Symposium on Textiles and Dyes in the Ancient Mediterranean World* (Granada, Spain 2-4 October 2019) (pp. 363-374). Universidad de Granada.
- Craig, H. (1961). Isotopic variations in meteoric waters. *Science*, 133(3465), 1702-1703. <https://doi.org/10.1126/science.133.3465.1702>

- Danezis, G. P., & Georgiou, C. A. (2022). Elemental metabolomics: Food elemental assessment could reveal geographical origin. *Current Opinion in Food Science*, 100812.
- Dansgaard, W. (1964). Stable isotopes in precipitation. *tellus*, 16(4), 436-468.  
<https://doi.org/10.3402/tellusa.v16i4.8993>
- Duratorre, N. (2018). L'importanza dell'informazione: la tutela del made in Italy: il settore agroalimentare. Tesi di Laurea Luiss Guido Carli
- EIHA (2018). Hemp cultivation and production in Europe tratto da <https://eiha.org/wp-content/uploads/2020/10/2018-Hemp-agri-report.pdf>. Accessed December 2021.
- EIHA (2021). The new Common Agricultural Policy has been adopted and the maximum THC level on the field has been restored to 0,3 % tratto da <https://eiha.org/wp-content/uploads/2021/12/PR-CAP-VOTE-COUNCIL.pdf>. Accessed December 2021.
- Elgawhary, S. M., G. L. Malzer, e S. Barber. (1972). Calcium and strontium transport to plant roots. *Soil Science Society of America, Proceedings* 36, n. 794 (1972)
- Esmailzadeh Kenari, R., & Dehghan, B. (2020). Optimization of ultrasound-assisted solvent extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil using RSM: Evaluation of oxidative stability and physicochemical properties of oil. *Food Science & Nutrition*, 8(9), 4976-4986. DOI: 10.1002/fsn3.1796
- Faugno, S., Piccolella, S., Sannino, M., Principio, L., Crescente, G., Baldi, G. M., ... & Pacifico, S. (2019). Can agronomic practices and cold-pressing extraction parameters affect phenols and polyphenols content in hempseed oils?. *Industrial crops and products*, 130, 511-519.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.084>
- Federcanapa – Italian hemp Federation (2021b). Linee Guida per il seme di canapa ad uso alimentare. <https://www.federcanapa.it/linee-guida-canapa-alimentare> (in Italian). Accessed May 2022.

- Federcanapa (2021, a). Tracciabilità dell'olio di Canapa prodotto in ITALIA tratto da <https://www.federcanapa.it/tracciabilita-olio-prodotto-italia/>. Accessed May 2022.
- Fernandes, E. A. D. N., Sarriés, G. A., Bacchi, M. A., Mazola, Y. T., Gonzaga, C. L., & Sarriés, S. R. (2020). Trace elements and machine learning for Brazilian beef traceability. *Food Chemistry*, 333, 127462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127462>
- Gat, J. R. (1996). Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 24(1), 225-262. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.24.1.225>
- Gazzetta Ufficiale (2016). LEGGE 2 dicembre 2016, n. 242 Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa. (16G00258) (GU Serie Generale n.304 del 30-12-2016).  
[https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2016-12-30&atto.codiceRedazionale=16G00258&elenco30giorni=true](https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2016-12-30&atto.codiceRedazionale=16G00258&elenco30giorni=true). Accessed March 2022.
- Giupponi, L., Leoni, V., Carrer, M., Ceciliani, G., Sala, S., Panseri, S., ... & Giorgi, A. (2020). Overview on Italian hemp production chain, related productive and commercial activities and legislative framework. *Italian Journal of Agronomy*, 15(3), 194-205. doi:10.4081/ija.2020.1552
- Giustini, F., Brillì, M., & Patera, A. (2016). Mapping oxygen stable isotopes of precipitation in Italy. *Journal of Hydrology: Regional Studies*, 8, 162-181. <https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2016.04.001>
- Grosjean, N., Le Jean, M., Armengaud, J., Schikora, A., Chalot, M., Gross, E. M., & Blaudez, D. (2022). Combined omics approaches reveal distinct responses between light and heavy rare earth elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*, 425, 127830. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127830>
- Gupta, D. K., & Walther, C. (Eds.). (2018). *Behaviour of Strontium in Plants and the Environment*. Cham: Springer International Publishing

- Guy, R. D., Fogel, M. L., & Berry, J. A. (1993). Photosynthetic fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon. *Plant Physiology*, 101(1), 37-47. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.37>
- Hatfield, J. L., & Dold, C. (2019). Water-use efficiency: advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10, 103. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00103>
- Heaton H.T.E. (1987). The  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios of plants in South Africa and Namibia: relationship to climate and coastal/saline environments. *Oecologia*. 1987, 74, 236. <https://doi.org/10.1007/BF00379365>
- Hidayah Nadiatul, Abidin Sumaiya Zainal. (2019). Extraction of light, medium and heavy rare-earth elements using synergist extractants developed from ionic liquid and conventional extractants, *Comptes Rendus Chimie*, Volume 22, Issues 11–12, 2019, Pages 728-744. ISSN 1631-0748, <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.10.006>
- Hoseini, P. S., Poursafa, P., Moattar, F., Amin, M. M., & Rezaei, A. H. (2012). Ability of phytoremediation for absorption of strontium and cesium from soils using *Cannabis sativa*. *International Journal of Environmental Health Engineering*, 1, 17. <https://doi.org/10.4103/2277-9183.96004>
- Horacek, M., Hansel-Hohl, K., Burg, K., Soja, G., Okello-Anyanga, W., & Fluch, S. (2015). Control of origin of sesame oil from various countries by stable isotope analysis and DNA based markers—A pilot study. *PLoS One*, 10(4), e0123020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123020>
- Inácio, Caio Teves, Phillip Michael Chalk, and Alberto MT Magalhães. (2015). "Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 1. Plant products." *Critical reviews in food science and nutrition* 55.9 (2015): 1206-1218. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.689380>
- Izzo, L., Pacifico, S., Piccolella, S., Castaldo, L., Narváez, A., Grosso, M., & Ritieni, A. (2020). Chemical analysis of minor bioactive components and cannabidiolic acid in commercial hemp seed oil. *Molecules*, 25(16), 3710. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25163710>

- Liu, Z., Zhang, W., Zhang, Y., Chen, T., Shao, S., Zhou, L., ... & Rogers, K. M. (2019). Assuring food safety and traceability of polished rice from different production regions in China and Southeast Asia using chemometric models. *Food Control*, 99, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.011>
- Liu, H. C., You, C. F., Chen, C. Y., Liu, Y. C., & Chung, M. T. (2014). Geographic determination of coffee beans using multi-element analysis and isotope ratios of boron and strontium. *Food Chemistry*, 142, 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.082>
- Loader M.A., Wilkinson J.J., Armstrong R.N. (2017). The effect of titanite crystallisation on Eu and Ce anomalies in zircon and its implications for the assessment of porphyry Cu deposit fertility. *Earth and Planetary Science Letters*, 472: 107-119. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2017.05.010>.
- Kelly S. D. (2001). The development of continuous-flow isotope ratio mass spectrometry methods and their application to the detection of food adulteration. PhD Thesis, University of East Anglia, Norwich, England, NR4 7TJ, 2001.
- Kotelnikova, A. D., Rogova, O. B., & Stolbova, V. V. (2021). Lanthanides in the soil: routes of entry, content, effect on plants, and genotoxicity (a review). *Eurasian Soil Science*, 54(1), 117-134. DOI: 10.1134/S1064229321010051
- Malhotra, N., Hsu, H. S., Liang, S. T., Roldan, M. J. M., Lee, J. S., Ger, T. R., & Hsiao, C. D. (2020). An updated review of toxicity effect of the rare earth elements (REEs) on aquatic organisms. *Animals*, 10(9), 1663. <https://doi.org/10.3390/ani10091663>
- McLennan S.M. (1989). Rare earth elements in sedimentary rocks: influence of provenance and sedimentary processes. In B.R. Lipin, & G.A. McKay (Eds.), *Geochemistry and Mineralogy of the Rare Earth Elements*, Vol. 21. (pp. 169-200). Chantilly, VA, USA: Mineralogical Society of America. ISBN: 9780939950256.

- MacMillan, G. A., Chételat, J., Heath, J. P., Mickpegak, R., & Amyot, M. (2017). Rare earth elements in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems in the eastern Canadian Arctic. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 19(10), 1336-1345. <https://doi.org/10.1039/C7EM00082K>
- Migaszewski, Z. M., & Gałuszka, A. (2015). The characteristics, occurrence, and geochemical behavior of rare earth elements in the environment: a review. *Critical reviews in environmental science and technology*, 45(5), 429-471. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.866622>
- Mirecki, N., Agic, R., Sunic, L., Milenkovic, L., & Ilic, Z. S. (2015). Transfer factor as indicator of heavy metals content in plants. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(11c), 4212-4219.
- Moldovan, Mariella & Krupp, Eva & Holliday, Alison & Donard, Olivier. (2004). High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: a review Presented at the 4th International Conference on High Resolution Sector Field ICP-MS, Venice, Italy, October 15-17, 2003. *J. Anal. At. Spectrom.* 19. [10.1039/B403128H](https://doi.org/10.1039/B403128H).
- Muszyńska, E., & Labudda, M. (2019). Dual role of metallic trace elements in stress biology—From negative to beneficial impact on plants. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3117. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20133117>
- Oddone, M., Aceto, M., Baldizzone, M., Musso, D., & Osella, D. (2009). Authentication and traceability study of hazelnuts from Piedmont, Italy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(9), 3404-3408. <https://doi.org/10.1021/jf900312p>
- Pais, I., & Jones Jr, J. B. (1997). *The handbook of trace elements*. Crc Press.
- Paolini, M. (2017). Development and implementation of stable isotope ratio analysis in bulk products and sub-components to ensure food traceability. PhD thesis, University of Udine, Italy. <http://hdl.handle.net/10449/37884>

- Picone, M., Distefano, G. G., Corami, F., Franzoi, P., Bristol, S. R., Basso, M., ... & Ghirardini, A. V. (2022). Occurrence of rare earth elements in fledgelings of *Thalasseus sandvicensis*. *Environmental Research*, 204, 112152. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112152>
- Placido, D. F., & Lee, C. C. (2022). Potential of Industrial Hemp for Phytoremediation of Heavy Metals. *Plants*, 11(5), 595. <https://doi.org/10.3390/plants11050595>
- Qian, L., Zhang, C., Zuo, F., Zheng, L., Li, D., Zhang, A., & Zhang, D. (2019). Effects of fertilizers and pesticides on the mineral elements used for the geographical origin traceability of rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83, 103276. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103276>
- Rahman, Z., & Singh, V. P. (2019). The relative impact of toxic heavy metals (THMs)(arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental monitoring and assessment*, 191(7), 1-21. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7528-7>
- Ranalli Paolo (2020). *La canapa. Miglioramento genetico, sostenibilità, utilizzi, normative di riferimento*. Edagricole. ISBN 978-88-506-5602-8
- R Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Reg. CE 1881/2006. REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006. [https://www.iss.it/documents/20126/0/Regolamento\\_CE\\_1881\\_2006\\_VersCons\\_1\\_7\\_2010.pdf/cc86cd9e-bec0-bfa5-121e-8d33f297bf51?t=1611650260834](https://www.iss.it/documents/20126/0/Regolamento_CE_1881_2006_VersCons_1_7_2010.pdf/cc86cd9e-bec0-bfa5-121e-8d33f297bf51?t=1611650260834). Accessed February 2022.
- Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., Safari, M., Askari, G., & Salami, M. (2018). Investigation on the extraction yield, quality, and thermal properties of hempseed oil during ultrasound-assisted extraction: A comparative study. *Journal of Food processing and preservation*, 42(10), e13766. DOI: 10.1111/jfpp.13766

- Rheay, H. T., Omondi, E. C., & Brewer, C. E. (2021). Potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) for paired phytoremediation and bioenergy production. *GCB Bioenergy*, 13(4), 525-536. DOI: 10.1111/gcbb.12782
- Satriani, A., Loperte, A., & Pascucci, S. (2021). The Cultivation of Industrial Hemp as Alternative Crop in a Less-Favoured Agricultural Area in Southern Italy: The Pignola Case Study. *Pollutants*, 1(3), 169-180.
- Scandellari, F., & Penna, D. (2017). Gli isotopi stabili nell'acqua fra suolo, pianta e atmosfera. *Italus hortus: rivista bimestrale scientifica di orticoltura, floricoltura e frutticoltura*, 24(2), 51-67. <https://doi.org/10.26353/j.itahort/2017.2.5167>
- Schluttenhofer, C., & Yuan, L. (2017). Challenges towards revitalizing hemp: A multifaceted crop. *Trends in plant science*, 22(11), 917-929. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.004>
- Schmidt, H.-L., Werner, R. A., & Eisenreich, W. (2003). Systematics of 2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. *Phytochemistry Reviews*, 2, 61-85. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.00000004185.92648.ae>.
- Sharp, Z. (2017). Principles of stable isotope geochemistry.
- Sillen, A. (2021). <sup>87</sup>Sr/<sup>86</sup>Sr in Archeological and Paleobiological Research: A Perspective. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.632681>
- Sorrentino, Giuseppe. (2021). "Introduction to emerging industrial applications of cannabis (*Cannabis sativa* L.)." *Rendiconti Lincei. Scienze fisiche e naturali* (2021): 1-11.
- Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Mantia, M., Pederiva, S., Brusa, F., ... & Abete, M. C. (2020). Trace elements and rare earth elements in honeys from the Balkans, Kazakhstan, Italy, South America, and Tanzania. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(11), 12646-12657. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07792-7>

- Taylor S.R., McLennan S.M. (1985). *The continental crust: Its composition and evolution*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications. ISBN: 9780632011483.
- Tedesco, R., Hidalgo, M. D. C. V., Varde, M., Kehrwald, N. M., Barbante, C., & Cozzi, G. (2021). Trace and rare earth elements determination in milk whey from the Veneto region, Italy. *Food Control*, 121, 107595. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107595>
- Telloli, C., Salvi, S., Rizzo, A., & Bartolomei, P. (2019). La spettrometria di massa come tecnica applicata alla tracciabilità analitica degli alimenti. <http://hdl.handle.net/20.500.12079/8101>
- Tescione, I., Marchionni, S., Casalini, M., Vignozzi, N., Mattei, M., & Conticelli, S. (2018).  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  isotopes in grapes of different cultivars: A geochemical tool for geographic traceability of agriculture products. *Food chemistry*, 258, 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.083>
- Tinacci L., Guidi A., Toto A., Guardone L., Giusti A., D'Amico P. & Armani A. (2018). DNA barcoding for the verification of supplier's compliance in the seafood chain: How the lab can support companies in ensuring traceability. *Italian Journal of Food Safety*, 7 (2), 6894.  
doi: 10.4081/ijfs.2018.6894
- Tommasi, F., Thomas, P. J., Pagano, G., Perono, G. A., Oral, R., Lyons, D. M., ... & Trifuoggi, M. (2021). Review of rare earth elements as fertilizers and feed additives: a knowledge gap analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(4), 531-540. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00773-4>
- Tommasini, S., Marchionni, S., Tescione, I., Casalini, M., Braschi, E., Avanzinelli, R., & Conticelli, S. (2018). Strontium isotopes in biological material: A key tool for the geographic traceability of foods and humans beings. In *Behaviour of Strontium in Plants and the Environment* (pp. 145-166). Springer, Cham. DOI 10.1007/978-3-319-66574-0\_10

- Tripoli, M. & Schmidhuber, J. (2018). Emerging Opportunities for the Application of Blockchain in the Agri-food Industry. FAO and ICTSD: Rome and Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>
- UNI EN ISO 22005:2008. Titolo: Rintracciabilità nelle filiere agroalimentari - Principi generali e requisiti di base per progettazione di sistemi e attuazione. <http://store.uni.com/catalogo/uni-en-iso-22005-2008>
- Vatansever, R., Ozyigit, I. I., & Filiz, E. (2017). Essential and beneficial trace elements in plants, and their transport in roots: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), 464-482. DOI 10.1007/s12010-016-2224-3
- Vitoria L., Otero N., Soler A. & Canals A. (2004) - Fertilizer characterization: isotopic data (N, S, O, C, and Sr). *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3254–3262.
- Wadood, S. A., Boli, G., Xiaowen, Z., Hussain, I., & Yimin, W. (2020). Recent development in the application of analytical techniques for the traceability and authenticity of food of plant origin. *Microchemical Journal*, 152, 104295. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104295>
- Walczyk, T. (2004). TIMS versus multicollector-ICP-MS: coexistence or struggle for survival? *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(2), 229-231. DOI 10.1007/s00216-003-2053-4
- Wall Frances. (2021). Rare Earth Elements, Editor(s): David Alderton, Scott A. Elias, *Encyclopedia of Geology Second Edition*), Academic Press, 2021, Pages 680-693, ISBN 9780081029091, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102908-4.00101-6>.
- Yakir, D., & DeNiro, M. J. (1990). Oxygen and hydrogen isotope fractionation during cellulose metabolism in *Lemna gibba* L. *Plant Physiology*, 93(1), 325-332. 0032-0889/90/93/0325/08/\$01.00/0
- Yakir, D., & Sternberg, L. D. S. L. (2000). The use of stable isotopes to study ecosystem gas exchange. *Oecologia*, 123(3), 297-311. <https://doi.org/10.1007/s004420051016>

- Zhao, H., & Yang, Q. (2019). The suitability of rare earth elements for geographical traceability of tea leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6509-6514. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9930>
- Zazzo, A., Monahan, F. J., Moloney, A. P., Green, S., & Schmidt, O. (2011). Sulphur isotopes in animal hair track distance to sea. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(17), 2371-2378. <https://doi.org/10.1002/rcm.5131>
- Zhou, X., Wu, H., Pan, J., Chen, H., Jin, B., Yan, Z., ... & Rogers, K. M. (2021). Geographical traceability of south-east Asian durian: A chemometric study using stable isotopes and elemental compositions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 101, 103940. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103940>
- Zuliani, T., Kanduč, T., Novak, R., & Vreča, P. (2020). Characterization of bottled waters by multielemental analysis, stable and radiogenic isotopes. *Water*, 12(9), 2454. doi:10.3390/w12092454

## Appendice

### Tabella A.1

Tabella A. 1: Concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia di infiorescenze e steli di canapa raccolti nel 2018.

Campione	*Sigla	Cr	Ni	Cu	Zn	Sr	Cd
<i>Gemona Ferimon Infiorescenza</i>	GFFn	0,5	0,34	12,8	37,6	47,9	0,04
<i>Gemona Fedora Infiorescenza</i>	GFFe	0,8	0,46	10,6	35,1	42,0	0,09
<i>Gemona Futura Infiorescenza</i>	GFFu	0,4	0,49	13,5	27,5	26,8	0,03
<i>Gemona Zenit Infiorescenza</i>	GFZe	0,5	0,79	13,2	32,9	41,1	0,03
<i>Campoformido Ferimon Infiorescenza</i>	CFFn	0,5	0,50	9,2	37,5	91,3	0,14
<i>Campoformido Fedora Infiorescenza</i>	CFFe	0,4	0,39	26,3	59,9	116,8	0,08
<i>Campoformido Futura Infiorescenza</i>	CFFu	0,6	0,43	8,1	25,4	73,4	0,03
<i>Campoformido Zenit Infiorescenza</i>	CFZe	0,5	0,39	8,5	25,6	64,7	0,05
<i>Verzegnìs Ferimon Infiorescenza</i>	VZFn	3,5	1,87	20,0	82,1	97,6	0,02
<i>Verzegnìs Fedora Infiorescenza</i>	VZFe	0,4	0,36	8,2	28,9	59,0	0,01
<i>Verzegnìs Futura Infiorescenza</i>	VZFu	0,9	0,95	13,9	55,2	107,1	0,03
<i>Verzegnìs Zenit Infiorescenza</i>	VZZe	0,2	0,34	11,7	42,4	44,4	0,02
<i>Gemona Ferimon Stelo</i>	GFFn	3,4	0,92	3,7	9,8	15,3	0,05
<i>Gemona Fedora Stelo</i>	GFFe	4,8	2,11	1,4	6,3	10,5	0,03
<i>Gemona Futura Stelo</i>	GFFu	1,0	0,41	1,2	4,0	13,8	0,03
<i>Gemona Zenit Stelo</i>	GFZe	1,9	0,92	2,2	5,3	12,7	0,03
<i>Campoformido Ferimon Stelo</i>	<sup>b</sup> CFFn	0,7	0,37	1,8	6,4	38,7	0,05
<i>Campoformido Fedora Stelo</i>	<sup>b</sup> CFFe	1,5	0,60	3,2	3,7	28,1	0,04
<i>Campoformido Futura Stelo</i>	<sup>b</sup> CFFu	1,3	0,59	2,2	7,7	34,0	0,02
<i>Campoformido Zenit Stelo</i>	<sup>b</sup> CFZe	0,8	0,29	1,4	1,8	16,9	0,01
<i>Verzegnìs Ferimon Stelo</i>	VZFn	0,9	0,53	3,7	4,4	23,1	0,01
<i>Verzegnìs Fedora Stelo</i>	VZFe	0,5	0,21	2,0	3,1	17,3	0,01
<i>Verzegnìs Futura Stelo</i>	VZFu	1,0	0,39	2,4	3,5	16,2	0,01
<i>Verzegnìs Zenit Stelo</i>	VZZe	13,0	5,32	7,8	7,5	36,5	0,04

\*GF=Gemona del Friuli (UD), CF=Campoformido (UD), VZ=Verzegnìs (UD), Fn=Ferimon, Fe=Fedora 17, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, <sup>b</sup>=regime biologico.

## Tabella A.2

**Tabella A. 2:** Concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di canapa raccolti nel 2019 in diverse parti d'Italia. I campioni sono ordinati secondo la parte analizzata, ovvero radice, stelo, infiorescenze, semi.

