

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E ANTIMICROBIANO (*IN VITRO*) DOS
CANABINOIDES CANABIDIOL (CBD) E Δ-9-TETRAHIDROCANABINOL (THC)
DERIVADOS DA *Cannabis sativa* L.**

LIDIANE SILVA DO NASCIMENTO

JOÃO PESSOA
2023

LIDIANE SILVA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E ANTIMICROBIANO (*IN VITRO*) DOS
CANABINOIDES CANABIDIOL (CBD) E Δ -9-TETRAHIDROCANABINOL (THC)
DERIVADOS DA *Cannabis sativa* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

JOÃO PESSOA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244a Nascimento, Lidianne Silva do.

Avaliação do perfil toxicológico e antimicrobiano (in vitro) dos canabinoides canabidiol (CBD) e Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) derivados da Cannabis sativa L. / Lidianne Silva do Nascimento. - João Pessoa, 2023.

106 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacodinâmica - Canabinoides. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Cannabis sativa L. 4. Fragilidade osmótica. 5. Hemólise. 6. Toxicidade. I. Diniz, Margareth de Fátima Formiga Melo. II. Título.

UFPB/BC

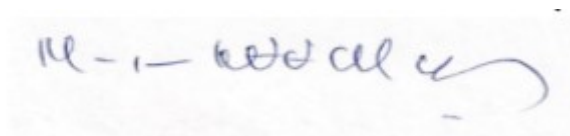
CDU 615.015(043)

Elaborado por WALQUELINE DA SILVA ARAUJO - CRB-15/514

LIDIANE SILVA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E ANTIMICROBIANO (*IN VITRO*) DOS
CANABINOIDES CANABIDIOL (CBD) E Δ-9-TETRAHIDROCANABINOL (THC)
DERIVADOS DA *Cannabis sativa* L.**

Banca Examinadora



Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Orientadora)



Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa
(Membro Externo Titular)



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(Membro Externo Titular)

Profa. Dra. Daniele Idalino Janebro
(Membro Externo Suplente)

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo-me carinho, compreensão e incentivo, dedico este trabalho como uma expressão do meu mais profundo agradecimento e amor.

Ao Santos Futebol Clube, que me proporciona momentos de alegria e emoção, dedico este trabalho como uma demonstração do meu respeito e da minha fidelidade. "Nascer, Viver e no Santos morrer... é um Orgulho que nem todos podem ter".

A todos os que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, manifesto a minha sincera gratidão.

"Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada."

~Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Não há palavras que possam expressar a minha gratidão a todas as pessoas que me apoiaram e me incentivaram na realização do meu mestrado no Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Foi uma experiência única e enriquecedora, que me proporcionou aprendizado, crescimento e amizade. Sou muito grata ao programa e a todos os profissionais que fazem parte dele, que me acolheram e me orientaram com dedicação e competência.

Quero agradecer especialmente à Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Diniz que aceitou me orientar em um momento tão especial da minha vida. À Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa, que foi essencial para que essa jornada fosse concluída, sempre com doçura e calma. À Profa. Dra. Micheline Donato que, gentilmente, disponibilizou as substâncias para a realização do presente trabalho e sempre esteve à disposição para tirar todas as dúvidas que surgiram no caminho. Elas foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal, me ensinando muito mais do que conceitos e métodos, mas também valores e atitudes. Elas foram exemplos de profissionalismo, ética e generosidade, que eu sempre vou admirar e seguir.

Também quero agradecer às minhas colegas e funcionárias do LABETOX II (Zilka Nanes, Fernanda Galdino, Zilmara e Fabiana), que foram mais do que companheiras de trabalho, são amigas queridas. Elas tornaram os meus dias mais leves e divertidos, compartilhando comigo momentos de alegria, desafio e superação. Elas foram essenciais para o meu bem-estar e para a qualidade do meu trabalho.

Não posso deixar de agradecer ao Santos Futebol Clube, que é o meu time do coração e que sempre me inspirou com a sua garra e determinação. Mesmo nos momentos mais difíceis, eu nunca perdi a esperança de que dias melhores virão, pois as adversidades fazem parte do processo. “Com técnica e disciplina, dando o sangue com amor, pela bandeira que ensina lutar com fé e com ardor.”

Quero agradecer à minha família, que é o meu porto seguro e a minha maior fonte de amor. Eles estiveram ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me encorajando e me celebrando. Eles foram o meu combustível para seguir em frente e não desistir dos meus sonhos. Eles são tudo para mim.

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a retirada do genocida do poder e para a eleição do atual Presidente Lula. A ciência brasileira estava na UTI e começou a dar os seus primeiros sinais de melhora. A sociedade brasileira está voltando para a luz da razão e trilhando rotas mais prósperas.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pois, o fomento que recebi durante os últimos 24 meses, foi inestimável para a minha permanência no mestrado.

Quero manifestar minha sincera gratidão a todos os professores da minha banca examinadora, que gentilmente aceitaram o desafio de avaliar este trabalho. Muito obrigada!