Campione	*Sigla	Cr	Ni	Cu	Zn	Sr	Cd
<i>Udine Zenit Radice</i>	UDZe <sub>m</sub>	4,4	2,68	4,7	14,8	30,7	0,09
<i>Udine Zenit Radice</i>	UDZe	4,2	2,59	4,1	10,4	21,3	0,07
<i>Udine Futura Radice</i>	UDFu <sub>m</sub>	3,6	2,31	4,6	11,9	23,4	0,07
<i>Udine Futura Radice</i>	UDFu	3,5	2,33	4,8	8,6	18,6	0,06
<i>Caltagirone (CT) Futura Radice</i>	bCTFu	4,3	0,96	3,9	9,6	78,4	0,02
<i>Udine Zenit Stelo</i>	UDZe <sub>m</sub>	0,6	0,12	2,9	13,9	53,2	0,05
<i>Udine Zenit Stelo</i>	UDZe	0,2	0,09	2,1	3,9	22,1	0,01
<i>Udine Futura Stelo</i>	UDFu <sub>m</sub>	0,1	0,08	2,5	6,7	26,0	0,04
<i>Udine Futura Stelo</i>	UDFu	0,3	0,21	2,4	3,2	17,8	0,02
<i>Piacenza Futura Stelo</i>	PCFu	0,1	0,22	2,2	7,7	42,8	0,01
<i>Piacenza Fibror Stelo</i>	PCFb	0,0	0,57	2,1	5,9	39,9	0,01
<i>Caltagirone Futura Stelo</i>	bCTFu	0,2	0,44	5,3	10,1	108,9	0,02
<i>Pradaia (TN) Finola Infiorescenza</i>	PDFi	0,1	0,34	16,4	27,6	83,9	0,02
<i>Udine Zenit Infiorescenza</i>	UDZe <sub>m</sub>	1,5	0,82	24,2	59,7	261,4	0,10
<i>Udine Zenit Infiorescenza</i>	UDZe	0,8	0,57	15,0	37,5	142,9	0,06
<i>Udine Futura Infiorescenza</i>	UDFu <sub>m</sub>	1,5	1,00	20,5	59,9	213,1	0,10
<i>Udine Futura Infiorescenza</i>	UDFu	0,8	0,56	15,3	34,2	86,5	0,03
<i>Altopiano della Vigolana (TN) Finola Infiorescenza</i>	AVFi	0,2	0,31	16,2	41,4	42,3	0,01
<i>Seren del Grappa (BL) Futura Infiorescenza</i>	SGFu	0,2	0,30	13,9	46,0	57,0	0,04
<i>Piacenza Fibror Infiorescenza+semi</i>	PCFb	0,8	3,52	15,3	42,5	161,4	0,02
<i>Piacenza Futura Infiorescenza+semi</i>	PCFu	1,3	1,96	14,7	40,0	206,7	0,02
<i>Jesi (AN) Futura Infiorescenza</i>	JEFu	0,3	1,76	16,4	54,5	217,8	0,01
<i>Sassari Jubileum Infiorescenza</i>	<sup>b</sup> SSJu	0,6	0,87	10,4	40,2	25,8	0,03
<i>Sassari Uso31 Infiorescenza</i>	<sup>b</sup> SSUs	0,5	0,67	14,0	80,6	49,9	0,02
<i>Caltagirone (CT) Futura Infiorescenza</i>	<sup>b</sup> CTFu	0,5	1,07	16,7	46,7	717,5	0,02
<i>Predaia (TN) Finola Semi</i>	PDFi	0,0	0,34	17,2	47,6	2,9	0,01
<i>Udine Zenit Semi</i>	UDZe <sub>m</sub>	0,1	0,24	11,5	33,7	31,7	0,01
<i>Udine Zenit Semi</i>	UDZe	0,9	0,75	17,8	41,7	36,6	0,01
<i>Udine Futura semi</i>	UDFu <sub>m</sub>	1,7	1,24	19,6	60,6	30,2	0,03
<i>Udine Futura semi</i>	UDFu	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,00
<i>Altopiano della Vigolana (TN) Finola Semi</i>	AVFi	0,0	0,18	19,5	50,9	2,6	0,03
<i>Seren del Grappa (BL) Futura Semi</i>	SGFu	0,1	0,22	16,9	50,7	9,3	0,01
<i>Jesi (AN) Carmagnola Semi</i>	JECa	0,1	1,89	18,5	69,0	11,5	0,02
<i>Sassari Jubileum Semi</i>	<sup>b</sup> SSJu	0,1	0,60	14,7	48,2	5,5	0,01
<i>Sassari Uso 31 Semi</i>	<sup>b</sup> SSUs	0,4	0,65	17,1	69,0	4,6	0,01
<i>Caltagirone Futura Semi</i>	<sup>b</sup> CTFu	0,1	0,75	19,0	47,2	89,3	0,00

\*PD=Predaia (TN), UD=Udine, AV=Altopiano della Vigolana (TN), SG=Seren del Grappa (BL), PC=Piacenza, JE=Jesi (AN), SS=Sassari, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, <sup>b</sup>=regime biologico, <sub>m</sub>=fertilizzazione organica

### Tabella A.3

**Tabella A. 3:** Concentrazioni ( $\mu\text{g/g}$ ) degli elementi in traccia dei campioni di canapa raccolti nel 2020 in diverse parti d'Italia. I campioni sono ordinati secondo la parte analizzata, ovvero radice, stelo, infiorescenze, semi.

Campione	*Sigla	Cr	Ni	Cu	Zn	Sr
Udine Futura Radice	UDFu	0.5	0.34	1.9	3.5	9.3
Sassari Futura Radice	SSUs_B	1.3	0.53	1.3	7.4	11.9
Camigliatello Silano (CS) Futura Radice	CSFu_B	0.4	0.00	3.0	13.9	41.6
Camigliatello Silano (CS) Fibror Radice	CSFb_B	0.3	0.00	4.3	17.8	46.1
Udine Futura Stelo	UDFu	0.1	0.00	1.4	3.6	10.8
Monno (BS) Futura Stelo	MOFu	0.5	0.12	1.6	9.1	24.0
Fiesso d'Artico (VE) Futura Stelo	FAFu	0.1	0.00	1.4	1.7	10.7
Seren del Grappa (BL) Futura Stelo	SGFu	0.2	0.00	1.1	3.2	7.3
Sassari Uso31 + Jubileum Stelo	SSUsJu_B	0.2	0.00	1.6	5.3	9.9
Camigliatello Silano (CS) Futura Stelo	CSFu_B	0.2	0.00	3.5	14.0	43.5
Camigliatello Silano (CS) Fibror Stelo	CSFb_B	0.0	0.31	6.6	19.3	82.0
Udine Futura Infiorescenza	UDFuI	0.7	0.25	11.2	34.7	52.4
Monno (BS) Futura Infiorescenza	MOFuI	1.1	0.81	9.3	69.4	151.4
Fiesso d'Artico (VE) Futura Infiorescenza	FAFu	0.3	0.48	21.8	41.2	33.2
Seren del Grappa (BL) Futura Infiorescenza	SGgFuI	0.1	0.84	9.4	25.3	29.0
Rovigo Carmagnola Infiorescenza	ROCaI	0.2	0.81	12.1	45.6	54.1
Sassari Uso31 + Jubileum Infiorescenza	SSUsJuI_B	0.1	0.16	9.4	29.4	24.6
Camigliatello Silano (CS) Futura Infiorescenza	CSFuI_B	0.3	0.22	10.3	47.2	144.3
Camigliatello Silano (CS) Fibror Infiorescenza	CSFbI_B	0.7	0.61	21.1	63.2	205.1
Caltagirone (CT) Futura Infiorescenza	CTFuI_B	797.5	2231.75	15800.4	68057.4	1784293.8
Monno (BS) Futura Semi	MOFuSD	0.3	2.09	12.1	47.1	13.2
Sassari Uso31 + Jubileum Semi	SSUsJuSD_B	0.4	0.88	10.6	41.2	4.9
Caltagirone (CT) Futura Semi	CTFuSD_B	0.1	0.43	16.8	56.4	20.6

\*UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.

## Terre rare (REE)

### Tabella A.4

**Tabella A. 4:** Valori normalizzati secondo EAS (tranne lo Sc, normalizzando secondo PAAS) delle concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) delle terre rare di infiorescenze e steli di canapa raccolti nel 2018. La tabella è suddivisa in LREE (Light Rare Earth Elements), MREE (Medium Rare Earth Elements) e HREE (Heavy Rare Earth Elements). La sommatoria riguarda le LREE, MREE e HREE, oltre a quella totale che comprende tutte le terre rare per infiorescenze e per steli.

Campione	*Sigla	LREE					MREE					HREE					
		La	Ce	Pr	Nd	Sm	Y	Eu	Gd	Tb	Dy	Sc	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Gemona Ferimon Infiorescenza	GFFn	1,21	1,42	1,65	1,79	2,13	1,50	2,37	2,55	2,93	2,01	2,23	2,26	1,51	1,69	1,22	1,17
Gemona Fedora Infiorescenza	GFFe	0,47	0,68	0,78	0,96	0,92	0,91	1,21	1,18	1,49	1,18	1,13	1,47	1,08	1,28	0,86	0,89
Gemona Futura Infiorescenza	GFFu	0,90	1,16	1,28	1,40	1,70	3,89	1,99	2,52	3,78	3,59	1,59	5,19	4,22	5,03	3,88	3,26
Gemona Zenit Infiorescenza	GFZe	0,93	1,10	1,24	1,26	1,40	1,22	2,19	1,57	1,79	1,26	1,45	1,50	1,08	1,15	0,85	0,87
Campoformido Ferimon Infiorescenza	<sup>b</sup> CFFn	2,46	1,54	1,62	1,67	1,73	1,50	2,19	1,16	2,38	1,69	2,18	1,99	1,41	1,54	1,11	1,07
Campoformido Fedora Infiorescenza	<sup>b</sup> CFFe	2,98	2,22	2,43	2,47	2,74	1,77	3,02	2,50	3,00	2,13	2,49	2,39	1,74	1,85	1,38	1,26
Campoformido Futura Infiorescenza	<sup>b</sup> CFFu	1,78	1,72	2,02	1,98	2,52	2,09	3,60	2,89	5,81	2,68	2,65	5,19	2,61	7,22	2,28	5,52
Campoformido Zenit Infiorescenza	<sup>b</sup> CFZe	4,27	4,38	5,35	5,59	6,50	6,02	7,48	7,31	8,54	6,18	4,90	7,31	5,25	6,02	4,46	4,27
Verzegnis Ferimon Infiorescenza	VZFn	0,53	0,94	1,04	1,04	1,15	0,62	1,46	1,19	1,37	0,93	1,37	1,10	0,79	0,99	0,63	0,73
Verzegnis Fedora Infiorescenza	VZFe	4,62	4,24	4,72	4,93	5,55	4,48	6,13	6,08	6,76	5,04	5,84	5,89	4,36	4,74	3,65	3,26
Verzegnis Futura Infiorescenza	VZFu	0,98	1,05	1,13	1,13	1,28	0,73	1,45	1,31	1,57	1,09	1,31	1,26	0,91	0,98	0,82	0,81
Verzegnis Zenit Infiorescenza	VZZe	0,73	0,90	1,00	1,09	1,28	0,66	1,43	1,24	1,43	0,95	1,26	1,22	0,86	0,98	0,69	0,79
<b>Sommatoria</b>		121,66					161,03					170,18					
		452,87															
Gemona Ferimon Stelo	GFFn	0,26	0,54	0,55	0,56	0,67	0,33	0,77	0,69	0,88	0,59	0,93	0,74	0,50	0,74	0,45	0,46
Gemona Fedora Stelo	GFFe	0,14	0,22	0,25	0,26	0,34	0,02	0,47	0,39	0,47	0,31	0,42	0,41	0,28	0,44	0,23	0,32
Gemona Futura Stelo	GFFu	0,94	1,16	1,28	1,32	1,53	0,88	1,64	1,70	1,76	1,18	1,39	1,38	1,00	1,25	0,84	0,78
Gemona Zenit Stelo	GFZe	0,26	0,34	0,36	0,37	0,50	0,38	0,63	0,59	0,91	0,64	0,57	0,78	0,57	0,64	0,46	0,48
Campoformido Ferimon Stelo	CFFn	1,37	0,90	0,95	1,01	1,15	0,70	1,35	0,48	1,26	0,92	0,79	1,10	0,79	0,81	0,63	0,58
Campoformido Fedora Stelo	CFFe	1,22	0,76	0,81	0,85	0,90	0,67	1,28	1,70	1,29	0,87	0,99	1,03	0,73	0,73	0,58	0,51
Campoformido Futura Stelo	CFFu	1,79	1,48	1,65	1,72	2,05	1,75	2,26	0,67	2,75	1,98	1,84	2,30	1,71	1,88	1,44	1,24
Campoformido Zenit Stelo	CFZe	0,00	0,36	0,35	0,34	0,32	0,00	0,37	0,32	0,37	0,22	0,27	0,30	0,20	0,27	0,14	0,24
Verzegnis Ferimon Stelo	VZFn	0,19	0,68	0,72	0,72	0,84	0,82	1,17	1,16	1,54	1,17	0,71	1,51	1,10	1,24	0,88	0,85
Verzegnis Fedora Stelo	VZFe	1,59	2,17	2,33	2,42	2,74	2,19	3,08	3,05	3,63	2,68	2,52	3,18	2,29	2,52	1,93	1,70
Verzegnis Futura Stelo	VZFu	0,62	1,11	1,23	1,22	1,44	0,65	1,54	1,39	1,64	1,05	1,15	1,28	0,88	1,06	0,76	0,71
Verzegnis Zenit Stelo	VZZe	1,39	1,38	1,53	1,58	2,05	1,48	2,20	2,16	2,62	1,97	2,13	2,30	1,68	1,85	1,40	1,26
<b>Sommatoria</b>		59,73					73,63					74,05					
		207,42															

\*GF=Gemona del Friuli (UD), CF=Campoformido (UD), VZ=Verzegnis (UD), Fn=Ferimon, Fe=Fedora 17, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, <sup>b</sup>=regime biologico.

**Tabella A.5**

**Tabella A. 5:** Valori normalizzati secondo EAS (tranne lo Sc, normalizzando secondo PAAS) delle concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) delle terre rare di tutte le parti di canapa raccolte nel 2019. La tabella è suddivisa in LREE (Light Rare Earth Elements), MREE (Medium Rare Earth Elements) e HREE (Heavy Rare Earth Elements). Per ogni parte della pianta (radice, stelo, infiorescenze e semi) vengono riportate le sommatorie delle concentrazioni degli elementi, divisi per LREE, MREE e HREE.

Campione	*Sigla	LIGHT					MEDIUM					HEAVY					
		La	Ce	Pr	Nd	Sm	Y	Eu	Gd	Tb	Dy	Sc	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Udine Zenit Radice	UDZef	45,03	42,88	50,79	52,81	62,58	57,38	65,88	67,60	61,93	54,09	42,86	52,20	45,88	40,18	37,65	35,19
Udine Futura Radice	UDFum	39,82	38,63	45,08	47,06	56,13	51,00	60,34	61,09	55,47	48,49	35,73	47,49	40,71	36,86	33,71	33,05
Udine Futura Radice	UDFuf	38,23	36,02	43,69	46,12	54,59	51,82	59,41	60,13	54,38	48,03	36,00	46,12	40,84	35,79	33,66	32,42
Caltagirone (CT) Futura Radice	CTFu_B	18,94	19,51	21,00	20,82	22,09	14,32	24,10	21,91	18,50	15,40	19,35	13,98	11,97	10,24	9,26	8,84
<b>Sommatoria</b>		<b>801,82</b>					<b>951,27</b>					<b>779,96</b>					
Udine Zenit Stelo	UDZef	1,94	1,73	2,04	2,10	2,36	2,39	2,94	2,72	2,32	2,24	1,95	2,00	1,84	1,41	1,51	1,44
Udine Futura Stelo	UDFum	1,55	1,04	1,24	1,31	1,55	1,44	1,83	1,61	1,40	1,33	1,38	1,20	1,06	0,78	0,90	0,96
Udine Futura Stelo	UDFuf	5,18	3,76	4,65	4,95	5,95	6,42	7,36	6,60	5,99	5,70	3,79	5,52	4,82	4,12	3,90	3,65
Piacenza Futura Stelo	PCFu	0,53	0,25	0,26	0,26	0,36	0,42	0,56	0,32	0,21	0,27	0,44	0,14	0,18	0,04	0,18	0,13
Piacenza Fibror Stelo	PCFb	0,53	0,33	0,37	0,39	0,36	0,40	0,65	0,44	0,25	0,25	0,48	0,16	0,18	0,00	0,09	0,12
Caltagirone Futura Stelo	CTFu_B	2,11	2,14	2,30	2,33	2,38	1,77	3,01	2,38	2,10	1,70	2,37	1,49	1,37	1,24	1,12	1,03
<b>Sommatoria</b>		<b>56,26</b>					<b>66,99</b>					<b>52,99</b>					
Pradaia (TN) Finola Infiorescenza	PDFi	2,04	1,20	1,37	1,38	1,21	1,09	2,31	1,36	1,07	0,94	1,89	0,93	0,82	0,65	0,61	0,62
Udine Zenit Infiorescenza	UDZef	7,82	6,85	7,64	8,04	9,24	7,39	10,60	9,42	8,00	6,79	7,43	6,41	5,58	4,85	4,54	4,19
Udine Futura Infiorescenza	UDFuf	3,83	3,61	4,45	4,69	5,51	5,00	5,16	5,93	5,16	4,53	3,95	4,25	3,66	3,22	3,12	2,81
Altopiano della Vigolana (TN) Finola Infiorescenza	AVFi	3,27	2,26	2,44	2,47	2,66	2,06	3,39	2,56	2,22	1,95	2,58	1,79	1,61	1,14	1,19	1,13
Seren del Grappa (BL) Futura Infiorescenza	SGFu	2,51	1,15	1,61	1,57	1,40	1,55	1,98	1,64	1,29	1,12	2,00	1,08	0,87	0,81	0,72	0,74
Piacenza Fibror Infiorescenza+semi	PCFb_sd	2,62	2,29	2,66	2,75	3,19	2,49	3,96	3,18	2,90	2,46	3,05	2,28	1,89	1,60	1,59	1,54
Piacenza Futura Infiorescenza+semi	PCFu_sd	4,26	3,88	4,38	4,42	5,12	3,91	5,82	5,08	4,56	3,93	5,36	3,75	3,19	2,48	2,46	2,48
Jesi (AN) Futura Infiorescenza	JEFu	2,20	2,02	2,17	2,23	2,40	2,46	3,55	2,60	2,69	2,11	2,41	1,85	1,81	1,53	1,49	1,46
Sassari Jubileum Infiorescenza	SSJu_B	9,90	9,46	9,18	9,19	10,11	8,05	10,61	10,02	8,93	8,01	7,69	7,60	6,84	6,03	5,88	5,65
Sassari Uso31 Infiorescenza	SSUs_B	11,12	10,21	11,46	11,31	11,59	7,85	12,65	11,32	9,24	7,79	7,05	7,44	6,43	5,79	5,51	5,36
Caltagirone (CT) Futura Infiorescenza	CTFu_B	6,98	7,01	7,58	7,52	8,02	6,24	10,62	7,86	6,95	6,10	7,27	5,86	5,02	4,83	4,06	3,42
<b>Sommatoria</b>		<b>277,42</b>					<b>278,46</b>					<b>225,13</b>					
Predaia (TN) Finola Semi	PDFi	0,27	0,01	0,02	0,03	0,03	0,04	0,08	0,03	0,00	0,02	0,08	0,00	0,04	0,00	0,01	0,00
Udine Zenit Semi	UDZef	9,79	9,48	11,12	11,66	13,68	11,43	14,55	14,43	12,62	10,86	9,48	10,30	8,72	7,50	7,29	7,12
Udine Futura semi	UDFuf	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Altopiano della Vigolana (TN) Finola Semi	AVFi	2,14	1,74	1,95	1,92	1,82	0,32	0,40	1,62	1,12	0,60	0,19	0,28	0,19	0,16	0,06	0,07
Seren del Grappa (BL) Futura Semi	SGFu	0,63	0,25	0,37	0,39	0,41	0,37	0,54	0,41	0,29	0,26	0,46	0,20	0,22	0,09	0,20	0,16
Jesi (AN) Carmagnola Semi	JECa	0,55	0,45	0,53	0,54	0,68	0,58	0,85	0,77	0,48	0,56	0,67	0,44	0,47	0,15	0,38	0,40
Sassari Jubileum Semi	SSJu_B	0,99	0,97	1,06	1,06	1,15	0,67	1,10	1,04	0,72	0,72	0,60	0,50	0,53	0,32	0,48	0,41
Sassari Uso 31 Semi	SSUs_B	1,14	1,13	1,23	1,21	1,26	0,77	1,27	1,18	0,95	0,82	0,73	0,70	0,65	0,48	0,57	0,51
Caltagirone Futura Semi	CTFu_B	0,50	0,48	0,50	0,52	0,52	0,41	0,69	0,50	0,39	0,45	0,91	0,33	0,31	0,22	0,27	0,22
<b>Sommatoria</b>		<b>84,20</b>					<b>84,88</b>					<b>64,08</b>					

\*PD=Predaia (TN), UD=Udine, AV=Altopiano della Vigolana (TN), SG=Seren del Grappa (BL), PC=Piacenza, JE=Jesi (AN), SS=Sassari, CT=Caltagirone, Fn=Ferimon, Fu=Futura 75, Ze=Zenit, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, m=fertilizzazione organica, b=certificato biologico.

## Tabella A.6

**Tabella A. 6:** Valori normalizzati secondo EAS (tranne lo Sc, normalizzando secondo PAAS) delle concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) delle terre rare di tutte le parti di canapa raccolte nel 2020. La tabella è suddivisa in LREE (Light Rare Earth Elements), MREE (Medium Rare Earth Elements) e HREE (Heavy Rare Earth Elements). Per ogni parte della pianta (radice, stelo, infiorescenze e semi) vengono riportate le sommatorie delle concentrazioni degli elementi, divisi per LREE, MREE e HREE.

Campione	*Sigla	LREE					MREE					HREE					
		La	Ce	Pr	Nd	Sm	Y	Eu	Gd	Tb	Dy	Sc	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Udine Futura Radice	UDFu	7.85	7.39	8.43	8.58	10.11	10.83	10.21	10.61	7.29	8.94	6.86	6.90	7.10	3.68	6.05	1.03
Sassari Futura Radice	SAUs_B	12.45	11.96	13.05	13.25	14.58	11.51	13.37	13.86	9.53	11.01	9.45	8.84	9.08	5.64	7.76	2.29
Camigliatello Silano (CS) Futura Radice	CAFu_B	55.25	34.75	39.02	35.99	35.14	22.85	20.09	32.61	26.10	23.11	12.53	18.97	15.31	10.45	10.59	5.64
Camigliatello Silano (CS) Fibror Radice	CAFr_B	64.09	35.73	42.96	39.30	37.15	28.47	22.98	36.44	29.80	27.11	13.28	22.35	18.96	14.06	15.62	11.03
<b>Sommatoria</b>		<b>527.04</b>					<b>376.73</b>					<b>243.48</b>					
Monno (BS) Futura Stelo	MOFu	2.54	2.49	2.34	2.41	2.31	1.84	1.47	1.91	0.00	1.20	1.22	0.00	0.61	0.00	0.50	0.00
Udine Futura Stelo	UDFu	0.19	0.18	0.21	0.02	0.03	0.26	0.03	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Seren del Grappa (BL) Futura Stelo	SEFu	1.05	0.12	0.13	0.27	0.09	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fiesso d'Artico (VE) Futura Stelo	FDFu	0.19	0.18	0.17	0.05	0.06	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sassari Uso31 + Jubileum Stelo	SAUsJu_B	1.59	1.35	1.26	1.30	1.23	1.32	0.48	1.00	0.00	0.82	0.38	0.00	0.40	0.00	0.60	0.00
Camigliatello Silano (CS) Futura Stelo	CAFu_B	24.50	7.32	9.82	8.10	6.19	5.05	4.14	6.27	3.30	4.10	1.87	2.20	2.03	0.09	0.93	0.00
Camigliatello Silano (CS) Fibror Stelo	CAFr_B	69.66	22.41	30.10	25.15	20.86	16.26	13.51	21.33	14.86	13.31	6.42	10.20	8.21	3.79	5.02	0.99
<b>Sommatoria</b>		<b>231.50</b>					<b>105.85</b>					<b>43.53</b>					
Monno (BS) Futura Infiorescenza	MOFu	18.30	17.68	18.84	19.08	20.19	15.18	19.55	19.45	15.35	15.55	14.10	13.50	13.13	11.03	13.48	9.28
Udine Futura Infiorescenza	UDFu	4.04	3.92	4.18	4.38	4.56	3.38	3.49	4.21	1.78	3.06	2.56	1.81	2.19	0.61	1.87	0.00
Seren del Grappa (BL) Futura Infiorescenza	SEFu	10.16	0.88	4.36	4.27	3.23	5.27	2.83	4.11	0.45	2.00	1.15	0.97	1.28	0.00	0.40	0.00
Fiesso d'Artico (VE) Futura Infiorescenza	FDFu	3.86	3.68	3.84	3.96	4.37	3.10	2.99	3.72	1.44	2.71	2.10	1.63	1.98	0.45	1.65	0.00
Rovigo Carmagnola Infiorescenza	ROFu	0.95	0.91	0.66	0.85	0.93	0.67	0.00	0.52	0.00	0.31	0.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sassari Uso31 + Jubileum Infiorescenza	SAUsJu_B	2.25	1.95	1.94	2.09	2.03	1.66	1.07	1.89	0.00	1.38	2.00	0.00	0.86	0.00	0.82	0.00
Camigliatello Silano (CS) Futura Infiorescenza	CAFu_B	169.64	90.32	111.70	103.56	90.29	55.61	47.24	86.58	66.08	52.12	26.20	43.16	33.30	23.32	21.34	14.97
Camigliatello Silano (CS) Fibror Infiorescenza	CAFr_B	284.61	154.83	181.85	159.62	177.24	114.15	91.44	156.58	138.32	109.41	68.06	84.18	70.25	51.86	45.36	36.42
Caltagirone (CT) Futura Infiorescenza	CTFu_B	6830.75	5952.78	9698.54	7296.06	11217.34	7234.32	30810.16	10997.32	42702.27	10320.52	9533.68	29926.63	15166.48	55742.47	15204.07	86181.20
<b>Sommatoria</b>		<b>1533.93</b>					<b>923.54</b>					<b>522.08</b>					
Monno (BS) Futura Semi	MOFu	0.55	0.45	0.24	0.36	0.24	0.11	0.00	0.00	0.00	0.03	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sassari Uso31 + Jubileum Semi	SAUsJu_B	3.25	3.35	3.30	3.45	3.57	2.38	2.57	3.05	0.05	2.34	2.02	0.45	1.53	0.00	1.32	0.00
Caltagirone (CT) Futura Semi	CTFu_B	3.63	1.03	0.49	0.57	0.57	0.42	2.08	0.00	2.12	0.59	1.01	1.87	1.79	0.38	0.02	0.00
<b>Sommatoria</b>		<b>25.05</b>					<b>15.75</b>					<b>10.81</b>					

\*UD=Udine, MO=Monno (BS), SG=Seren del Grappa (BL), FA=Fiesso d'Artico (VE), Ro=Rovigo, SS=Sassari, CS=Camigliatello Silano (CS), CT=Caltagirone, Fu=Futura 75, Fb=Fibror, Ca=Carmagnola, Ju=Jubileum, Us=Uso 31, R=Radice, S=Stelo, I=Infiorescenza, SD=Semi, \_B=regime biologico.



## **Allegato 1**





# Certificate of Analysis

## Standard Reference Material<sup>®</sup> 1515

### Apple Leaves

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in validating analytical methods for the determination of major, minor, and trace elements in botanical materials, agricultural food products, and similar materials. This SRM can be used for quality assurance when assigning values to in-house control materials. A unit of SRM 1515 consists of 50 grams of dried apple leaves of the Golden Delicious and Rome varieties.

**Certified Mass Fraction Values:** Certified mass fraction values for elements in SRM 1515, reported on a dry-mass basis, are provided in Table 1. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. Analyses for value assignment were performed by NIST and collaborating laboratories. Certified values were calculated using the results from a single definitive method or the weighted means of results from two or more different analytical methods combined using the DerSimonian-Laird procedure [2-4]. The associated uncertainties are expressed at an approximately 95 % level of confidence [5-6].

**Information Mass Fraction Values:** Information mass fraction values for several elements are provided in Table 2 as additional information on the composition of the material. A NIST information value is a value that may be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value, and therefore no uncertainty is provided [1]. Values are reported on a dry-mass basis in mass fraction units [7]. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

**Expiration of Certification:** The certification of **SRM 1515** is valid, within the measurement uncertainty specified, until **01 March 2027**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Storage and Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

**Maintenance of SRM Certification:** NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM was performed by D.A. Becker of the former NIST Inorganic Analytical Research Division. Revision of this certificate was coordinated by L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division.

Analytical measurements at NIST were performed by I.L. Barnes, E.S. Beary, D.A. Becker, D.S. Braverman, C.A. Clements, M.S. Epstein, R.R. Greenberg, L.B. Jassie, H.M. Kingston, J.R. Moody, T.J. Murphy, P.J. Paulsen, P.A. Pella, K.W. Pratt, T.A. Rush, G. Sleater, S.F. Stone, G.C. Turk, T.W. Vetter, R.D. Vocke, L.J. Wood, and X. Zhen of the NIST Chemical Sciences Division.

Statistical analysis was provided by W.F. Guthrie and S.B. Schiller of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

Carlos A. Gonzalez, Chief  
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 29 January 2019  
*Certificate Revision History on Last Page*

Steven J. Choquette, Director  
Office of Reference Materials

Analyses for value assignment were also performed by D.L. Anderson (Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, College Park, MD), A.R. Byrne and B. Smoldis (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Yugoslavia), J. Kucera (Nuclear Physics Institute, Rez, Czechoslovakia), and N. Miller-Ihli, (Nutrient Composition Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD).

## NOTICE AND WARNING TO USERS:

SRM 1515 IS INTENDED FOR RESEARCH USE ONLY.

## INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

**Storage:** The SRM should be stored in the dark at controlled room temperature (20 °C to 25 °C) in its original unopened bottle until required for use. The SRM should not be exposed to intense sources of radiation. The bottle can be resealed and test portions removed and analyzed until the material reaches its expiration date.

**Use:** The contents of the bottle should be thoroughly mixed by rotating and/or rolling the bottle before each use. Allow the contents to settle for one minute prior to opening to minimize the loss of fine particles. To relate analytical determinations to the certified values in this certificate, the test portion mass indicated in the description of the NIST analyses for each group of analytes (see "Source, Preparation, and Analysis" below) should be used. Test portions should be taken by gently tapping material needed from the SRM bottle. Results in this certificate are reported on a dry-mass basis; sample(s) need to be dried using one of the recommended techniques (see "Determination of Moisture") to compare results to certified values found in this certificate. Results obtained in analyses should include their own estimates of uncertainty and can be compared to the certified values using procedures described in reference 8.

**Determination of Moisture:** Moisture content of SRM 1515 was determined at NIST by (1) drying over fresh anhydrous magnesium perchlorate in a desiccator at room temperature for 120 h (sample depth should not exceed 1 cm) and (2) freeze drying for 24 h at a pressure of 13.3 Pa or lower and a shelf temperature of -5 °C or lower after having frozen the sample (not to exceed 1 cm in depth) at -40 °C or lower for at least 1 h. At the end of the 24-h period, samples were placed immediately in a desiccator with fresh anhydrous magnesium perchlorate. Samples were weighed after allowing a minimum of 4 h to establish temperature equilibrium. It is preferable to analyze volatile elements such as mercury from the bottle without drying, determine the moisture content on a separate sample from the same bottle, and correct the analytical results to a dry-mass basis.

Vacuum drying at room temperature and oven drying at elevated temperatures have resulted in excessive mass losses and therefore are **NOT** recommended.

## SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS<sup>(1)</sup>

**Source and Preparation:** The plant material for this SRM is mid-shoot leaves, collected from equal amounts of Golden Delicious and Rome varieties, picked from orchards at the Horticultural Research Farm at Rock Spring, PA, and from orchards adjacent to the Fruit Research Laboratory at Biglerville, PA. The material for this SRM was collected and prepared under the direction of C.B Smith, College of Agriculture, The Pennsylvania State University, University Park, PA. Fungicide and insecticide sprays were controlled to minimize heavy metal contamination. The leaves were dried and ground in a stainless-steel mill to pass a 1 mm screen. At NIST, the ground leaves were jet milled and air classified to a particle size of approximately 75 µm (200 mesh). Prior to bottling, the material was irradiated by <sup>60</sup>Co to an estimated minimum absorbed dose of 27.8 kGy for microbial control.

**Analytical Approach for Determination of Elements:** Value assignment of the mass fractions of elements in SRM 1515 was based on measurements provided by NIST and collaborating laboratories, where appropriate. NIST provided measurements by using cold-vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS), direct current plasma optical emission spectrometry (DCP-OES), flame atomic emission spectrometry (FAES); inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID ICP-MS), isotope dilution thermal ionization mass spectrometry (ID TIMS), instrumental neutron activation analysis (INAA), Kjeldahl nitrogen determination (KJEL), laser-enhanced ionization spectrometry (LEIS), polarography (POL), and radiochemical neutron activation analysis (RNAA).

---

<sup>(1)</sup> Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

*NIST Analyses for Hg by CVAAS:* The mass fraction of mercury was determined by CVAAS from duplicate, nominal 2 g test portions taken from three bottles of SRM 1515. Samples were placed in digestion flasks with 10 mL HNO<sub>3</sub> and 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated gently for 2 h. Next, 5 mL of HClO<sub>4</sub> were added to each flask, and the solutions were heated to sulfuric acid fumes. Solutions were transferred to volumetric flasks where K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> was added until each solution turned yellow. Solutions were diluted to 100 mL. Quantification was based on a five-point calibration curve.

*NIST Analyses for Fe, Na, P, and Rb by DCP-OES or FAES:* Mass fractions of iron and phosphorus were determined by DCP-OES. Mass fractions of rubidium and sodium were determined by FAES. For each technique, duplicate, nominal 1 g test portions were taken from three bottles of SRM 1515. Samples were mixed with 1 g lithium metaborate in a platinum crucible, placed in a muffle furnace, allowed to reach a temperature of 1000 °C, and held for 1 h. When cool, the crucibles were placed in a beaker and shaken overnight in 5 % HNO<sub>3</sub>. Solutions were diluted to 100 mL. Quantification was based on the method of standard additions using the SRM 3100 series single element standard solutions.

*NIST Analyses for Al and P by ICP-OES:* Mass fractions of aluminum and phosphorus were determined by ICP-OES from duplicate, nominal 1 g test portions taken from three bottles of SRM 1515. Samples for P analyses were placed in Teflon beakers and wet ashed with a HNO<sub>3</sub>/HF/HClO<sub>4</sub> acid mixture. Samples for Al analyses were mixed with 1 g lithium metaborate in a platinum crucible, placed in a muffle furnace, allowed to reach a temperature of 1000 °C, and held for 1 h. When cool, the crucibles were placed in a beaker and shaken overnight in 5 % HNO<sub>3</sub>. Solutions were diluted to 100 mL. Quantification for Al and P was based on the method of standard additions using the SRM 3100 series single element standard solutions.

*NIST Analyses for B, Ba, Cd, Mo, Ni, and Sr by ID ICP-MS:* Mass fractions of boron, barium, molybdenum, nickel, and strontium were determined by ID ICP-MS from duplicate, nominal 1.0 g test portions taken from each of three bottles of SRM 1515. Single 2.0 g test portions were taken from each of six bottles for cadmium measurements. Samples were spiked with isotopically enriched <sup>135</sup>Ba, <sup>111</sup>Cd, <sup>97</sup>Mo, <sup>62</sup>Ni, and <sup>86</sup>Sr and then wet ashed with a HNO<sub>3</sub>/HF/HClO<sub>4</sub> acid mixture in Teflon beakers. For boron, samples were spiked with isotopically enriched <sup>10</sup>B and then were dissolved in quartz flasks with reflux condensers using a HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mixture. The digests were placed on either a cation or an anion exchange column to selectively remove the elements of interest. The isotopic ratios were measured by ICP-MS using standard operating conditions. Quantification for the above analyses was based on the method of spiked calibrations using precisely weighed high purity metals of known origin.

*NIST Analyses for Ca, Pb, Mg, and K by ID TIMS:* Mass fractions of calcium, lead, magnesium, and potassium were determined by ID TIMS from duplicate, nominal 1.0 g test portions taken from each of three bottles of SRM 1515. Samples were spiked with isotopically enriched <sup>42</sup>Ca, <sup>206</sup>Pb, <sup>41</sup>K and <sup>26</sup>Mg and then wet ashed with a HNO<sub>3</sub>/HF/HClO<sub>4</sub> acid mixture in Teflon beakers. The digests were placed on either an anion or cation exchange column to selectively remove the elements of interest. Thermal ionization was performed using a triple filament procedure and internal normalization of measured ratios. Quantification for the above analyses was based on the method of spiked calibrations using precisely weighed high purity metals of known origin.

*NIST Analyses for N by KJEL:* The mass fraction of nitrogen was determined by KJEL from single, nominal 2 g test portions taken from six bottles of SRM 1515. Sample preparation was based on the AOAC method 2.057, Improved Method for Nitrate-Free Samples, 14<sup>th</sup> edition.

*NIST Analyses for Mn and Ni by LEIS:* Mass fractions of manganese and nickel were determined by LEIS from duplicate, nominal 0.5 g test portions taken from each of three bottles of SRM 1515. Samples were digested in a microwave sample preparation system with subsequent hot plate digestion using a HNO<sub>3</sub>/HF/HClO<sub>4</sub> acid mixture. Single wavelength excitation was performed at 279.83 nm for manganese and 300.25 nm for nickel. Quantification was based on the method of standard additions using SRM 3132 *Manganese (Mn) Standard Solution* and high purity metals of known origin.

*NIST Analyses for Al, Ba, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, V, and Zn by INAA:* Mass fractions of aluminum, barium, calcium, chlorine, iron, potassium, magnesium, manganese, rubidium, sodium, vanadium, and zinc in SRM 1515 were determined by INAA from single, nominal 0.1 g test portions taken from each of 15 bottles of SRM 1515. Samples, controls, and standards were pressed into cylindrical pellets, packaged individually in clean polyethylene bags, and irradiated for 60 s. For determination of aluminum and vanadium, radioactive decay was counted for 6 min after a decay of 2 min. For determination of calcium and magnesium, radioactive decay was counted for 12 min after a decay of 9 min. For determination of chlorine, radioactive decay was counted for 30 min after a decay of 22 min. For determination of barium, manganese, sodium, and potassium, radioactive decay was counted for 5 h to 8 h after a decay of 60 min. For determination of iron, rubidium, and zinc, radioactive decay was counted for at least 3 d after a

decay of 60 d to 120 d. Quantification was based on pure elements or compounds on compressed filter papers and foil fluence monitors.

*NIST Analyses for Cd, Cu, and Mo by RNAA:* Mass fractions of cadmium, copper, and molybdenum were determined by RNAA from duplicate, nominal 0.15 g test portions taken from each of three bottles of SRM 1515. Samples were placed in quartz vessels and irradiated for 2 h at 19 MW. After several days, samples were transferred to Teflon vessels using a HNO<sub>3</sub>/HF/HClO<sub>4</sub> acid mixture. Samples were heated, the acid reduced, and samples were brought up to volume in 1 mol/L HNO<sub>3</sub>. Samples were passed through a column and fractions separated. Fractions were counted after a 24 h decay for Cd and Cu and after a 48 h decay for Mo. Quantification was based on irradiated and un-irradiated standard solution carriers added to sample materials.

*NIST Analyses for Cu and Zn by POL:* Mass fractions of copper and zinc in SRM 1515 were determined by polarography from duplicate, nominal 0.7 g test portions taken from each of three bottles of SRM 1515. Samples were weighed into PFA pressure vessels with 5 g HNO<sub>3</sub>, 2 g HF, and 10 g HClO<sub>4</sub> and heated for 12 h. Additional HF and HClO<sub>4</sub> were added, and the vessels were heated for 30 h. Determinations were performed by differential pulse polarography using a PAR 384B electrode stand. Copper was determined in 0.5 mol/L HNO<sub>3</sub> using the method of standard additions. Zinc was determined in 0.25 mol/L CH<sub>3</sub>COOH + 0.25 mol/L NH<sub>4</sub>CHOO buffer, pH 4.7, using a 3-point calibration curve.

**Homogeneity Assessment:** Samples from randomly selected bottles of SRM 1515 were tested for homogeneity by INAA. No evidence of statistically significant inhomogeneity was observed.

**Value Assignment:** Calculations of assigned values are based on results from a single definitive method or on weighted means of multiple assessments of the mass fraction of each element made using different chemical methods or in different laboratories. Weighted means were calculated using the DerSimonian-Laird procedure [2], which weights the results from each method in proportion to the inverse of the square of its uncertainty. The weights include uncertainty contributions from both between- and within-method dispersion of values.

**Certified Mass Fraction Values for Elements:** Each certified mass fraction value is the combined mean from the means of NIST data and the results provided by collaborating laboratories, where appropriate. The uncertainty provided with each value is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as  $U = ku_c$ , where  $u_c$  incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties and an uncertainty component for moisture correction, consistent with the JCGM Guide and with its Supplement 1,  $k$  is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence used to control the level of confidence, and  $u_c$  is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of all between- and within-method components of uncertainty [5,6]. The measurand is the total mass fraction for each element, on a dry-mass basis, listed in Table 1. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as milligrams per kilogram).

Table 1. Certified Mass Fraction Values for Elements in SRM 1515

	Mass Fraction (mg/kg)		Coverage Factor, $k$
Aluminum (Al) <sup>(a,b)</sup>	284.5	± 5.8	2.00
Boron (B) <sup>(c,d)</sup>	27.6	± 2.8	2.02
Barium (Ba) <sup>(b,c)</sup>	48.8	± 2.3	1.95
Cadmium (Cd) <sup>(c,e)</sup>	0.0132	± 0.0015	2.04
Calcium (Ca) <sup>(b,f)</sup>	15250	± 100	2.03
Chlorine (Cl) <sup>(b,d)</sup>	582	± 15	2.01
Copper (Cu) <sup>(e,g)</sup>	5.69	± 0.13	1.95
Iron (Fe) <sup>(b,h)</sup>	82.7	± 2.6	1.99
Lead (Pb) <sup>(f)</sup>	0.470	± 0.024	3.35
Magnesium (Mg) <sup>(b,f)</sup>	2710	± 120	2.03
Manganese (Mn) <sup>(b,i)</sup>	54.1	± 1.1	2.02
Mercury (Hg) <sup>(j,k)</sup>	0.0432	± 0.0023	2.05
Molybdenum (Mo) <sup>(c,e,l)</sup>	0.095	± 0.011	2.02
Nickel (Ni) <sup>(c,i)</sup>	0.936	± 0.094	2.03
Nitrogen (Total) (N) <sup>(d,m)</sup>	22990	± 900	2.07
Phosphorus (P) <sup>(a,h)</sup>	1593	± 68	2.04
Potassium (K) <sup>(b,f)</sup>	16080	± 210	1.99
Rubidium (Rb) <sup>(b,n)</sup>	10.2	± 1.6	1.98
Sodium (Na) <sup>(b,n)</sup>	24.4	± 2.1	2.03
Strontium (Sr) <sup>(c,o)</sup>	25.1	± 1.1	2.48
Vanadium (V) <sup>(b,l)</sup>	0.254	± 0.027	2.01
Zinc (Zn) <sup>(b,g)</sup>	12.45	± 0.43	1.97

<sup>(a)</sup> NIST ICP-OES

<sup>(b)</sup> NIST INAA

<sup>(c)</sup> NIST ID ICP-MS

<sup>(d)</sup> Collaborating laboratories. Reported methods included PGAA.

<sup>(e)</sup> NIST RNAA

<sup>(f)</sup> NIST ID TIMS

<sup>(g)</sup> NIST POL

<sup>(h)</sup> NIST DCP-OES

<sup>(i)</sup> NIST LEIS

<sup>(j)</sup> NIST CVAAS

<sup>(k)</sup> Collaborating laboratories. Reported methods included RNAA and CVAAS.

<sup>(l)</sup> Collaborating laboratories. Reported methods included RNAA.

<sup>(m)</sup> NIST KJEL

<sup>(n)</sup> NIST FAES

<sup>(o)</sup> Collaborating laboratories. Reported methods included INAA.

**Information Mass Fraction Values for Elements:** Each information mass fraction value is the mean result from analyses provided by NIST. No uncertainty is provided because there is insufficient information available for its assessment. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

Table 2. Information Mass Fraction Values for Elements in SRM 1515

	Mass Fraction (mg/kg)
Nitrogen (N) <sup>(a)</sup>	23100
Sulfur (S)	1800
Antimony (Sb)	0.013
Bromine (Br)	1.8
Cerium (Ce)	3
Chromium (Cr)	0.3
Cobalt (Co)	0.09
Europium (Eu)	0.2
Gadolinium (Gd)	3
Gold (Au)	0.001
Iodine (I)	0.3
Lanthanum (La)	20
Neodymium (Nd)	17
Samarium (Sm)	3
Scandium (Sc)	0.03
Terbium (Tb)	0.4
Thorium (Th)	0.03
Tungsten (W)	0.007
Uranium (U)	0.006
Ytterbium (Yb)	0.3

<sup>(a)</sup> NIST KJEL. Although total nitrogen is certified, nitrogen determined by the Kjeldahl procedure is not.

## REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2000); available at <https://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed Jan 2019).
- [2] DerSimonian, R; Laird, N.; *Meta-Analysis in Clinical Trials*; *Controlled Clin. Trials*, Vol. 7, pp. 177–188 (1986).
- [3] Rukhin, A.L.; *Weighted Means Statistics in Interlaboratory Studies*; *Metrologia*, Vol. 46, pp 323–331 (2009).
- [4] Possolo, A.; *RandomEffects-Functions-2011-08-25a.R*, working file of R source code for fitting Gaussian random effects models (2011).
- [5] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; (GUM 1995 with Minor Corrections), Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) (2008); available at [https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf) (accessed Jan 2019); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <https://www.nist.gov/pml/pubs/index.cfm> (accessed Jan 2019).
- [6] JCGM 101:2008; *Evaluation of Measurement Data – Supplement 1 to the “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement” - Propagation of Distributions using a Monte Carlo Method*; JCGM (2008); available at [https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_101\\_2008\\_E.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf) (accessed Jan 2019).
- [7] Thompson, A.; Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2008); available at <https://www.nist.gov/pml/pubs/sp811/index.cfm> (accessed Jan 2019).
- [8] Sharpless, K.E.; Lippa, K.A.; Duewer, D.L.; Rukhin, A.L.; *The ABCs of Using Standard Reference Materials in the Analysis of Foods and Dietary Supplements: A Practical Guide*; NIST Special Publication 260-181; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2014); available at <https://www.nist.gov/srm/upload/SP260-181.pdf> (accessed Jan 2019).

**Certificate Revision History:** **29 January 2019** (Corrected Ytterbium symbol; editorial changes); **21 April 2017** (Certified values brought into compliance with the NIST uncertainty policy; removed values for As and Se; updated instructions for use; editorial changes); **22 January 1993** (Editorial changes); **02 July 1991** (Original certificate date).

*Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail [srminfo@nist.gov](mailto:srminfo@nist.gov); or via the Internet at <https://www.nist.gov/srm>.*

## **Allegato 2**





# National Institute of Standards & Technology

## Certificate of Analysis

### Standard Reference Material<sup>®</sup> 987

#### Strontium Carbonate (Isotopic Standard)

This Standard Reference Material (SRM) is certified for use as an isotopic reference material for the calibration of mass spectrometers. The material consists of highly purified strontium carbonate of high homogeneity. A unit of SRM 987 consists of 1 g of powder.

**Certified Values:** The certified values for the absolute strontium isotopic abundance ratios and the atom fractions of <sup>88</sup>Sr, <sup>87</sup>Sr, <sup>86</sup>Sr and <sup>84</sup>Sr are listed in Table 1. A NIST-certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy, in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST. A certified value is the present best estimate of the true value based on the results of analyses performed at NIST and cooperating laboratories. Value assignment categories are based on the definition of terms and modes used at NIST for chemical reference materials [1]. The uncertainties listed with the values are expanded uncertainties (95 % confidence interval) and are calculated according to the methods in the ISO and NIST Guides [2].

Table 1. Certified Values for SRM 987 Strontium Carbonate

Absolute Abundance Ratios	$^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 8.378\ 61 \pm 0.003\ 25$
	$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0.710\ 34 \pm 0.000\ 26$
	$^{84}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0.056\ 55 \pm 0.000\ 14$
that yield atom percents of:	$^{88}\text{Sr} = 82.584\ 5 \pm 0.006\ 6$
	$^{87}\text{Sr} = 7.001\ 5 \pm 0.002\ 6$
	$^{86}\text{Sr} = 9.856\ 6 \pm 0.003\ 4$
	$^{84}\text{Sr} = 0.557\ 4 \pm 0.001\ 5$

This material was used as the reference sample in a determination of the absolute abundance ratios and atomic weight of strontium [3]. The atomic weight of strontium calculated from the absolute abundance ratios is  $87.616\ 81 \pm 0.000\ 12$ .

**Expiration of Certification:** The certification of this SRM is deemed to be indefinite within the stated uncertainties. However, certification is nullified if the SRM is contaminated or otherwise altered.

**Maintenance of Certified Values:** NIST will monitor this SRM and, if substantive changes occur in the certified values, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Stephen A. Wise, Chief  
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief  
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 19 June 2007  
*See Certificate Revision History on Last Page*

The overall direction and coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM were performed under the chairmanship of I.L. Barnes and W.R. Shields of the NIST Analytical Chemistry Division.

The characterization of this SRM was performed by G. Marinenko, E.E. Etz, D.G. Friend, I.L. Barnes, L.J. Moore, T.C. Rains, T.A. Rush, L.A. Machlan, T.J. Murphy, and P.J. Paulsen, all of the NIST Analytical Chemistry Division.

The support aspects involved in the preparation of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division. The current revised certificate was coordinated by Robert D. Vocke, Jr. of the Analytical Chemistry Division.

**Storage and Handling:** There are no special storage or handling instructions. While strontium carbonate is slightly hygroscopic (absorbing approximately 0.02 % moisture at 90 % humidity), this has no effect on the isotopic abundances.

The strontium carbonate used for this SRM was obtained from Spex Industries, Inc<sup>1</sup>. of Metuchen, NJ. The material, when received, was of high purity in relation to cationic impurities but assayed only 99.0 % due to moisture and other volatile impurities. The impurities reported in the strontium carbonate material are lithium, 4 mg/kg; sodium, 6 mg/kg; potassium, < 1 mg/kg; magnesium, < 2 mg/kg; calcium, 5 mg/kg; barium, < 15 mg/kg; copper, < 3 mg/kg; iron, < 3 mg/kg; aluminum, < 1 mg/kg; and silicon, < 1 mg/kg.

#### REFERENCES

- [1] May, W.E.; Parris, R.M.; Beck II, C.M.; Fassett, J.D.; Greenberg, R.R.; Guenther, F.R.; Kramer, G.W.; Wise, S.A.; Gills, T.E.; Colbert, J.C.; Gettings, R.J.; MacDonald, B.S.; *Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Spec. Pub. 260-136, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2000).
- [2] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; ISBN 92-67-10188-9, 1st ed., International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [3] Moore, L.J.; Murphy, T.J.; Barnes, I.L.; Paulsen, P.J.; *Absolute Isotopic Abundance Ratios and Atomic Weight of a Reference Sample of Strontium*, J. of Res. (NBS) Vol. 87, No. 1, pp. 1–8 (1982).

**Certificate Revision History:** 19 June 2007 (Editorial change); 14 June 2007 (Editorial changes and revised as isotopic standard only); 01 May 2000 (Editorial changes); 01 October 1982 (Revision of certified values); 06 March 1972 (Editorial changes); 08 November 1971 (Original certificate date).

*Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail [srminfo@nist.gov](mailto:srminfo@nist.gov); or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.*

---

<sup>1</sup>Certain commercial equipment, instrumentation, or materials are identified in this certificate to specify adequately the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the NIST, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

## **Allegato 3**

*Short Original Communication - Environmental Science and Pollution Research*

***“Distribution pattern of Rare Earth Elements in four different industrial hemp cultivars (*Cannabis sativa L.*) grown in Friuli Venezia Giulia, Italy”***



Communication

# Isotopic Characterization of Italian Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Intended for Food Use: A First Exploratory Study

Marco Calvi <sup>1,2,\*</sup> , Luana Bontempo <sup>3</sup> , Sarah Pizzini <sup>1,†</sup> , Lorenzo Cucinotta <sup>3,4</sup> , Federica Camin <sup>3,5,‡</sup>   
and Barbara Stenni <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University of Venice, Via Torino, 155, 30172 Venice Mestre, Italy; sarah.pizzini@unive.it (S.P.); barbara.stenni@unive.it (B.S.)

<sup>2</sup> Certottica S.c.r.l.—Italian Institute of Certification of Optical Products, Villanova Industrial Area, 32013 Longarone, Italy

<sup>3</sup> Traceability Unit, Research and Innovation Center, Edmund Mach Foundation (FEM), Via E. Mach, 1, 38098 San Michele all'Adige, Italy; luana.bontempo@fmach.it (L.B.); lorenzo.cucinotta@unime.it (L.C.); federica.camin@unitn.it (F.C.)

<sup>4</sup> Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Annunziata, 98168 Messina, Italy

<sup>5</sup> Center Agriculture Food Environment (C3A), University of Trento, Via E. Mach, 1, 38098 San Michele all'Adige, Italy

\* Correspondence: marco.calvi@unive.it; Tel.: +39-041-234-8637

† Current affiliation: Institute for Marine Biological Resources and Biotechnology, National Research Council (CNR-IRBIM), Largo Fiera della Pesca, 2, 60125 Ancona, Italy.

‡ Current affiliation: International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna International Center, P.O. Box 100, 1400 Vienna, Austria.



**Citation:** Calvi, M.; Bontempo, L.; Pizzini, S.; Cucinotta, L.; Camin, F.; Stenni, B. Isotopic Characterization of Italian Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Intended for Food Use: A First Exploratory Study. *Separations* **2022**, *9*, 136. <https://doi.org/10.3390/separations9060136>

Academic Editor: Sara Cunha

Received: 6 May 2022

Accepted: 26 May 2022

Published: 29 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In this study, Italian industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) intended for food use was isotopically characterized for the first time. The stable isotope ratios of five bioelements were analyzed in different parts of the plant (i.e., roots, stems, inflorescences, and seeds) sampled in eight different regions of Italy, and in five hemp seed oils. The values of  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$  differed according to the latitude and, therefore, to the geographical origin of the samples and the climate conditions of plant growth, while the  $\delta^{15}\text{N}$  values allowed us to distinguish between crops grown under conventional and organic fertilization. The findings from this preliminary study corroborate the reliability of using light stable isotope ratios to characterize hemp and its derived food products and contribute to the creation of a first isotopic database for this plant, paving the way for future studies on authentication, traceability, and verification of organic labeling.

**Keywords:** hemp; *Cannabis sativa*; H, C, N, O, S stable isotopes; Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS); geographical origin; climate conditions

## 1. Introduction

Hemp is the common name of *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753), an annual and principally dioecious tall weed based on the C3 photosynthetic cycle [1], belonging to the family *Cannabaceae* [2]. It has a large number of traditional and innovative applications in different sectors, encompassing, among others, fuel, textiles, green building, and foodstuff, resulting in its global distribution as an emerging high-value specialty crop [3,4]. Particular interest has been aroused by hemp essential oils and bioactive compounds (e.g., non-psychoactive cannabinoids, flavonoids, terpenes, etc.), as well as by their cosmetic, nutraceutical, and pharmaceutical formulations, prompting several reviews summarizing traditional and innovative technologies (e.g., supercritical CO<sub>2</sub>) to effectively extract them from the plant while preserving their biological properties [5–8].

Nowadays, thanks to the increasing attention paid to healthy food and alternative diets (e.g., gluten-free, vegan, and vegetarian), the consumption of hemp flour-based products, hemp seeds, and oil is spreading widely. Hemp has a long history of cultivation in Italy [9]. It is noteworthy that Italy was the second world's largest hemp producer until the Second World War [10] and in the 1950s, it was still one of the most important global hemp industries [11]. After years of planting ban, the Italian Law 242/2016 [12] has legalized the cultivation of industrial hemp again, so long as it has a content of delta-9-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) lower than 0.2%. The introduction of this law led to an increase of hemp-cultivated fields, whose extension increased from 400 hectares in 2013 to 4000 hectares in 2018 [13].

Since the Italian market for hemp and its derived food products is becoming increasingly important [9,14], in 2021, the Italian hemp Federation has established the first guidelines for hemp cultivation (for plants intended for both the production of extracts and food use). The future aim is to define a proper rulebook, thus enhancing the product value and counteracting emerging cases of adulteration, especially arising from the use of foreign hemp seed oils of doubtful origin and quality [15,16].

In the literature, one of the most widely used methods for agro-product authentication and traceability is the stable isotope ratio analysis of bioelements [17–19]. Isotopic ratio measurements have indeed proven to be a valid tool to discriminate between biological and environmental processes and therefore provide a specific fingerprint of a product that is directly linked to its geographical and ecological origin [20]. Studies based on stable isotopes of *C. sativa* are mainly focused on defining the routes of marijuana illicit traffic and use the light stable isotopes (i.e., H, C, N, O) to track the origin of drug plantations [21–24], not considering the others multiple applications of hemp. To date, the potential of stable isotope ratio analysis of Italian industrial hemp intended for food use has not been explored.

The aim of this exploratory study was to determine the specific value ranges of five light stable isotope ratios (i.e.,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$ ) in Italian industrial hemp intended for food use, thus contributing to create a first isotopic database for this plant and paving the way for future studies on the authentication and traceability of food products derived from hemp, such as hemp flour-based foodstuffs, and the verification of their possible organic labeling, safeguarding the product and the producers against emerging cases of adulteration.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling and Cultivation Sites

Eighty-four samples of hemp grown in open fields (8 roots, 26 stems, 38 inflorescences, and 12 seeds) and 5 hemp seed oil samples were hand-collected in 8 different regions of Italy between 2018 and 2019 (Figure 1). Udine sampling site in Friuli Venezia Giulia region (NE Italy; point No. 14 in Figure 1), has been the subject of a specific focus as all the parts of the hemp plant (roots, stem, inflorescences, and seeds) were sampled from two different cultivations: one subjected to synthetic fertilization (nitrogen-phosphorus-potassium, NPK), and one subjected to manure fertilization.

Every analyzed sample consisted of a pool of five-six plants separated into their different parts, which were then stored in polyethylene bags and kept at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  until treatment. Details related to the location of the sampling sites, hemp cultivars, method of cultivation (conventional or organic), and extension of hemp fields are reported in Supplementary Material Table S1.

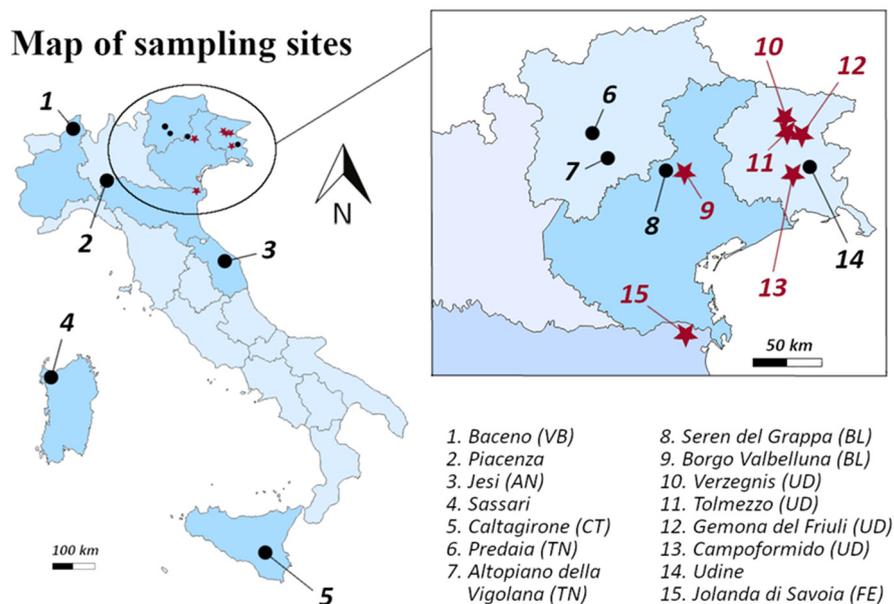


Figure 1. Map of the 2018 (red stars) and 2019 (black circles) sampling sites.

### 2.2. Stable Isotope Ratio Analysis

Isotopic analysis was carried out on freeze-dried, ground, and homogenized samples, except for oils, which were directly analyzed. Details on the pre-treatment procedure and decontamination process are reported in the Supplementary Material.

About  $0.25 \pm 0.05$  mg of duplicate powdered sample were weighed into silver capsules for hydrogen ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) and oxygen ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) isotopic ratio analysis and introduced into a High-Temperature Conversion Elemental Analyzer (TC/EA), coupled with a Delta Plus XP Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS; Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany). For the analyses of carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ), and sulfur ( $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) isotopic ratios, about 2.5 mg of triplicate powdered sample were weighed into tin capsules and introduced into a vario EL cube EA, coupled with an isoprime precisION IRMS (Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Germany).

The isotopic ratios were reported in delta notation and calculated according to Brand and Coplen [25]:

$$\delta^i E = \frac{iR_{\text{sample}} - iR_{\text{standard}}}{iR_{\text{standard}}}$$

where the superscript  $i$  indicates the mass number of the heavier isotope of element  $E$  (e.g.,  $^{18}\text{O}$ ), and  $R$  indicates the isotopic ratio of  $E$  (e.g.,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) in the sample and in an internationally recognized standard (Vienna-Standard Mean Ocean Water (V-SMOW) for  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , Vienna-Pee Dee Belemnite (V-PDB) for  $\delta^{13}\text{C}$ , air nitrogen for  $\delta^{15}\text{N}$ , and Vienna-Canyon Diablo Troilite (V-CDT) for  $\delta^{34}\text{S}$ ). The delta values were multiplied by 1000 and expressed in ‰.

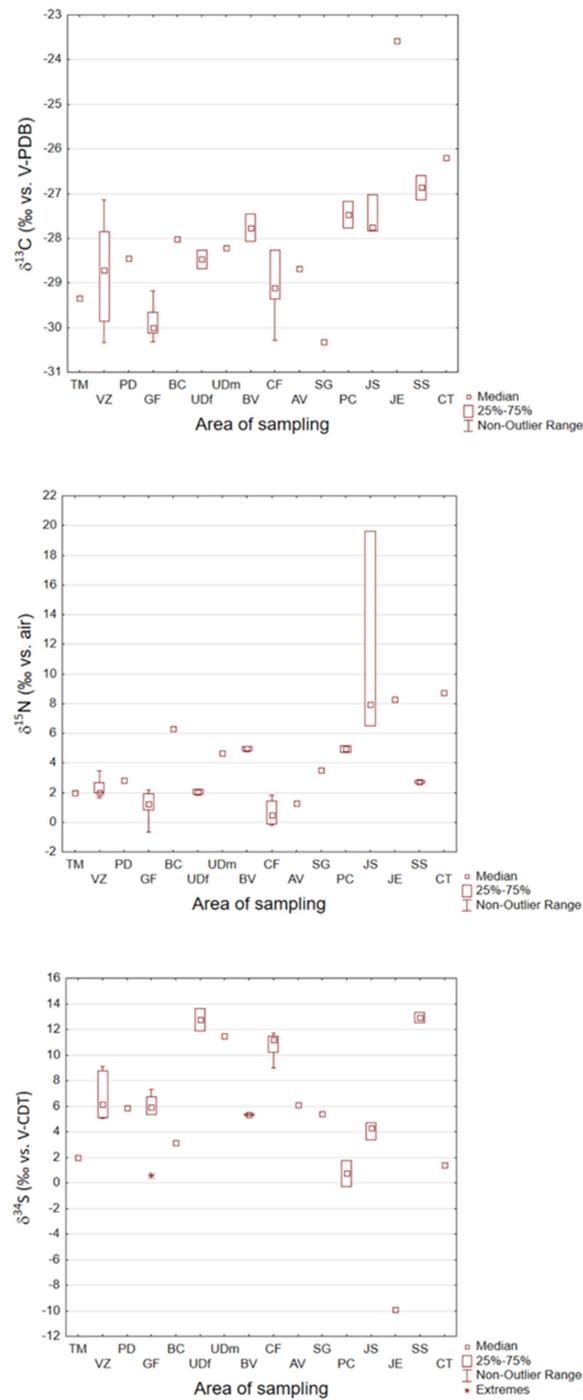
The isotopic values for  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  were calculated against the United States Geological Survey (USGS) international reference materials USGS54 (Canadian lodgepole pine;  $\delta^2\text{H} = -150.4\text{‰}$ ,  $\delta^{18}\text{O} = +17.79\text{‰}$ ) and USGS56 (South African red ivory wood;  $\delta^2\text{H} = -44.0\text{‰}$ ,  $\delta^{18}\text{O} = +27.23\text{‰}$ ). The isotopic values for  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$  were calculated against in-house working standards, which were themselves calibrated against the International Atomic Energy Agency (IAEA) and USGS international reference materials IAEA-CH-6 (sucrose;  $\delta^{13}\text{C} = -10.449\text{‰}$ ), NBS22 (mineral oil;  $\delta^{13}\text{C} = -30.031\text{‰}$ ), USGS40 (L-glutamic acid;  $\delta^{13}\text{C} = -26.39\text{‰}$ ,  $\delta^{15}\text{N} = -4.52\text{‰}$ ), IAEA-NO-3 (potassium nitrate;  $\delta^{15}\text{N} = +4.7\text{‰}$ ), IAEA-SO-5 (barium sulfate;  $\delta^{34}\text{S} = +0.5\text{‰}$ ), NBS127 (barium sulfate;  $\delta^{34}\text{S} = +20.3\text{‰}$ ), USGS42 (Tibetan human hair;  $\delta^{34}\text{S} = +7.84\text{‰}$ ), and USGS43 (Indian human hair;  $\delta^{34}\text{S} = +10.46\text{‰}$ ). Reports with certified/recommended val-



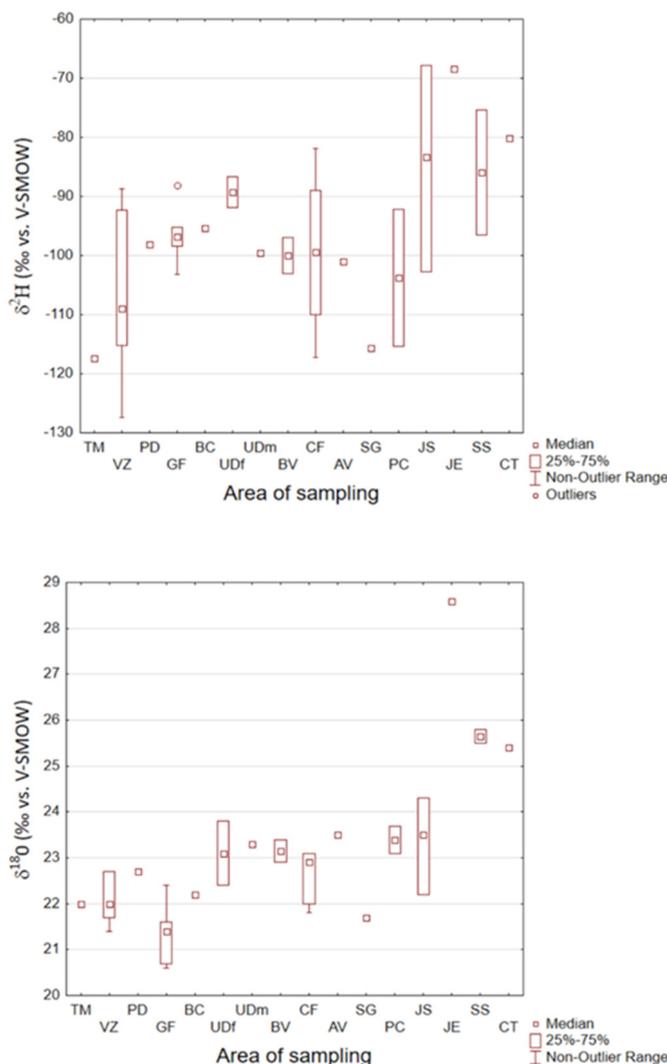
**Table 1.** *Cont.*

Samples		$\delta^2\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{18}\text{O}$		$\delta^{34}\text{S}$		
Area	Type *	n	Mean	S.Dev	Mean	S.Dev	Mean	S.Dev	Mean	S.Dev	Mean	S.Dev
Borgo Valbelluna (BL)	I	2	−100	4	−27.8	0.4	4.9	0.2	23.2	0.4	5.3	0.1
Campoformido (UD)	I	6	−103	10	−29.1	0.8	0.6	0.8	22.6	0.6	10.8	1.0
	S	6	−103	8	−28.7	0.5	1.1	0.5	23.2	0.3	8.6	1.6
	R	1	−117		−28.6		1.9		23.9		8.7	
Altopiano della Vigolana (TN)	SD	1	−141		−29.4		2.6		22.3		6.3	
	I	1	−101		−28.7		1.3		23.5		6.1	
Seren del Grappa (BL)	SD	1	−138		−30.9		3.6		21.5		4.5	
	I	1	−116		−30.3		3.5		21.7		5.4	
Piacenza	SD + I	2	−104	16	−27.5	0.4	5.0	0.3	23.4	0.4	0.7	1.4
	S	2	−84	2	−26.7	0.1	4.7	0.8	24.5	0.4	−1.2	0.8
Jolanda di Savoia (FE)	O	1	−200						20.9			
	I	3	−85	18	−27.5	0.4	11.3	7.2	23.3	1.1	4.1	0.7
Jesi (AN)	O	1	−181						22.4			
	SD	1	−118		−28.5		10.7		23.7		2.8	
	I	1	−68		−23.6		8.3		28.6		−9.9	
Sassari	O	1	−179						24.5			
	SD	2	−99	7	−27.8	0.4	3.1	0.7	27.3	0.2	10.5	0.2
	I	2	−86	15	−26.9	0.4	2.7	0.1	25.7	0.2	12.9	0.6
Caltagirone (CT)	O	1	−173						25.6			
	SD	1	−104		−25.8		7.3		28.7		1.4	
	I	1	−80		−26.2		8.7		25.4		1.4	
	S	1	−88		−27.6		7.9		26.5		0.5	
	R	1	−93		−27.3		7.1		27.8		2.6	
<i>Minimum value</i>			−200		−30.9		0.6		17.9		−9.9	
<i>Maximum value</i>			−68		−23.6		11.3		28.7		12.9	

\* Samples are labeled as follow: O = Oils, SD = Seeds, I = Inflorescences, S = Stems, R = Roots. Only for Udine sampling area: *f* = grown under synthetic fertilization, *m* = grown under bovine manure fertilization.