Por fim, agradeço a todos os homens e mulheres, do passado e do presente, que adicionaram um bloco de conhecimento científico na construção do glorioso caminho para a iluminação.

RESUMO

NASCIMENTO, Lidiane S. **Avaliação do perfil toxicológico e antimicrobiano (*in vitro*) dos canabinoides Canabidiol (CBD) e δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) derivados da *Cannabis sativa* L.** 107p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, 2023.

Esta pesquisa visa contribuir com os esforços científicos que buscam compreender de forma robusta as propriedades da *C. sativa* L. no contexto farmacológico. Os experimentos tiveram como objetivo avaliar aspectos toxicológicos e atividades farmacológicas dos canabinoides CBD e THC. Foram realizadas avaliações toxicológicas para examinar o potencial hemolítico e oxidativo de óleos ricos em canabinoides, utilizando eritrócitos humanos dos tipos A-, B+ e O+. Os óleos foram testados nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL. A hemólise foi quantificada através da detecção da hemoglobina liberada pelas hemácias, medida a 540 nm por espectrofotometria. Os resultados indicaram que os óleos CBD, THC e CBD+THC não causaram ação hemolítica acima de 8% em todas as concentrações e tipos sanguíneos testados. O potencial oxidante dos canabinoides revelou que o CBD e o THC não foram capazes de promover níveis significativamente elevados de oxidação da hemoglobina, embora os valores de metemoglobina tendessem a aumentar com a concentração da substância, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Em relação à fragilidade osmótica dos glóbulos vermelhos, os canabinoides CBD e THC foram avaliados para determinar se protegem contra a hemólise em células enfraquecidas por solução hipotônica. Os resultados indicaram que, embora as porcentagens de hemólise tenham sido reduzidas em alguns casos, a proteção foi de baixa eficácia, mesmo nas concentrações mais elevadas. Quanto à atividade antioxidante, os canabinoides CBD e THC apresentaram resultados limitados na proteção contra a oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina. No entanto, a mistura dos dois canabinoides apresentou uma dinâmica mais potente na proteção contra a oxidação. A atividade antimicrobiana foi avaliada em 34 cepas bacterianas, sendo 17 gram-positivas e 17 gram-negativas. Ambos os canabinoides demonstraram a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, com o CBD revelando maior eficácia ao inibir 11 cepas gram-positivas e 4 gram-negativas. O THC inibiu o crescimento de 8 cepas gram-positivas e 1 gram-negativa. No entanto, é importante notar que a ação das moléculas foi bacteriostática. A mistura dos canabinoides apresentou resultados semelhantes aos obtidos com os compostos isolados. No geral, concluímos que os canabinoides CBD e THC exibiram baixa toxicidade para as células sanguíneas humanas, demonstraram atividade antioxidante limitada e mostraram atividade antimicrobiana frente a patógenos de importância clínica, principalmente como agentes bacteriostáticos.

Palavras-chave: Antioxidante; Atividade antimicrobiana; *Cannabis sativa* L.; Canabinoides; CBD; Fragilidade osmótica; Hemólise; THC; Toxicidade.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Lidiane S. **Evaluation of the toxicological and antimicrobial profile (in vitro) of the cannabinoids Cannabidiol (CBD) and δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) derived from *Cannabis sativa* L.** 107p. (Master's Degree in Bioactive Synthetic and Natural Products – Concentration Area: Pharmacology) – Federal University of Paraíba, UFPB, João Pessoa, 2023.

This research aims to contribute to scientific efforts that seek to robustly understand the properties of *C. sativa* L. in the pharmacological context. The experiments aimed to evaluate toxicological aspects and pharmacological activities of the cannabinoids CBD and THC. A toxicological evaluation was carried out to examine the hemolytic potential of oils rich in cannabinoids, using human erythrocytes of types A-, B+ and O+. The oils were tested at concentrations of 50, 100, 200, 300 and 400 $\mu\text{g/mL}$. Hemolysis was quantified through the detection of hemoglobin released by red blood cells, measured at 540 nm by spectrophotometry. The results indicated that CBD, THC and CBD+THC oils did not cause hemolytic action above 8% in all concentrations and blood types tested. The oxidizing potential of cannabinoids revealed that CBD and THC were not able to promote significantly high levels of hemoglobin oxidation. Although methemoglobin values tended to increase with the concentration of the substance, these differences were not statistically significant. Regarding the osmotic fragility of red blood cells, the cannabinoids CBD and THC were evaluated to determine whether they protect against hemolysis in cells weakened by hypotonic solution. The results indicated that, although the percentages of hemolysis were reduced in some cases, the protection was of low effectiveness, even at the highest concentrations. Regarding antioxidant activity, the cannabinoids CBD and THC showed limited results in protecting against the oxidation of hemoglobin by phenylhydrazine. However, the mixture of the two cannabinoids presented a more powerful dynamic in protecting against oxidation. Antimicrobial activity was evaluated in 34 bacterial strains, 17 gram-positive and 17 gram-negative. Both cannabinoids have demonstrated the ability to inhibit bacterial growth, with CBD revealing greater efficacy by inhibiting 11 gram-positive and 4 gram-negative strains. THC inhibited the growth of 8 gram-positive and 1 gram-negative strains. However, it is important to note that the action of the molecules was bacteriostatic. The mixture of cannabinoids showed results similar to those obtained with the isolated compounds. Overall, we concluded that the cannabinoids CBD and THC exhibited low toxicity to human blood cells, exhibited limited antioxidant activity, and showed antimicrobial activity against pathogens of clinical importance, mainly as bacteriostatic agents.