**Figure 2.** Box-plots of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$  values, expressed in ‰, of Italian industrial hemp inflorescence samples (*Cannabis sativa* L.) ordered according to the latitude of the sampling areas (from the highest to the lowest). V-PDB = Vienna-Pee Dee Belemnite, V-CDT = Vienna-Canyon Diablo Troilite, TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine (*f* = grown under synthetic fertilization, *m* = grown under bovine manure fertilization), BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campofornido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).



**Figure 3.** Box-plots of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values, expressed in ‰, of Italian industrial hemp inflorescence samples (*Cannabis sativa* L.) ordered according to the latitude of the sampling areas (from the highest to the lowest). V-SMOW = Vienna-Standard Mean Ocean Water, TM = Tolmezzo (UD), VZ = Verzegnis (UD), PD = Predaia (TN), GF = Gemona del Friuli (UD), BC = Baceno (VB), UD = Udine (*f* = grown under synthetic fertilization, *m* = grown under bovine manure fertilization), BV = Borgo Valbelluna (BL), CF = Campoformido (UD), AV = Altopiano della Vigolana (TN), SG = Seren del Grappa (BL), PC = Piacenza, JS = Jolanda di Savoia (FE), JE = Jesi (AN), SS = Sassari, CT = Caltagirone (CT).

### 3.1. Carbon, Nitrogen, and Sulfur Stable Isotope Ratios in Hemp

The carbon stable isotope ratio is strictly related to the photosynthetic cycle of the plant species considered but, on a lesser extent, it is also related to the climatic conditions of the place of growth of the plant [26]. In this study, as expected, the mean  $\delta^{13}\text{C}$  values were within the typical range of C3 plants [27], varying from  $-30.9$  to  $-23.6$ ‰ (Table 1). These values are in line with those reported in other literature studies aimed at tracking the routes of drug illicit traffic for seized marijuana samples grown outdoor in different regions of Brazil (from  $-32$  to  $-24$ ‰ in Shibuya et al. [23]) and the USA ( $-28.2$ ‰ as the mean outdoor value in West et al. [24]). Nevertheless, the paucity of literature data on stable isotope ratios of *C. sativa* makes a comparison with previous studies on this matter very difficult, especially considering that most of the research in this field has dealt with marijuana samples grown in indoor environment [21,22], characterized by a pronounced  $^{13}\text{C}$ -depletion (minimum  $\delta^{13}\text{C}$  values up to  $-53.8$ ‰ in Booth et al. [21];  $-51.8$ ‰ in West et al. [24]), thus exceeding the range characteristic of C3 plants [27]. Our data showed

a clear increasing trend as the latitude decreased (Figure 2), with the most negative values belonging to samples collected from Northern Italy, in agreement with the geographical and climatic conditions of the place of growth of hemp.

The nitrogen stable isotope ratio has been proposed as a marker to differentiate plants grown under conventional and organic regimes [28], since it reflects the type of fertilizer used for their growth. The  $\delta^{15}\text{N}$  values can vary from 0.3 to 14.6‰ in crops grown under organic fertilization and from  $-4.0$  to 8.7‰ in those grown under conventional fertilization [29]. An exception to the above-mentioned ranges is related to crops organically grown with a fertilization strategy based on nitrogen-fixing plants, which leads to lower  $\delta^{15}\text{N}$  values, within the range of conventionally grown crops [26]. In this study, the mean  $\delta^{15}\text{N}$  values ranged between 0.6 and 11.3‰, which corresponded to the hemp inflorescences collected at Campofornido (Friuli Venezia Giulia) and Jolanda di Savoia (Emilia Romagna), respectively (Table 1). Both samples were labeled as organically grown. However, the mean  $\delta^{15}\text{N}$  values in samples collected at Campofornido, Seren del Grappa (Veneto), and Sassari (Sardinia), all labeled as organically grown, fell into the conventional range (Table 1; Figure 2). This may be due to a fertilization strategy based on leguminous plants, which affected the nitrogen values of the samples, lowering them [26]. Worthy of note is the mean  $\delta^{15}\text{N}$  value (10.7‰) of seed sample collected at Jesi (the Marche; point No. 3 in Figure 1; Table 1). Although this was labeled as a cultivation area under conventional regime, its  $\delta^{15}\text{N}$  values fell into the organic range, maybe because of the use of organic fertilizers.

As reported in the literature, the sulfur stable isotope ratio is affected by different factors, such as distance from the sea, microbial processes, kind of soil, fertilizers used, and anthropogenic inputs [30–32]. Most of the samples analyzed in this study showed positive mean  $\delta^{34}\text{S}$  values ranging between 0.5 and 12.9‰, with the only exception of samples from Piacenza (Emilia Romagna) and Jesi sampling sites, which showed negative mean values ( $-1.2$  and  $-9.9$ ‰, respectively; Table 1). This range of values agrees with those reported by Paolini [30] for plants. Since plants present a limited process of isotopic fractionation for sulfur [27], their  $\delta^{34}\text{S}$  values have been related to those found in the soil, and therefore, to the geographical origin of the considered samples. It should be noted that the inflorescence samples of (1) Udine and Sassari and (2) Piacenza and Caltagirone (Sicily) showed similar mean  $\delta^{34}\text{S}$  values (12.7 and 12.9‰, 0.7 and 1.4‰, respectively; Table 1; Figure 2), even if these sampling sites are geographically far from each other (Figure 1). This could be explained by the common nature of the bedrocks: carbonate for the former, and clay/calcareous for the latter [33]. The sampling area of Jesi represents an exception here too, with the inflorescence sample that presented a quite negative mean  $\delta^{34}\text{S}$  value ( $-9.9$ ‰; Table 1; Figure 2), strongly different from that of all the other samples. This aspect is probably attributable to the geology of this area of Central Italy, where the Messinian evaporite formation may outcrop [33].

### 3.2. Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios in Hemp

The hydrogen and oxygen stable isotope ratios are influenced by climatic and geographical factors, which can deplete or enrich their values [34]. Furthermore, it is important to consider that the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values of plant organic matter reflect the plant's primary source of water (irrigation or soil) and undergo an enrichment process during evapotranspiration and cellulose synthesis by the plant [27]. In this study, the mean  $\delta^2\text{H}$  values ranged from  $-200$  to  $-68$ ‰, with the lower values detected in all the five hemp seed oil samples considered (see, Section 3.3), while the mean  $\delta^{18}\text{O}$  values ranged from 17.9 to 28.7‰ (Table 1).

Considering the inflorescence samples, increasing mean  $\delta^{18}\text{O}$  values were observed when moving from North to South (mean difference over 15‰; Figure 3), according to the meteorological conditions and the dynamic fractionation in the hydrological cycle [34]. The highest values were found in the sampling sites of Central and Southern Italy (i.e., Jesi, Sassari, and Caltagirone; Table 1; Figure 3), and this aspect can be related to two main factors: (i) the precipitation  $\delta^{18}\text{O}$  values [35] and (ii) the effects of warmer climates on

evapotranspiration processes, which further enrich hydrogen and oxygen isotopic ratios. A similar, although less evident, positive tendency was shown also by the mean  $\delta^2\text{H}$  values, which are strongly influenced, in organic matter, by the isotopic composition of the water taken up by the plant [36] and by photosynthetic metabolism of cellulose [37]. Also in this case, the sample collected at Jesi represented an outlier, and its less negative mean  $\delta^2\text{H}$  value ( $-68\text{‰}$ ; Table 1; Figure 3) could be related to precipitation values characteristic of coastal areas [35].

### 3.3. Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios in Hemp Seed Oil

In this work, we briefly investigated the hydrogen and oxygen stable isotope ratios in hemp seed oil bulk samples, collected in the following five different sampling sites, reported from North to South: Predaia, Jolanda di Savoia, Jesi, Sassari, and Caltagirone (Figure 1). As already reported in Section 3.2, the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values are generally affected by the climatic and geographical conditions of the considered sampling areas [38]. This aspect was highlighted also in the mean  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values detected in this study in hemp seed oil samples (Table 1). Indeed, the mean  $\delta^{18}\text{O}$  values showed a clear trend, with increasing values in samples from Predaia (Trentino-South Tyrol, NE Italy;  $17.9\text{‰}$ ) to Caltagirone (Sicily, S Italy;  $25.6\text{‰}$ ) sampling sites. The same tendency was observed for the mean  $\delta^2\text{H}$  values (Predaia,  $-197\text{‰}$ ; Caltagirone,  $-173\text{‰}$ ), with the only exception of Jolanda di Savoia (Emilia Romagna, N Italy) sampling site, whose sample presented the lowest mean value detected in this study ( $-200\text{‰}$ ; Table 1).

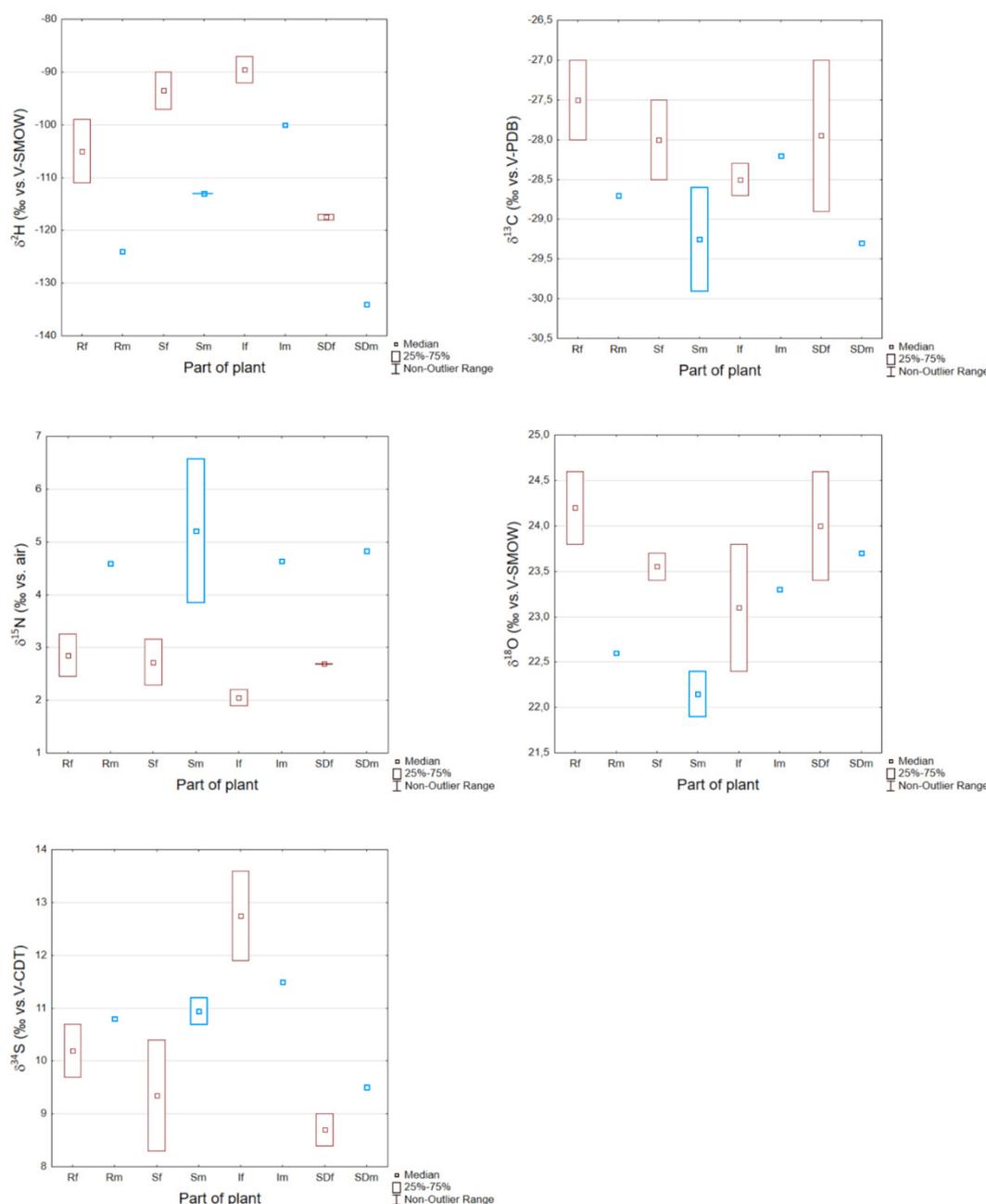
Marked differences were observed, as expected, in the mean  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values moving from seed to oil samples, with a mean decrease of  $65\text{‰}$  for the hydrogen isotopic ratio and of  $2.6\text{‰}$  for the oxygen isotopic ratio. Indeed, this decreasing trend reflects the depletion of the cellulosic component in favor of the lipidic one, which is largely  $^2\text{H}$ -depleted relative to the bulk of the organic matter [39].

Notwithstanding the limited number of hemp seed oil samples considered in our study, a comparison with the literature data was hampered by the lack of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  data on this matrix. To the best of our knowledge, the only research on stable isotope ratio analysis in hemp-derived oils was focused on  $\delta^{13}\text{C}$  determination in terpenes isolated from hemp inflorescence essential oils [40].

### 3.4. Insight on Stable Isotope Ratios in Hemp Collected at Udine Sampling Site

A specific focus was placed on the Udine sampling area in Friuli Venezia Giulia region (NE Italy; point No. 14 in Figure 1), whose samples were thoroughly analyzed, examining all parts of the hemp plant, from roots to seeds. Moreover, the samples were collected from two different cultivations: one grown under synthetic fertilization (NPK), and one under bovine manure fertilization.

This last aspect affected mainly the mean  $\delta^{15}\text{N}$  values, for which a marked enrichment (mean increase of  $2.3\text{‰}$ ) was observed in all parts of the hemp plant grown under organic fertilization (Figure 4). Conversely, all parts of the hemp plant grown under organic fertilization showed lower mean  $\delta^2\text{H}$  values than those from the conventionally fertilized cultivation, a tendency shown, although less evidently, also by the carbon and oxygen stable isotope ratios, except for the inflorescence samples (Figure 4). These trends have already been noticed for other kinds of plants such as wheat [41–43] and were hypothesized to be related to a higher transpiration and water evaporative loss in conventionally grown plants, and with differences in cultivation practices, such as plant density and growth rates, which can affect plant respiration, water uptake, and evapotranspiration. Lastly,  $\delta^{34}\text{S}$  exhibited more positive mean values in organically fertilized crops, with the exception of the inflorescence samples (Figure 4).



**Figure 4.** Box-plots of  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$  values, expressed in ‰, of Italian industrial hemp samples (*Cannabis sativa* L.) collected at the Udine sampling site in Friuli Venezia Giulia region (NE Italy), ordered according to the part of plant and the fertilization strategy (conventional in red, organic in blue). V-SMOW = Vienna-Standard Mean Ocean Water, V-PDB = Vienna-Pee Dee Belemnite, V-CDT = Vienna-Canyon Diablo Troilite, R = Roots, S = Stems, I = Inflorescences, SD = Seeds, *f* = grown under synthetic fertilization, *m* = grown under bovine manure fertilization.

Moving from the roots to the inflorescences, increasing mean  $\delta^2\text{H}$  values were observed, while a pronounced depletion was registered for the  $\delta^2\text{H}$  values in the inflorescences compared to the seeds (mean decrease of 32%; Table 1), likely due to the lower cellulose content and a higher content of lipids in seeds [39]. This pattern was observed in both organically and conventionally fertilized cultivations (Figure 4). When considering conventionally grown hemp, slightly decreasing mean  $\delta^{13}\text{C}$  values were observed moving from the roots to the inflorescences, while slightly increasing values were measured in the seed samples. This variability was not mirrored in organically grown hemp (Figure 4).

No noticeable difference was registered in the mean  $\delta^{15}\text{N}$  values moving from the roots to the seeds, regardless of the fertilization strategy (Figure 4). Instead, in conventionally grown hemp, slightly decreasing mean  $\delta^{18}\text{O}$  values were observed moving from the roots to the inflorescences, with a further slight enrichment in the seed samples. A different pattern was highlighted in organically grown hemp, with a decrease from the roots to the stems, and a further increase from the inflorescences to the seeds (Figure 4). The different trends between  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values could be related to additional biochemical or source effects [37], linked to water evaporation in the leaves or to organic matter synthesis [44]. No clear pattern was observed for the mean  $\delta^{34}\text{S}$  values, regardless of the fertilization strategy (Figure 4). However, even if the plants present a limited process of fractionation for sulfur [27] (Section 3.1), the mean  $\delta^{34}\text{S}$  values in hemp inflorescence samples were higher than those detected in all the other parts of the plant (Figure 4).

#### 4. Conclusions

This exploratory study allowed us to gather important data on the isotopic composition of Italian industrial hemp intended for food use, which will be useful in future studies to address authenticity and origin issues of this still little-investigated high-value emerging crop. The stable isotope ratios detected in this work showed peculiar characteristics that may be linked to samples' geographical origin, fertilization practices, and climatic conditions of the plant growth areas. In particular,  $\delta^{13}\text{C}$  and, to a lesser extent,  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , showed values clearly dependent on climatic conditions and latitudinal distribution of the investigated areas,  $\delta^{15}\text{N}$  values reflected conventional or organic fertilization practices, while  $\delta^{34}\text{S}$  values clustered different samples, probably according to the common nature of the bedrocks. A marked depletion in the mean  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values was observed in hemp seed oil bulk samples compared to seed samples, likely driven by the high content of lipids in oil.

A wider sampling, with more representative areas and carried out under different climatic conditions, is needed to achieve a more robust isotopic tracing of the origin of hemp and to better understand the behavior of light stable isotopes in the biogeochemical processes of the hemp plant, exploitable also in other relevant industrial sectors, such as the textile, cosmetic, nutraceutical, and pharmaceutical branches.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/separations9060136/s1>, Table S1: Sampling locations with altitude and extension of the hemp fields considered in this study, method of cultivation employed, varieties cultivated, and year of sampling. It should be noted that it was not possible to collect the whole hemp plant in each area, and the sampling period differed from Southern to Northern Italy, according to the stage of maturation of the crops. Sample pre-treatment procedure and decontamination process.

**Author Contributions:** M.C.: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing—Original Draft, Project administration; L.B.: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Data Curation, Writing—Original Draft, Writing—Review & Editing, Supervision; S.P.: Formal analysis, Writing—Original Draft, Writing—Review & Editing; L.C.: Validation, Formal analysis; F.C.: Resources, Writing—Review & Editing, Supervision; B.S.: Writing—Review and Editing, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors and it was carried out in the frame of an Industrial PhD in Environmental Sciences at the Ca' Foscari University of Venice with an agreement with Certottica S.c.r.l.—Italian Institute of Certification of Optical Products.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available within the article and in its Supplementary Material.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the Department of Agrifood, Environmental and Animal Sciences at the University of Udine (Mario Baldini and Fabio Zuliani), Soc. Coop. Molino Crisafulli a r.l. of Caltagirone (Giuseppe Sammartino), Azienda Agricola Anemós of Seren del Grappa (Andrea and Serena Turrin), and to all the other farmers for supplying the hemp samples. Finally, we thank Elga LabWater (Veolia Water VWS Ltd., High Wycombe, UK) for supplying the Purelab Ultra System used in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationship that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

1. Tang, K. Agronomy and Photosynthesis Physiology of Hemp (*Cannabis sativa* L.). Ph.D. Thesis, Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands, 2018. Available online: <https://research.wur.nl/en/publications/agronomy-and-photosynthesis-physiology-of-hemp-cannabis-sativa-l> (accessed on 18 October 2021).
2. Landi, S. Mineral nutrition of *Cannabis sativa* L. *J. Plant Nutr.* **1997**, *20*, 311–326. [[CrossRef](#)]
3. Amaducci, S.; Scordia, D.; Liu, F.H.; Zhang, Q.; Guo, H.; Testa, G.; Cosentino, S.L. Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *68*, 2–16. [[CrossRef](#)]
4. Ryz, N.R.; Remillard, D.J.; Russo, E.B. Cannabis Roots: A Traditional Therapy with Future Potential for Treating Inflammation and Pain. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2017**, *2*, 210–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Baldino, L.; Scognamiglio, M.; Reverchon, E. Supercritical fluid technologies applied to the extraction of compounds of industrial interest from *Cannabis sativa* L. and to their pharmaceutical formulations: A review. *J. Supercrit. Fluids* **2020**, *165*, 104960. [[CrossRef](#)]
6. Liu, Y.; Liu, H.-Y.; Li, S.-H.; Ma, W.; Wu, D.-T.; Li, H.-B.; Xiao, A.-P.; Liu, L.-L.; Zhu, F.; Gan, R.-Y. *Cannabis sativa* bioactive compounds and their extraction, separation, purification, and identification technologies: An updated review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *149*, 116554. [[CrossRef](#)]
7. Moreno, T.; Montanes, F.; Tallon, S.J.; Fenton, T.; King, J.W. Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options. *J. Supercrit. Fluids* **2020**, *161*, 104850. [[CrossRef](#)]
8. Qamar, S.; Torres, Y.J.M.; Parekh, H.S.; Falconer, J.R. Extraction of medicinal cannabinoids through supercritical carbon dioxide technologies: A review. *J. Chromatogr. B* **2021**, *1167*, 122581. [[CrossRef](#)]
9. Giupponi, L.; Leoni, V.; Carrer, M.; Cecilian, G.; Sala, S.; Panseri, S.; Pavlovic, R.; Giorgi, A. Overview on Italian hemp production chain, related productive and commercial activities and legislative framework. *Ital. J. Agron.* **2020**, *15*, 194–205. [[CrossRef](#)]
10. Baldini, M.; Zuliani, F.; Barbiani, G.; Cattivello, C. Coltivazione di varietà di canapa industriale nel medio Friuli: Nuove opportunità per una “vecchia” coltura. *Not. ERSA Reg. Agency Rural. Dev.* **2016**, *3*, 41–49. Available online: <http://www.ersa.fvg.it/ex-port/sites/ersa/aziende/in-formazione/notiziario/allegati/2016/3/COLTIVAZIONE-CANAPA.pdf> (accessed on 18 October 2021). (In Italian).
11. Cacchioni, D. Hemp and Industry in Italy: Between Pasts and Present. *AGER J. Depopulation Rural. Dev. Stud.* **2021**, *32*, 93–115. [[CrossRef](#)]
12. Law 242/2016. Disposizioni per la Promozione della Coltivazione e della Filiera Agroindustriale della Canapa. Law 2nd December 2016, n. 242; 2016. Available online: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/12/30/16G00258/sg> (accessed on 13 December 2021). (In Italian).
13. Coldiretti—Italian National Confederation of Direct Farmers. Via Libera alla Cannabis a Tavola, Campi Decuplicati. Available online: <https://www.coldiretti.it/economia/via-libera-alla-cannabis-tavola-campi-decuplicati> (accessed on 18 October 2021). (In Italian).
14. Crini, G.; Lichtfouse, E.; Chanut, G.; Morin-Crini, N. Applications of hemp in textiles, paper industry, insulation and building materials, horticulture, animal nutrition, food and beverages, nutraceuticals, cosmetics and hygiene, medicine, agrochemistry, energy production and environment: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18*, 1451–1476. [[CrossRef](#)]
15. Federcanapa—Italian Hemp Federation. Linee Guida per la Coltivazione Della Canapa da Estrazione. Available online: <https://www.federcanapa.it/coltivazione-canapa-industriale-estrazione> (accessed on 18 October 2021). (In Italian).
16. Federcanapa—Italian Hemp Federation. Linee Guida per il Seme di Canapa ad Uso Alimentare. Available online: <https://www.federcanapa.it/linee-guida-canapa-alimentare> (accessed on 18 October 2021). (In Italian).
17. Altieri, S.; Saiano, K.; Biondi, M.; Ricci, P.; Lubritto, C. Traceability of ‘Mozzarella di Bufala Campana’ production chain by means of carbon, nitrogen and oxygen stable isotope ratios. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 995–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bontempo, L.; Camin, F.; Perini, M.; Ziller, L.; Larcher, R. Isotopic and elemental characterisation of Italian white truffle: A first exploratory study. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *145*, 111627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wadood, S.A.; Boli, G.; Yimin, W. Geographical traceability of wheat and its products using multielement light stable isotopes coupled with chemometrics. *J. Mass Spectrom.* **2019**, *54*, 178–188. [[CrossRef](#)]
20. Portarena, S.; Gavrichkova, O.; Lauteri, M.; Brugnoli, E. Authentication and traceability of Italian extra-virgin olive oils by means of stable isotopes techniques. *Food Chem.* **2014**, *164*, 12–16. [[CrossRef](#)]
21. Booth, A.L.; Wooller, M.J.; Howe, T.; Haubenstock, N. Tracing geographic and temporal trafficking patterns for marijuana in Alaska using stable isotopes (C, N, O and H). *Forensic Sci. Int.* **2010**, *202*, 45–53. [[CrossRef](#)]

22. Hurley, J.M.; West, J.B.; Ehleringer, J.R. Tracing retail cannabis in the United States: Geographic origin and cultivation patterns. *Int. J. Drug Policy* **2010**, *21*, 222–228. [[CrossRef](#)]
23. Shibuya, E.K.; Sarkis, J.E.S.; Negrini-Neto, O.; Martinelli, L.A. Carbon and nitrogen stable isotopes as indicative of geographical origin of marijuana samples seized in the city of São Paulo (Brazil). *Forensic Sci. Int.* **2007**, *167*, 8–15. [[CrossRef](#)]
24. West, J.B.; Hurley, J.M.; Ehleringer, J.R. Stable Isotope Ratios of Marijuana. I. Carbon and Nitrogen Stable Isotopes Describe Growth Conditions. *J. Forensic Sci.* **2009**, *54*, 84–89. [[CrossRef](#)]
25. Brand, W.A.; Coplen, T.B. Stable isotope deltas: Tiny, yet robust signatures in nature. *Isot. Environ. Health Stud.* **2012**, *48*, 393–409. [[CrossRef](#)]
26. Bontempo, L.; van Leeuwen, K.A.; Paolini, M.; Laursen, K.H.; Micheloni, C.; Prenzler, P.D.; Ryan, D.; Camin, F. Bulk and compound-specific stable isotope ratio analysis for authenticity testing of organically grown tomatoes. *Food Chem.* **2020**, *318*, 126426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Carter, J.F.; Chesson, L.A. *Food Forensics. Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; ISBN 9780367782085.
28. Bateman, A.S.; Kelly, S.D. Fertilizer nitrogen isotope signature. *Isot. Environ. Health Stud.* **2007**, *43*, 237–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Inácio, C.T.; Chalk, P.M.; Magalhães, A.M.T. Principles and Limitations of Stable Isotopes in Differentiating Organic and Conventional Foodstuffs: 1. Plant Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 1206–1218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Paolini, M. Development and Implementation of Stable Isotope Ratio Analysis in Bulk Products and Sub-Components to Ensure Food Traceability. Ph.D. Thesis, University of Udine, Udine, Italy, 2017. Available online: <https://hdl.handle.net/10449/37884> (accessed on 18 October 2021).
31. Zazzo, A.; Monahan, F.J.; Moloney, A.P.; Green, S.; Schmidt, O. Sulphur isotopes in animal hair track distance to sea. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2371–2378. [[CrossRef](#)]
32. Zhou, X.; Wu, H.; Pan, J.; Chen, H.; Jin, B.; Yan, Z.; Xie, L.; Rogers, K.M. Geographical traceability of south-east Asian durian: A chemometric study using stable isotopes and elemental compositions. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *101*, 103940. [[CrossRef](#)]
33. Costantini, E.A.C.; L'Abate, G.; Barbetti, R.; Fantappiè, M.; Lorenzetti, R.; Magini, S. *Soil Map of Italy*; National Research Council and Minister of Agriculture Food and Forestry: Rome, Italy, 2012. Available online: <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/content/carta-dei-suoli-ditalia-soil-map-italy> (accessed on 18 October 2021).
34. Gat, J.R. Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **1996**, *24*, 225–262. [[CrossRef](#)]
35. Giustini, F.; Brillì, M.; Patera, A. Mapping oxygen stable isotopes of precipitation in Italy. *J. Hydrol. Reg. Stud.* **2016**, *8*, 162–181. [[CrossRef](#)]
36. Silveira Lobo Sternberg, L. Oxygen and Hydrogen Isotope Ratios in Plant Cellulose: Mechanisms and Applications. In *Stable Isotopes in Ecological Research*; Rundel, P.W., Ehleringer, J.R., Nagy, K.A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1989; pp. 124–141. [[CrossRef](#)]
37. Yakir, D.; DeNiro, M.J. Oxygen and Hydrogen Isotope Fractionation during Cellulose Metabolism in *Lemna gibba* L. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 325–332. [[CrossRef](#)]
38. Tarapoulouzi, M.; Skiada, V.; Agriopoulou, S.; Psomiadis, D.; Rébufa, C.; Roussos, S.; Theocharis, C.R.; Katsaris, P.; Varzakas, T. Chemometric Discrimination of the Geographical Origin of Three Greek Cultivars of Olive Oils by Stable Isotope Ratio Analysis. *Foods* **2021**, *10*, 336. [[CrossRef](#)]
39. Schmidt, H.-L.; Werner, R.A.; Eisenreich, W. Systematics of  $^2\text{H}$  patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. *Phytochem. Rev.* **2003**, *2*, 61–85. [[CrossRef](#)]
40. Cucinotta, L.; De Grazia, G.; Micalizzi, G.; Bontempo, L.; Camin, F.; Mondello, L.; Sciarrone, D. Simultaneous evaluation of the enantiomeric and carbon isotopic ratios of *Cannabis sativa* L. essential oils by multidimensional gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bontempo, L.; Camin, F.; Paolini, M.; Micheloni, C.; Laursen, K.H. Multi-isotopic signatures of organic and conventional Italian pasta along the production chain. *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51*, 675–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Georgi, M.; Voerkelius, S.; Rossmann, A.; Graßmann, J.; Schnitzler, W.H. Multielement Isotope Ratios of Vegetables from Integrated and Organic Production. *Plant Soil* **2005**, *275*, 93–100. [[CrossRef](#)]
43. Laursen, K.H.; Mihailova, A.; Kelly, S.D.; Epov, V.N.; Bérail, S.; Schjoerring, J.K.; Donard, O.F.X.; Larsen, E.H.; Pedentchouk, N.; Marca-Bell, A.D.; et al. Is it really organic?—Multi-isotopic analysis as a tool to discriminate between organic and conventional plants. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2812–2820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dawson, T.E.; Mambelli, S.; Plamboeck, A.H.; Templer, P.H.; Tu, K.P. Stable Isotopes in Plant Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **2002**, *33*, 507–559. [[CrossRef](#)]

## **Allegato 4**

*Short Communication - Separations - Special Issue "Advances in the Analysis of Food Constituents, Residues, and Contaminants"*

***“Isotopic characterization of Italian industrial hemp (*Cannabis sativa L.*) intended for food use: a first exploratory study”***



1 *Short Original Communication*

2 **Distribution pattern of Rare Earth Elements in four different industrial hemp**  
3 **cultivars (*Cannabis sativa* L.) grown in Friuli Venezia Giulia, Italy**

4  
5 Marco CALVI <sup>a,b,\*</sup>, Fabiana CORAMI <sup>a,c</sup>, Marta RADAELLI <sup>a</sup>, Sarah PIZZINI <sup>a</sup>, Barbara STENNI <sup>a</sup>

6  
7 <sup>a</sup> Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University of  
8 Venice, Via Torino, 155 - 30172 Venice Mestre (VE), Italy

9 <sup>b</sup> Certottica S.c.r.l. – Italian Institute of Certification of Optical Products, Villanova industrial area -  
10 32013 Longarone (BL), Italy

11 <sup>c</sup> Institute of Polar Sciences, National Research Council (CNR-ISP), Via Torino, 155 - 30172 Venice  
12 Mestre (VE), Italy

13

14 \*Corresponding author: Marco Calvi, [marco.calvi@unive.it](mailto:marco.calvi@unive.it).

15 Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University of  
16 Venice, Via Torino, 155 - 30172 Venice Mestre (VE), Italy. Phone number: +39 041 234 8637.

17

18 E-mail addresses: Fabiana Corami ([fabiana.corami@cnr.it](mailto:fabiana.corami@cnr.it)), Marta Radaelli  
19 ([marta.radaelli@unive.it](mailto:marta.radaelli@unive.it)), Sarah Pizzini ([sarah.pizzini@unive.it](mailto:sarah.pizzini@unive.it)), Barbara Stenni  
20 ([barbara.stenni@unive.it](mailto:barbara.stenni@unive.it)).

21

22 **Abstract**

23 This study aims to evaluate the qualitative and quantitative distribution patterns of Rare Earth  
24 Elements (REEs) in the Italian industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) intended for food use.  
25 Concentration of REEs was assessed in inflorescences and stems of four cultivars of industrial hemp  
26 (*i.e.* Fedora 17, Ferimon, Futura 75, and Zenit) grown in three different areas of Friuli Venezia Giulia  
27 region (NE Italy). The four varieties considered were cultivated under the conventional regime in two

28 sampling sites (Gemona del Friuli and Verzegnis) and under the organic regime in the third one  
29 (Campofornido). Findings from this preliminary study allowed us to acquire useful indications and  
30 provide new data about an emerging specialty crop still under-investigated, calling for further  
31 research to explore larger data set and evaluate the feasibility of using REEs as a powerful tool for  
32 food traceability studies.

### 33 **Keywords**

- 34 • Hemp
- 35 • *Cannabis sativa*
- 36 • Rare Earth Elements (REEs)
- 37 • Inflorescences
- 38 • Stems
- 39 • Distribution pattern
- 40 • Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS)

### 41 **1. Introduction**

42 *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753), commonly known as hemp, has a long history of cultivation and  
43 it is an emerging high-value specialty crop, resulting in its wide distribution and multiple uses. It is  
44 an annual and principally dioecious tall weed belonging to the family *Cannabaceae*. Central Asia  
45 offers the most plausible location for the primary origin and early evolution of hemp ([Clarke and](#)  
46 [Merlin, 2013](#)). This plant is cultivated or grows wild in significantly different geographical areas for  
47 climate and soil type and, for this reason, it is evolved into numerous varieties having wide  
48 morphological differences ([Landi, 1997](#)).

49 During the last decade, people and researchers have been rediscovering the high value of hemp for  
50 multiple purposes: stems, seeds, inflorescences, leaves, and resin glands have been exploited as food,  
51 fuel, textile fiber, for medical, therapeutic, and other uses ([Ryz et al., 2017](#)). Since it is recognized as

52 a highly sustainable crop, this plant has also been exploited for reducing environmental impacts and  
53 the loss of biodiversity, thus restoring the territory (Satriani *et al.*, 2021). It should be highlighted that  
54 Italy was the second world's largest hemp producer until the Second World War, with 80,000 -  
55 100,000 hectares cultivated (Baldini *et al.*, 2016). After years of cultivation ban and neglect, due to  
56 the progressive diffusion of synthetic fibers, the Italian Law 242/2016 has legalized the cultivation of  
57 industrial hemp again, so long as the plant is characterized by a low content (< 0.6%) of delta-9-  
58 Tetrahydrocannabinol (THC). Consequently, lots of Italian farmers have invested in *C. sativa*, trying  
59 to recover this historical crop, so much that its cultivation has increased by ten times over five years,  
60 from 400 hectares in 2013 to almost 4000 hectares in 2018, as reported by the Italian National  
61 Confederation of Direct Farmers (Coldiretti, 2020).

62 Literature studies on *C. sativa* rarely based their work on elemental plant composition using Trace  
63 and Rare Earth Elements (TEs and REEs), and most of them refers to hemp more as a drug than as a  
64 "strong resource" for our planet (Kuras and Wachowicz, 2011; Landi, 1997). There are few papers  
65 concerning the traceability and authentication of *C. sativa* (Hurley *et al.*, 2010), which usually employ  
66 stable isotopes like those of carbon and nitrogen (Shibuya *et al.*, 2006), or strontium ones (West *et*  
67 *al.*, 2009), to evaluate geographical origin of hemp. Even so, they dealt mainly with marijuana illicit  
68 traffic too, with the aim of studying the features of the hemp plant to track the origin of the drug  
69 plantations.

70 This study aims to filling this gap, evaluating the total concentration of REEs and their distribution  
71 patterns in inflorescences and stems of four different cultivars of *C. sativa* intended for food. Since  
72 no data on hemp uptake of REEs are available, we may assume that their behavior may be similar to  
73 that of TEs. *C. sativa* uptake of TEs depends on the geochemical characteristics of the soil and the  
74 nature of crops, and some of them showed a high potential to accumulate in different storage centers  
75 in plant vegetative and reproductive organs (Mihoc *et al.*, 2012), and in different cultivars (Craven *et*  
76 *al.*, 2019; Husain *et al.*, 2019). Although this preliminary study calls for further research to explore

77 larger data set, qualitative and quantitative distribution patterns of REEs could therefore prove to be  
78 possible diagnostic tools to trace geographical and varietal differences of the industrial hemp.

## 79 **2. Material and methods**

### 80 **2.1. Sampling and cultivation sites**

81 Hemp samples were hand-collected in 2018 in three different areas of Friuli Venezia Giulia region  
82 (NE Italy; [Fig. 1](#)). All the samples were stored in polyethylene bags and kept at -20°C to avoid any  
83 kind of mold and degradation processes. Sampling details as locations, farmers, method of  
84 cultivation (conventional or organic), and extension of hemp fields considered in this study are  
85 reported in [Table S1](#) in the Supplementary Information.

86 [Fig. 1](#) Map of sampling sites

87 Four different varieties of cultivated hemp (*i.e.* Fedora 17, Ferimon, Futura 75, and Zenit), which  
88 are listed within the admitted agricultural species by the European Commission in the [EU Plant  
89 variety database](#), were collected for each sampling site at the same stage of maturation. For each  
90 cultivar, 5-6 plants of hemp were pooled and then separated into stems and inflorescences, thus  
91 obtaining 12 stem and 12 inflorescence samples. It should be noted that in the inflorescence samples  
92 it was not possible to separate seeds from the inflorescence itself.

### 93 **2.2. Determination of Rare Earth Elements (REEs)**

94 After being freeze-dried, ground, and homogenized, weighed aliquots (average 0.1 g) of powdered  
95 samples were mineralized by microwave-induced wet acid digestion, according to [Ranaldo \*et al.\*  
96 \(2015\)](#). Briefly, aliquots were digested with nitric acid and hydrogen peroxide in  
97 tetrafluoromethoxyl “vent and release” vessels using an Ethos 1 Advanced Microwave Digesting  
98 Labstation (high-pressure and high-temperature rotor, Milestone S.r.l., Bergamo, Italy). Procedural  
99 blanks were digested in each mineralization batch. Digested samples and blanks were recovered,

100 diluted 1:10 (v/v) with ultrapure water, and stored at -20°C till the instrumental analysis. Detailed  
101 pre-treatment procedure and decontamination process are reported in the Supplementary  
102 Information.

103 The diluted aliquots were then analyzed by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-  
104 MS) with an iCAP™ RQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), equipped  
105 with an ASX-560 autosampler (Teledyne CETAC Technologies Ltd., Omaha, NE, USA). The  
106 quantification of REEs was performed by external calibration, while rhodium (Rh) was employed  
107 as internal standard to test for any matrix effect and check for interferences. Cerium (Ce),  
108 dysprosium (Dy), erbium (Er), europium (Eu), gadolinium (Gd), holmium (Ho), lanthanum (La),  
109 neodymium (Nd), praseodymium (Pr), samarium (Sm), scandium (Sc), terbium (Tb), ytterbium  
110 (Yb), and yttrium (Y) were analyzed.

111 The quality control of the analytical method was performed using five aliquots of Standard  
112 Reference Material (SRM) 1515: *Apple Leaves* (NIST – National Institute of Standards and  
113 Technology), digested as samples. The results for the reference elements were in a good agreement  
114 with the certified/information values, and the repeatability, expressed as relative standard deviation,  
115 ranged from 1.8% (Eu and Nd) to 6.7% (Sc), with a mean value of 2.8% (Table S2 in the  
116 Supplementary Information). The percentage yield was good (> 85%), therefore the analytical  
117 method employed may be considered robust and replicable. The limits of detection (LODs) ranged  
118 between 0.03 pg g<sup>-1</sup> (Sm) and 1.14 pg g<sup>-1</sup> (Sc), as reported in Table S3 in the Supplementary  
119 Information.

120 For the statistical analyses, data under the limits of quantification (LOQs) were substituted with the  
121 half of the LOD values defined for each element. Non-parametric statistical tests to evaluate  
122 significant differences among the hemp cultivars were performed. While the Kruskal-Wallis test by  
123 ranks ( $p < 0.05$ ) was employed for multiples comparisons, the Wilcoxon test ( $p < 0.05$ ) was  
124 performed for pairwise comparison.

### 125 3. Results and discussion

126 To eliminate the saw-tooth effect caused by the Oddo-Harkins rule, measured REE concentrations  
127 were normalized for each element according to the European Archean Shale (EAS; [Bau et al., 2018](#))  
128 except for Sc, which was normalized according to Post-Archean Australian Shale (PAAS; [Taylor and](#)  
129 [McLennan, 1985](#)). The shale-normalized concentrations of REEs are reported in [Table S4](#) in the  
130 Supplementary Information, while their normalized distributions are shown in [Fig. 2](#).

131 [Fig. 2](#) Shale-normalized concentrations (in  $\text{ng g}^{-1}$ ) of Rare Earth Elements in the pooled samples of  
132 hemp inflorescences (left side) and stems (right side) considered in this study

133 Samples are labeled as follow: provenance (C = Campoformido; G = Gemona del Friuli; V = Verzegnis),  
134 cultivar (Fd = Fedora 17; Fr = Ferimon; Fu = Futura 75; Ze = Zenit), and part of hemp plant (I =  
135 Inflorescence; S = Stem)

136 All the inflorescence samples showed higher  $\Sigma_{14}$  REE concentration (averagely 3.8 times higher),  
137 than that observed in the corresponding stem samples, with the only exception of the Zenit cultivar  
138 at Verzegnis, thus showing a marked tendency to REE accumulation by the hemp plant  
139 inflorescences. The highest overall values were observed in the inflorescences of the Zenit cultivar at  
140 Campoformido (grown under organic regime; sample CZeI:  $83.6 \text{ ng g}^{-1}$ ), followed by those of the  
141 Ferimon cultivar at Verzegnis (conventional regime; sample VFrI:  $72.3 \text{ ng g}^{-1}$ ). However, although  
142 the concentration in the corresponding stem samples at Campoformido was the lowest among those  
143 observed in stems (sample CZeS:  $3.57 \text{ ng g}^{-1}$ ), the  $\Sigma_{14}$  REE concentration in the stem sample of the  
144 Ferimon cultivar at Verzegnis showed the highest value detected in this study (sample VFrS:  $35.8 \text{ ng}$   
145  $\text{g}^{-1}$ ).

146 Considering the investigated hemp cultivars, the Ferimon one showed the highest uptake capacity in  
147 terms of  $\Sigma_{14}$  REEs in inflorescence and stem samples, feature that might be exploited for  
148 phytoremediation purposes, followed by the Zenit and Futura 75 ones, which exhibited a similar

149 behavior (Fig. S1 in the Supplementary Information). Conversely, Fedora 17 was always the cultivar  
150 showing the lowest detected values in all the three sampling sites considered. Focusing on the  
151 different cultivation sites, it is interesting that Campoformido, the only sampling site which adopt an  
152 organic regime, was the one that exhibited the highest values of  $\Sigma_{14}$  REE concentration, followed by  
153 Verzegnis and Gemona del Friuli (Fig. S2 in the Supplementary Information). This feature may be  
154 partly due to the high concentration of La detected at Campoformido, which represent one of the most  
155 abundant REEs determined in the inflorescence and stem samples of the Fedora 17 and Ferimon  
156 cultivars (Table S4 in the Supplementary Information), accounting for 9.7% and 9.0% of the total  
157 REE amount, respectively, as opposed to a mean of 4.2% at the other sampling sites.

158 Non-parametric statistical analysis showed that the concentration of REEs in the inflorescences and  
159 the stems of the different cultivars studied were different (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ) and the observed  
160 differences were statistically significant (Kruskal-Wallis test by ranks,  $p < 0.05$ ).

161 Fig. 3 Shale-normalized concentrations (in  $\text{ng g}^{-1}$ ; left axis) of Rare Earth Elements (REEs) in the  
162 pooled samples, grouped by Light (LREEs), Medium (MREEs), and Heavy (HREEs) REEs, of  
163 hemp inflorescences (left side) and stems (right side) considered in this study. Cerium ( $\partial\text{Ce}$ ) and  
164 europium ( $\partial\text{Eu}$ ) anomalies (right axis) are also reported

165 Samples are labeled as follow: provenance (C = Campoformido; G = Gemona del Friuli; V = Verzegnis),  
166 cultivar (Fd = Fedora 17; Fr = Ferimon; Fu = Futura 75; Ze = Zenit), and part of hemp plant (I =  
167 Inflorescence; S = Stem)

168 Subdividing the analytes into Light (LREEs; Ce, La, Nd, Pr, and Sm), Medium (MREEs; Dy, Eu, Gd,  
169 Tb, and Y), and Heavy (HREEs; Er, Ho, Sc, and Yb) REEs, the distribution pattern reported in Fig.  
170 3 highlighted a predominance of MREEs in all the inflorescence samples, except for the Ferimon  
171 cultivar at Campoformido, followed by a general prevalence of LREEs rather than HREEs (Fig. S3  
172 in the Supplementary Information). The same trend was showed by the stem samples, with the only  
173 exception of the Fedora 17 cultivar at Campoformido, and for both the matrices this distribution was

174 largely driven by the high concentration of Tb, which was the most abundant REEs in 62.5% of the  
175 samples, accounting averagely for 10% of the total REE concentration in both inflorescence and stem  
176 samples. Because of its rarity, Tb has a poor commercial diffusion and is mainly used in  
177 semiconductor technology and in laser and solid-state devices (Baron, 2020). It has no known  
178 biological role and does not appear to pose an environmental threat to plants or animals, although its  
179 toxicity has not yet been investigated in depth. However, most of REEs are increasingly used in the  
180 technology and chemical industries and also exploited as micro fertilizers for plants and feed additives  
181 (Mihajlovic and Rinklebe, 2018; Tommasi *et al.*, 2020). Even though they may therefore be  
182 considered on a par with emerging pollutants, no limits have been set for REEs in foodstuff and plants  
183 so far.

184 Besides Tb, Ho (belonging to HREEs), Eu, and Gd (both belonging to MREEs), were among the most  
185 abundant REEs, each of them accounting averagely for 9% of the total concentration. Ho is commonly  
186 used in nuclear technology and electronics, while Gd found application in high-tech industry (Baron,  
187 2020), and recently was identified as an emerging microcontaminant in water bodies due to the high  
188 doses of paramagnetic Gd<sup>3+</sup> chelates administered as contrast agent in magnetic resonance imaging  
189 exams (Ebrahimi and Barbieri, 2019). Whereas the presence of Ho and Gd may be ascribed to  
190 anthropogenic emissions, and they could therefore be considered as markers of environmental  
191 pollution, as already observed for Sc (Jerez *et al.*, 2014; Vukojević *et al.*, 2019), Eu plays an essential  
192 role in plant development by promoting calcium (Ca) transportation across the plasma membrane  
193 (Zeng *et al.*, 2003). However, to date, there are still few data on the beneficial or toxic effects of Eu  
194 on plants (Shtangeeva, 2014).

195 The anomalies of redox-sensitive REEs ( $\partial Ce$  and  $\partial Eu$ ) were quantified according to Loader *et al.*  
196 (2017):

197 
$$\partial Ce = \frac{Ce_N}{\frac{Nd_N^2}{Sm_N}}$$

198 and McLennan (1989):

199

$$\partial Eu = \frac{Eu_N}{\sqrt{Gd_N \cdot Sm_N}}$$

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

where the subscript “N” indicates the shale-normalized concentration. Significant deviations from the typical smooth trend have been identified for both elements (Fig. 3), more pronounced in the inflorescence samples rather than in stem ones. A weakly positive Eu anomaly ( $\partial Eu > 1$ ) was highlighted by almost all the samples, except for the inflorescences of the Futura 75 cultivar at Gemona del Friuli. This general enrichment in Eu ( $\partial Eu = 1.15 \pm 0.12$ ) is probably due to an increased uptake of the element relative to other REEs, linked to the reduction of the  $Eu^{3+}$  ion to the more mobile and bioavailable  $Eu^{2+}$  under anoxic conditions (Weltje *et al.*, 2002). Nevertheless, the anomalies detected appeared to be less pronounced of those reported for other kinds of vascular plants (Chiarenzelli *et al.*, 2001; MacMillan *et al.*, 2017), for which strong  $\partial Eu$  values have been associated to the similarity between  $Ca^{2+}$  and  $Eu^{3+}$  ions in aqueous phase, able to generate an Eu/Ca substitution during plant physiological processes that could enhance the preferential transport of Eu compared to others REEs in the aerial parts of the plants (Censi *et al.*, 2017). The scattered distribution of  $\partial Eu$  does not seem highlight a preferential Eu enrichment linked to a specific sampling site or hemp cultivar. This also applies to Ce, which is not an essential element for plants, but can stimulate their growth and other physiological processes (Ramírez-Olvera *et al.*, 2018 and references therein). No strong anomalies were detected for Ce in the hemp samples, except for the inflorescences of the Fedora 17 cultivar at Gemona del Friuli (sample GFdI), which presented a  $\partial Ce$  negative value of 0.68. A general prevalence of weakly negative  $\partial Ce$  was highlighted by the inflorescence samples ( $\partial Ce = 0.96 \pm 0.10$ ), whereas stem samples exhibited weakly positive anomalies ( $\partial Ce = 1.06 \pm 0.08$ ), slightly accentuated in the stems collected at Gemona del Friuli.

Nevertheless, it should be underlined that alongside inflorescences and stems, other plant tissues, such as the root system, may act as storage centers for REEs, as it also seems to suggest the marked mismatch among the REE values detected in this study and those detected in the agricultural soils of the Friuli Venezia Giulia region (Sadeghi *et al.*, 2013).

224 **Conclusions**

225 This study allowed us to acquire new data and indications about an emerging specialty crop still  
226 under-investigated, but of growing commercial interest, assessing the occurrence of REEs in the  
227 Italian industrial hemp intended for food use.

228 Further investigations are required to extend this preliminary study, aimed at deepening the  
229 understanding of the REE distribution patterns in hemp, considering larger data set and other plant  
230 storage tissues, with the ultimate purpose to evaluate the feasibility of using REEs as a powerful tool  
231 for geographical and varietal traceability studies, thus dealing with possible counterfeiting and  
232 enhancing the product value.

233 **Acknowledgments**

234 The authors are grateful to the Department of Agrifood, Environmental and Animal Sciences at the  
235 University of Udine (Mario Baldini and Fabio Zuliani) for supplying the hemp samples and thank  
236 Elga LabWater (Veolia Water VWS Ltd., High Wycombe, UK) for supplying the Purelab Ultra  
237 System used in this study.

238 **Statements and declarations**

239 **Ethical approval**

240 Not applicable.

241 **Consent to participate**

242 Not applicable.

243 **Consent to publish**

244 Not applicable.

245 **Funding**

246 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial,  
247 or not-for-profit sectors, and it has been carried out in the frame of an Industrial PhD in  
248 Environmental Sciences at the Ca' Foscari University of Venice with an agreement with Certottica  
249 S.c.r.l. – Italian Institute of Certification of Optical Products.

#### 250 **Competing interests**

251 The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

#### 252 **Availability of data and materials**

253 All data generated or analyzed during this study are included in this article and its Supplementary  
254 Information file.

#### 255 **Authors' contributions**

256 **Marco Calvi**: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data  
257 Curation, Writing - Original Draft, Project administration; **Fabiana Corami**: Conceptualization,  
258 Validation, Formal analysis, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing,  
259 Visualization, Supervision; **Marta Radaelli**: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Data  
260 Curation, Writing - Review & Editing; **Sarah Pizzini**: Resources, Data Curation, Writing - Original  
261 Draft, Writing - Review & Editing; **Barbara Stenni**: Writing - Review & Editing, Supervision,  
262 Project administration.

#### 263 **References**

264 Baldini M., Zuliani F., Barbiani G., Cattivello C. (2016). Coltivazione di varietà di canapa industriale  
265 nel medio Friuli: nuove opportunità per una “vecchia” coltura. *Notiziario ERSA – Regional agency*  
266 *for rural development*, 3: 41-49. [http://www.ersa.fvg.it/export/sites/ersa/aziende/in-](http://www.ersa.fvg.it/export/sites/ersa/aziende/informazione/notiziario/allegati/2016/3/COLTIVAZIONE-CANAPA.pdf)  
267 [formazione/notiziario/allegati/2016/3/COLTIVAZIONE-CANAPA.pdf](http://www.ersa.fvg.it/export/sites/ersa/aziende/informazione/notiziario/allegati/2016/3/COLTIVAZIONE-CANAPA.pdf) (in Italian).

268 Baron R. (2020). Determination of rare earth elements in power plant wastes. *Mining Machines*, 4:  
269 24-30. <https://doi.org/10.32056/KOMAG2020.4.3>.

270 Bau M., Schmidt K., Pack A., Bendel V., Kraemer D. (2018). The European Shale: An improved data  
271 set for normalisation of rare earth element and yttrium concentrations in environmental and  
272 biological samples from Europe. *Applied Geochemistry*, 90: 142-149.  
273 <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.01.008>.

274 Censi P., Cibella F., Falcone E.E., Cuttitta G., Saiano F., Inguaggiato C., Latteo V. (2017). Rare earths  
275 and trace elements contents in leaves: A new indicator of the composition of atmospheric dust.  
276 *Chemosphere*, 169: 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.085>.

277 Chiarenzelli J., Aspler L., Dunn C., Cousens B., Ozarko D., Powis K. (2001). Multi-element and rare  
278 earth element composition of lichens, mosses, and vascular plants from the Central Barrenlands,  
279 Nunavut, Canada. *Applied Geochemistry*, 16(2): 245-270. [https://doi.org/10.1016/S0883-](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00027-5)  
280 [2927\(00\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00027-5).

281 Clarke R.C., Merlin M.D. (2013). *Cannabis. Evolution and Ethnobotany*. Berkeley, CA, USA:  
282 University of California Press. ISBN: 9780520270480.

283 Coldiretti – Italian National Confederation of Direct Farmers (2020). Via libera alla cannabis a tavola,  
284 campi decuplicati. [https://www.coldiretti.it/economia/via-libera-alla-cannabis-tavola-campi-](https://www.coldiretti.it/economia/via-libera-alla-cannabis-tavola-campi-decuplicati)  
285 [decuplicati](https://www.coldiretti.it/economia/via-libera-alla-cannabis-tavola-campi-decuplicati). Accessed July 2020 (in Italian).

286 Craven C.B., Wawryk N., Jiang P., Zhongshan L., Li X-F. (2019). Pesticides and trace elements in  
287 cannabis: Analytical and environmental challenges and opportunities. *Journal of Environmental*  
288 *Sciences*, 85: 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.04.028>.

289 Ebrahimi P., Barbieri M. (2019). Gadolinium as an Emerging Microcontaminant in Water Resources:  
290 Threats and Opportunities. *Geosciences*, 9: 93. <https://doi.org/10.3390/geosciences9020093>.

291 EU Plant variety database. [https://ec.europa.eu/food/plant/plant\\_propagation\\_material/plant\\_variety\\_catalogues\\_databases/search/public/index.cfm](https://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm). Accessed July 2020.

292

293 Hurley J.M., West J.B., Ehleringer J.R. (2010). Stable isotope models to predict geographic origin  
294 and cultivation conditions of marijuana. *Science & Justice*, 50: 86-93.  
295 <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2009.11.003>.

296 Husain, R., Weeden H., Bogush D., Deguchi M., Soliman M., Potlakayala S., Katam R., Goldman S.,  
297 Rudrabhatla S. (2019). Enhanced tolerance of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) plants on  
298 abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids. *PLoS ONE*, 14(8): e0221570.  
299 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221570>.

300 Jerez J., Isaguirre A.C., Bazán C., Martinez L.D., Cerutti S. (2014). Determination of scandium in  
301 acid mine drainage by ICP-OES with flow injection on-line preconcentration using oxidized  
302 multiwalled carbon nanotubes. *Talanta*, 124: 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.028>.

303 Kuras M.J., Wachowicz M.J. (2011). Cannabis profiling based on its elemental composition – Is it  
304 possible? *Journal of Forensic Sciences*, 56: 1250-1255. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01772.x>.

305

306 Landi S. (1997). Mineral nutrition of *Cannabis sativa* L. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 311-326.  
307 <https://doi.org/10.1080/01904169709365252>.

308 Law 242/2016. *Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della*  
309 *canapa*. Law 2nd December 2016, n. 242 (in Italian).

310 Loader M.A., Wilkinson J.J., Armstrong R.N. (2017). The effect of titanite crystallisation on Eu and  
311 Ce anomalies in zircon and its implications for the assessment of porphyry Cu deposit fertility.  
312 *Earth and Planetary Science Letters*, 472: 107-119. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2017.05.010>.

313 MacMillan G.A., Chételat J., Heath J.P., Mickpegak R., Amyot M. (2017). Rare earth elements in  
314 freshwater, marine, and terrestrial ecosystems in the eastern Canadian Arctic. *Environmental*  
315 *Science: Processes & Impacts*, 19: 1336-1345. <https://doi.org/10.1039/c7em00082k>.

316 McLennan S.M. (1989). Rare earth elements in sedimentary rocks: influence of provenance and  
317 sedimentary processes. In B.R. Lipin, & G.A. McKay (Eds.), *Geochemistry and Mineralogy of the*  
318 *Rare Earth Elements, Vol. 21*. (pp. 169-200). Chantilly, VA, USA: Mineralogical Society of  
319 America. ISBN: 9780939950256.

320 Mihajlovic J., Rinklebe J. (2018). Rare earth elements in German soils – A review. *Chemosphere*,  
321 205: 514-523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.059>.

322 Mihoc M., Pop G., Alexa E., Radulov I. (2012). Nutritive quality of Romanian hemp varieties  
323 (*Cannabis sativa* L.) with special focus on oil and metal contents of seeds. *Chemistry Central*  
324 *Journal*, 6: 122. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-122>.

325 Ramírez-Olvera S.M., Trejo-Téllez L.I., García-Morales S., Pérez-Sato J.A., Gómez-Merino F.C.  
326 (2018). Cerium enhances germination and shoot growth, and alters mineral nutrient concentration  
327 in rice. *PLoS ONE*, 13(3): e0194691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194691>.

328 Ranaldo M., Toscano G., Radaelli M., Scalabrin E., Capodaglio G. (2015). *Nicotiana langsdorffii*  
329 wild type and genetically modified exposed to chemical and physical stress: changes in element  
330 content. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95: 349-365.  
331 <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1016013>.

332 Ryz N.R., Remillard D.J., Russo E.B. (2017). Cannabis Roots: A Traditional Therapy With Future  
333 Potential for Treating Inflammation and Pain. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1): 210-  
334 216. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0028>.

335 Sadeghi M., Petrosino P., Ladenberger A., Albanese S., Andersson M., Morris G., Lima A., De Vivo  
336 B., The GEMAS Project Team (2013). Ce, La and Y concentrations in agricultural and grazing-

337 land soils of Europe. *Journal of Geochemical Exploration*, 133: 202-213.  
338 <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.12.007>.

339 Satriani A., Loperte A., Pascucci S. (2021). The Cultivation of Industrial Hemp as Alternative Crop  
340 in a Less-Favoured Agricultural Area in Southern Italy: The Pignola Case Study. *Pollutants*, 1:  
341 169-180. <https://doi.org/10.3390/pollutants1030014>.

342 Shibuya E.K., Souza Sarkis J.E., Negrini Neto O., Moreira M.Z., Victoria R.L. (2006). Sourcing  
343 Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. *Forensic Science International*,  
344 160: 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.08.011>.

345 Shtangeeva I. (2014). Europium and Cerium Accumulation in Wheat and Rye Seedlings. *Water, Air,*  
346 *& Soil Pollution*, 225: 1964. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-1964-3>.

347 Taylor S.R., McLennan S.M. (1985). *The continental crust: Its composition and evolution*. Oxford,  
348 UK: Blackwell Scientific Publications. ISBN: 9780632011483.

349 Tommasi F., Thomas P.J., Pagano G., Perono G.A., Oral R., Lyons D.M., Toscanesi M., Trifuoggi  
350 M. (2020). Review of Rare Earth Elements as Fertilizers and Feed Additives: A Knowledge Gap  
351 Analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.  
352 <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00773-4>.

353 Vukojević V., Đurđić S., Stefanović V., Trifković J., Čakmak D., Perović V., Mutić J. (2019).  
354 Scandium, yttrium, and lanthanide contents in soil from Serbia and their accumulation in the  
355 mushroom *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer. *Environmental Science and Pollution Research*,  
356 26: 5422-5434. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3982-y>.

357 Weltje L., Heidenreich H., Zhu W., Wolterbeek H.T., Korhammer S., de Goeij J.J.M., Markert B.  
358 (2002). Lanthanide concentrations in freshwater plants and molluscs, related to those in surface  
359 water, pore water and sediment. A case study in The Netherlands. *Science of the Total*  
360 *Environment*, 286: 191-214. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(01\)00978-0](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(01)00978-0).

- 361 West J.B., Hurley J.M., Dudás F.Ö., Ehleringer J.R. (2009). The Stable Isotope Ratios of Marijuana.  
362 II. Strontium Isotopes Relate to Geographic Origin. *Journal of Forensic Sciences*, 54: 1261-1269.  
363 <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01171.x>.
- 364 Zeng F., Tian H.E., Wang Z., An Y., Gao F., Zhang L., Li F., Shan L. (2003). Effect of Rare Earth  
365 Element Europium on Amaranthin Synthesis in *Amaranthus caudatus* Seedlings. *Biological Trace*  
366 *Element Research*, 93: 271-282. <https://doi.org/10.1385/BTER:93:1-3:271>.

**Distribution pattern of Rare Earth Elements in four different industrial hemp cultivars (*Cannabis sativa* L.) grown in Friuli Venezia Giulia, Italy**

Marco CALVI <sup>a,b,\*</sup>, Fabiana CORAMI <sup>a,c</sup>, Marta RADAELLI <sup>a</sup>, Sarah PIZZINI <sup>a</sup>, Barbara STENNI <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University of Venice, Via Torino, 155 - 30172 Venice Mestre (VE), Italy

<sup>b</sup> Certottica S.c.r.l. – Italian Institute of Certification of Optical Products, Villanova industrial area - 32013 Longarone (BL), Italy

<sup>c</sup> Institute of Polar Sciences, National Research Council (CNR-ISP), Via Torino, 155 - 30172 Venice Mestre (VE), Italy

\*Corresponding author: Marco Calvi, [marco.calvi@unive.it](mailto:marco.calvi@unive.it).

Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University of Venice, Via Torino, 155 - 30172 Venice Mestre (VE), Italy. Phone number: +39 041 234 8637.

E-mail addresses: Fabiana Corami ([fabiana.corami@cnr.it](mailto:fabiana.corami@cnr.it)), Marta Radaelli ([marta.radaelli@unive.it](mailto:marta.radaelli@unive.it)), Sarah Pizzini ([sarah.pizzini@unive.it](mailto:sarah.pizzini@unive.it)), Barbara Stenni ([barbara.stenni@unive.it](mailto:barbara.stenni@unive.it)).

**Table S1.** Sampling locations, farmers, method of cultivation, and extension of hemp fields considered in this study.

<i>Region</i>	<i>Location</i>	<i>Farmer</i>	<i>Cultivation method</i>	<i>Hectares</i>
<i>Friuli Venezia Giulia</i>	Campoformido (UD)	Bio Fattoria Bianco agricultural partnership	Organic	0.12
	Gemona del Friuli (UD)	Rino Gubiani agricultural company	Conventional	0.08
	Verzegnis (UD)	Regional forest nursery	Conventional	0.20

## Sample preparation and mineralization

After being freeze-dried at  $-40^{\circ}\text{C}$  and 0.5 mbar for 48 hours with a Modulyo<sup>®</sup> Freeze-Dryer (Edwards Ltd., Crawley, UK), the pooled samples were homogenized and ground by a mixer mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany), equipped with two polytetrafluoroethylene jars and grinder spheres. The grinder was used with an oscillation frequency of  $28\text{ s}^{-1}$  with grinding times varying according to the firmness of the different matrices: 15 min for stem samples and 10 min for inflorescence samples.

At the beginning and after every single process of grinding, jars and spheres were cleaned carefully with ultrapure water ( $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$  resistivity at  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  Total Organic Carbon, produced using a Purelab Ultra System, Elga LabWater - Veolia Water VWS Ltd., High Wycombe, UK) and a 2% solution (v/v) of hydrochloric acid (Ultra purity Acids-UpA<sup>™</sup>, Romil Ltd., Cambridge, UK), then rinsed with ultrapure water and left under laminar flow hood overnight. Hemp powders were finally stored in 50 mL polypropylene tubes at room temperature.

Aliquots of about 0.1 g of powdered sample were weighed and mineralized by acid digestion with 7 mL of UpA<sup>™</sup> nitric acid and 3 mL of UpA<sup>™</sup> hydrogen peroxide at 1500 W. The temperature program consisted of a ramp from room temperature to  $100^{\circ}\text{C}$  in 10 min (with a holding time of 5 min), followed by a time sequence of 5 min/step, which allowed the maintenance and increase ( $\Delta t\ 20^{\circ}\text{C}$ ) of the temperature to  $180^{\circ}\text{C}$ , after which this temperature was maintained for 10 min.

**Table S2.** Mean, Standard Deviation (SD), and Relative Standard Deviation (RSD) values obtained from five replicate analyses of Standard Reference Material (SRM) 1515: *Apple Leaves* (NIST – National Institute of Standards and Technology).

<b>Element</b>	<b>Reference concentrations (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) in SRM 1515</b>	<b>Calculated concentrations in SRM 1515</b>		
		<b>Mean (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>RSD%</b>
<b>Ce</b>	3	3.23	0.06	1.9%
<b>Eu</b>	0.2	0.272	0.005	1.8%
<b>Gd</b>	3	3.3	0.1	3.0%
<b>La</b>	20	21.1	0.4	1.9%
<b>Nd</b>	17	17.1	0.3	1.8%
<b>Sm</b>	3	3.01	0.06	2.0%
<b>Sc</b>	0.03	0.030	0.002	6.7%
<b>Tb</b>	0.4	0.392	0.009	2.3%
<b>Yb</b>	0.3	0.26	0.01	3.8%

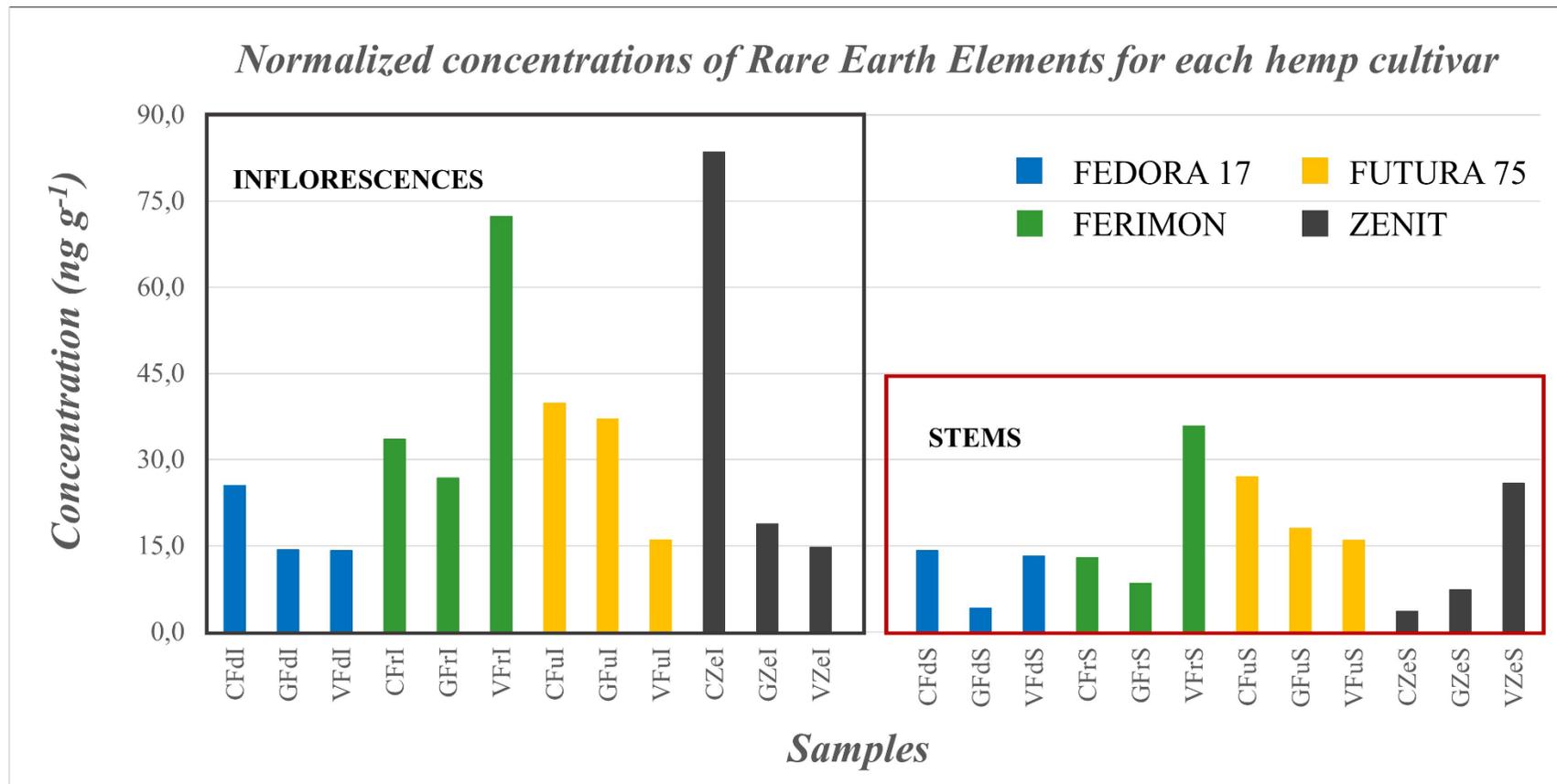
**Table S3.** Limits of detection (LODs) of single Rare Earth Elements (REEs) analyzed in this study.

<i>REEs</i>	<i>LODs (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</i>
<i>Ce</i>	0.15
<i>Dy</i>	0.16
<i>Er</i>	0.04
<i>Eu</i>	0.14
<i>Gd</i>	0.10
<i>Ho</i>	0.21
<i>La</i>	0.74
<i>Nd</i>	0.35
<i>Pr</i>	0.14
<i>Sm</i>	0.03
<i>Sc</i>	1.14
<i>Tb</i>	0.17
<i>Yb</i>	0.11
<i>Y</i>	0.21

**Table S4.** Concentrations (in ng g<sup>-1</sup>) of Rare Earth Elements (REEs), normalized according to the European Archean Shale (EAS) except for Sc, normalized according to the Post-Archean Australian Shale (PAAS), expressed both as single element and total, in the pooled samples of hemp considered in this study. LOD: Limit of detection.

<i>Samples*</i>	<i>Ce</i>	<i>Dy</i>	<i>Er</i>	<i>Eu</i>	<i>Gd</i>	<i>Ho</i>	<i>La</i>	<i>Nd</i>	<i>Pr</i>	<i>Sm</i>	<i>Sc</i>	<i>Tb</i>	<i>Yb</i>	<i>Y</i>	$\Sigma_{14}$ <i>REEs</i>
<i>CFdl</i>	1.54	1.69	1.41	2.19	2.00	1.99	2.46	1.67	1.62	1.73	2.18	2.38	1.11	1.50	25.5
<i>CFrl</i>	2.22	2.13	1.74	3.02	2.77	2.39	2.98	2.47	2.43	2.74	2.49	3.00	1.38	1.77	33.5
<i>CFul</i>	1.72	2.68	2.61	3.60	2.89	5.19	1.78	1.98	2.02	2.52	2.65	5.81	2.28	2.09	39.8
<i>CZel</i>	4.38	6.18	5.25	7.48	7.31	7.31	4.27	5.59	5.35	6.50	4.90	8.54	4.46	6.02	83.6
<i>GFdl</i>	0.68	1.18	1.08	1.21	1.18	1.47	0.47	0.96	0.78	0.92	1.13	1.49	0.86	0.91	14.3
<i>GFrl</i>	1.42	2.01	1.51	2.37	2.55	2.26	1.21	1.79	1.65	2.13	2.23	2.93	1.22	1.50	26.8
<i>GFul</i>	1.16	3.59	4.22	1.99	2.52	5.19	0.90	1.40	1.28	1.70	1.59	3.78	3.88	3.89	37.1
<i>GZel</i>	1.10	1.26	1.08	2.19	1.57	1.50	0.93	1.26	1.24	1.40	1.45	1.79	0.85	1.22	18.8
<i>VFdl</i>	0.94	0.93	0.79	1.46	1.19	1.10	0.53	1.04	1.04	1.15	1.37	1.37	0.63	0.62	14.2
<i>VFrI</i>	4.24	5.04	4.36	6.13	6.08	5.89	4.62	4.93	4.72	5.55	5.84	6.76	3.65	4.48	72.3
<i>VFul</i>	1.05	1.09	0.91	1.45	1.31	1.26	0.98	1.13	1.13	1.28	1.31	1.57	0.82	0.73	16.0
<i>VZel</i>	0.90	0.95	0.86	1.43	1.24	1.22	0.73	1.09	1.00	1.28	1.26	1.43	0.69	0.66	14.7
<i>CFdS</i>	0.90	0.92	0.79	1.35	1.20	1.10	1.37	1.01	0.95	1.15	0.79	1.26	0.63	0.70	14.1
<i>CFrS</i>	0.76	0.87	0.73	1.28	1.02	1.03	1.22	0.85	0.81	0.90	0.99	1.25	0.58	0.67	13.0
<i>CFuS</i>	1.48	1.98	1.71	2.26	2.27	2.30	1.79	1.72	1.65	2.05	1.84	2.75	1.44	1.75	27.0
<i>CZeS</i>	0.36	0.22	0.20	0.37	0.32	0.30	< LOD	0.34	0.35	0.32	0.27	0.37	0.14	< LOD	3.57
<i>GFdS</i>	0.22	0.31	0.28	0.47	0.39	0.41	0.14	0.26	0.25	0.34	0.42	0.47	0.23	0.02	4.19
<i>GFrS</i>	0.54	0.59	0.50	0.77	0.69	0.74	0.26	0.56	0.55	0.67	0.93	0.88	0.45	0.33	8.47
<i>GFuS</i>	1.16	1.18	1.00	1.64	1.70	1.38	0.94	1.32	1.28	1.53	1.39	1.76	0.84	0.88	18.0
<i>GZeS</i>	0.34	0.64	0.57	0.63	0.59	0.78	0.26	0.37	0.36	0.50	0.57	0.91	0.46	0.38	7.36
<i>VFdS</i>	0.68	1.17	1.10	1.17	1.16	1.51	0.19	0.72	0.72	0.84	0.71	1.54	0.88	0.82	13.2
<i>VFrS</i>	2.17	2.68	2.29	3.08	3.05	3.18	1.59	2.42	2.33	2.74	2.52	3.63	1.93	2.19	35.8
<i>VFuS</i>	1.11	1.05	0.88	1.54	1.39	1.28	0.62	1.22	1.23	1.44	1.15	1.64	0.76	0.65	15.9
<i>VZeS</i>	1.38	1.97	1.68	2.20	2.16	2.30	1.39	1.58	1.53	2.05	2.13	2.62	1.40	1.48	25.9

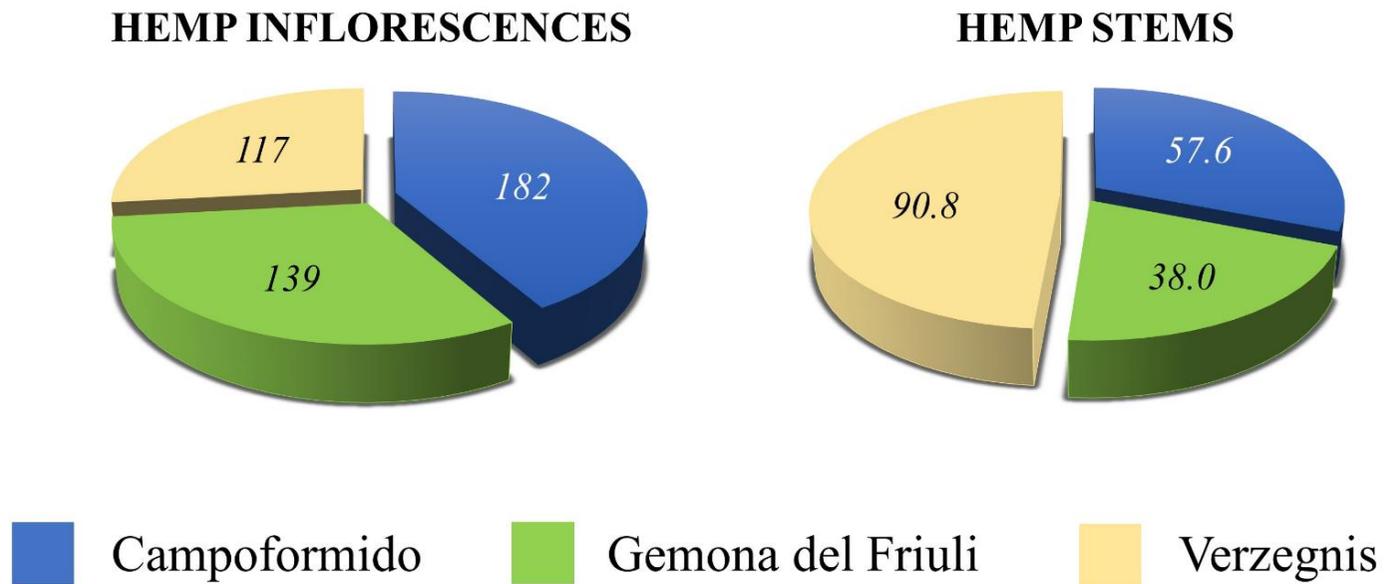
\*Samples are labeled as follow: provenance (C = Campoformido; G = Gemona del Friuli; V = Verzegnis), cultivar (Fd = Fedora 17; Fr = Ferimon; Fu = Futura 75; Ze = Zenit), and part of hemp plant (I = Inflorescence; S = Stem).



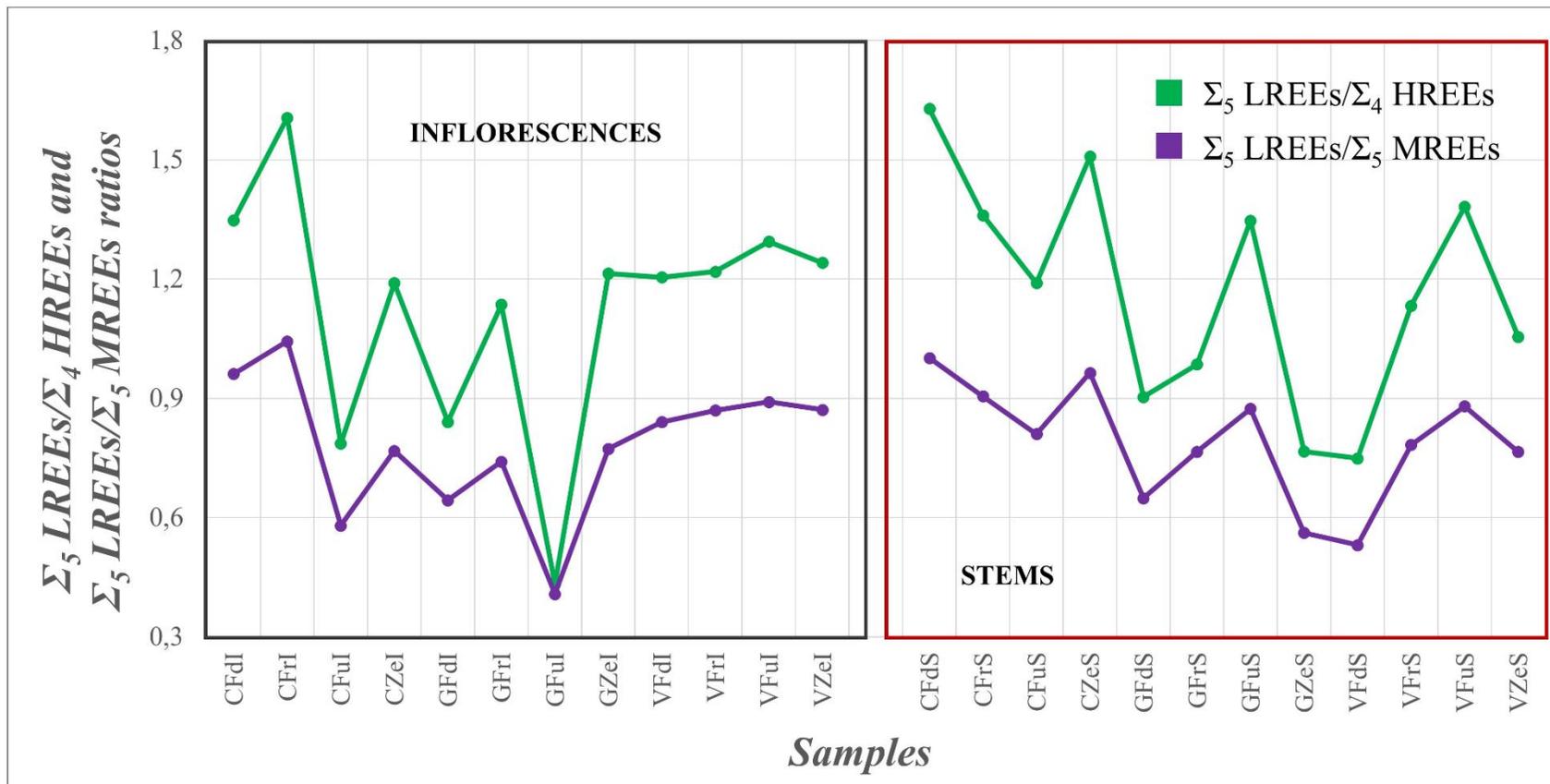
**Fig. S1.** Normalized concentrations (in ng g<sup>-1</sup>) of Rare Earth Elements in the pooled samples, grouped by cultivar, of hemp inflorescences (left side) and stems (right side) considered in this study.

Samples are labeled as follow: provenance (C = Campoformido; G = Gemona del Friuli; V = Verzegnis), cultivar (Fd = Fedora 17; Fr = Ferimon; Fu = Futura 75; Ze = Zenit), and part of hemp plant (I = Inflorescence; S = Stem).

*Normalized concentrations (ng g<sup>-1</sup>) of Rare Earth Elements for each cultivation site*



**Fig. S2.** Normalized concentrations (in ng g<sup>-1</sup>) of Rare Earth Elements in the pooled samples, grouped by cultivation site, of hemp inflorescences (left side) and stems (right side) considered in this study.



**Fig. S3.** Light Rare Earth Elements (LREEs) to Heavy Rare Earth Elements (HREEs) ratio (green line) and LREEs to Medium Rare Earth Elements (MREEs) ratio (purple line) in the pooled samples of hemp inflorescences (left side) and stems (right side) considered in this study.

Samples are labeled as follow: provenance (C = Campofornido; G = Gemona del Friuli; V = Verzegnis), cultivar (Fd = Fedora 17; Fr = Ferimon; Fu = Futura 75; Ze = Zenit), and part of hemp plant (I = Inflorescence; S = Stem).



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

**DEPOSITO ELETTRONICO DELLA TESI DI DOTTORATO**

**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DELL'ATTO DI NOTORIETA'**

(Art. 47 D.P.R. 445 del 28/12/2000 e relative modifiche)

Io sottoscritto .....

nat ... a ..... (prov. .... ) il .....

residente a ..... in ..... n. ....

Matricola (se posseduta) ..... Autore della tesi di dottorato dal titolo:

.....  
.....  
.....

Dottorato di ricerca in .....

(in cotutela con .....) )

Ciclo .....

Anno di conseguimento del titolo .....

**DICHIARO**

di essere a conoscenza:

- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decado fin dall'inizio e senza necessità di nessuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni;
- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere, per via telematica, al deposito di legge delle tesi di dottorato presso le Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e di Firenze al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi;
- 3) che l'Università si riserva i diritti di riproduzione per scopi didattici, con citazione della fonte;
- 4) del fatto che il testo integrale della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione viene archiviato e reso consultabile via Internet attraverso l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto dell'Università Ca' Foscari, oltre che attraverso i cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze;
- 5) del fatto che, ai sensi e per gli effetti di cui al D.Lgs. n. 196/2003, i dati personali raccolti saranno trattati, anche con strumenti informatici, esclusivamente nell'ambito del procedimento per il quale la presentazione viene resa;
- 6) del fatto che la copia della tesi in formato elettronico depositato nell'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto è del tutto corrispondente alla tesi in formato cartaceo, controfirmata dal tutor, consegnata presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato ai fini del deposito presso l'Archivio di Ateneo, e che di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi;
- 7) del fatto che la copia consegnata in formato cartaceo, controfirmata dal tutor, depositata nell'Archivio di Ateneo, è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie;

Data \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

## NON AUTORIZZO

l'Università a riprodurre ai fini dell'immissione in rete e a comunicare al pubblico tramite servizio on line entro l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto la tesi depositata per un periodo di 12 (dodici) mesi a partire dalla data di conseguimento del titolo di dottore di ricerca.

## DICHIARO

- 1) che la tesi, in quanto caratterizzata da vincoli di segretezza, non dovrà essere consultabile on line da terzi per un periodo di 12 (dodici) mesi a partire dalla data di conseguimento del titolo di dottore di ricerca;
- 2) di essere a conoscenza del fatto che la versione elettronica della tesi dovrà altresì essere depositata a cura dell'Ateneo presso le Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze dove sarà comunque consultabile su PC privi di periferiche; la tesi sarà inoltre consultabile in formato cartaceo presso l'Archivio Tesi di Ateneo;
- 3) di essere a conoscenza che allo scadere del dodicesimo mese a partire dalla data di conseguimento del titolo di dottore di ricerca la tesi sarà immessa in rete e comunicata al pubblico tramite servizio on line entro l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto.

Specificare la motivazione:

- motivi di segretezza e/o di proprietà dei risultati e/o informazioni sensibili dell'Università Ca' Foscari di Venezia.
- motivi di segretezza e/o di proprietà dei risultati e informazioni di enti esterni o aziende private che hanno partecipato alla realizzazione del lavoro di ricerca relativo alla tesi di dottorato.
- dichiaro che la tesi di dottorato presenta elementi di innovazione per i quali è già stata attivata / si intende attivare la seguente procedura di tutela:

.....;

- Altro (specificare):

.....  
.....  
.....

A tal fine:

- dichiaro di aver consegnato la copia integrale della tesi in formato elettronico tramite auto-archiviazione (upload) nel sito dell'Università; la tesi in formato elettronico sarà caricata automaticamente nell'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto dell'Università Ca' Foscari, dove rimarrà non accessibile fino allo scadere dell'embargo, e verrà consegnata mediante procedura telematica per il deposito legale presso la Biblioteca Nazionale Centrale di Firenze;
- consegno la copia integrale della tesi in formato cartaceo presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato ai fini del deposito presso l'Archivio di Ateneo.

**Data** ..... **Firma** .....

La presente dichiarazione è sottoscritta dall'interessato in presenza del dipendente addetto, ovvero sottoscritta e inviata, unitamente a copia fotostatica non autenticata di un documento di identità del dichiarante, all'ufficio competente via fax, ovvero tramite un incaricato, oppure a mezzo posta.

**Firma del dipendente addetto** .....

Ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs. n. 196/03 si informa che il titolare del trattamento dei dati forniti è l'Università Ca' Foscari - Venezia.

I dati sono acquisiti e trattati esclusivamente per l'espletamento delle finalità istituzionali d'Ateneo; l'eventuale rifiuto di fornire i propri dati personali potrebbe comportare il mancato espletamento degli adempimenti necessari e delle procedure amministrative di gestione delle carriere studenti. Sono comunque riconosciuti i diritti di cui all'art. 7 D. Lgs. n. 196/03.