Keywords: Antioxidant; Antimicrobial activity; *Cannabis sativa* L.; Cannabinoids; CBD; Osmotic fragility; Hemolysis; THC; Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia da <i>Cannabis sativa</i> L.....	21
Figura 2	Inflorescência de Cannabis e tricomas glandulares caulinares.....	22
Figura 3	Dispersão da Cannabis ao longo do tempo.....	22
Figura 4	Metabólitos secundários da <i>Cannabis sativa</i> L.....	30
Figura 5	Estruturas químicas do Canabidiol e do Δ^9 -tetrahydrocannabinol.....	31
Figura 6	O CBD pode ativar, bloquear, inverter ou modificar a ação de certos receptores e enzimas que estão relacionados a doenças.....	32
Figura 7	Porcentagem de hemólise induzida por óleo rico em CBD frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	55
Figura 8	Porcentagem de hemólise induzida por óleo rico em THC frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	56
Figura 9	Porcentagem de hemólise induzida por óleo rico em CBD+THC frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	58
Figura 10	Efeitos oxidantes dos óleos ricos em CBD, THC e CBD+THC frente a hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos.....	59
Figura 11	Proteção do CBD contra o estresse osmótico em eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	61
Figura 12	Proteção do THC contra o estresse osmótico em eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	63
Figura 13	Proteção do CBD+THC contra o estresse osmótico em eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	64
Figura 14	Efeitos antioxidantes do CBD, THC e CBD+THC frente a hemoglobinas oriundas de eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....	67

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Classificação Botânica da Cannabis.....	19
Tabela 2	Composição das amostras dos óleos derivados da <i>C. sativa</i>	46
Tabela 3	Resultado da primeira triagem com a concentração de 1.500 µg de CBD e THC em cepas gram-positivas.....	69
Tabela 4	Resultado da primeira triagem com a concentração de 1.500 µg de CBD e THC em cepas gram-negativas.....	70
Tabela 5	Resultado da segunda triagem com as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de CBD em cepas gram-positivas e gram-negativas.....	71
Tabela 6	Resultado da segunda triagem com as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de THC em cepas gram-positivas e gram-negativas.....	72
Tabela 7	Resultado da segunda triagem com as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de CBD+THC em cepas gram-positivas e gram-negativas.....	72
Tabela 8	Resultado da avaliação da Concentração Inibitória Mínima do CBD frente a cepas gram-positivas e gram-negativas.....	74
Tabela 9	Resultado da avaliação da Concentração Inibitória Mínima do THC frente a cepas gram-positivas.....	75
Tabela 10	Resultado da avaliação da Concentração Inibitória Mínima da combinação do CBD+THC frente a cepas gram-positivas e gram-negativa.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- **2-AG** - 2-araquidonoilglicerol
- **AEA** - Anandamida
- **ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- **ATCC** - American Type Culture Collection
- **CB1** - Receptor Canabinoide 1
- **CB2** - Receptor Canabinoide 2
- **CBC** - Canabicromeno
- **CBD** - Canabidiol
- **CFM** - Conselho Federal de Medicina
- **CIM** - Concentração inibitória mínima
- **COVID-19** - Coronavirus Disease 2019
- **DMSO** – Dimetilsulfóxido
- **ERN** - Espécies reativas de nitrogênio
- **ERO** - Espécies reativas de oxigênio
- **FAAH** - Amida Hidrolase dos Ácidos Graxos
- **Hb** - Hemoglobina
- **MAGL** - Mono Acil Glicerol Lipase
- **MetHb** - Metahemoglobina
- **OMS** - Organização Mundial de Saúde
- **PH** - Fenilhidrazina
- **rpm** - Rotações por minuto
- **THC** - Δ^9 -tetrahydrocannabinol
- **UFPB** - Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 Aspectos botânicos e históricos da <i>Cannabis sativa</i> L.....	18
2.2 <i>Cannabis sativa</i> L. no Brasil.....	26
2.3 Aspectos Bioquímicos e Farmacológicos da <i>Cannabis sativa</i> L.....	28
2.4 Toxicologia de Produtos Naturais.....	36
2.5 Potencial antimicrobiano de produtos à base de plantas.....	40
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos Específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Óleos derivados da <i>Cannabis sativa</i>	45
4.2 Preparação das amostras dos óleos de CBD e THC para os ensaios.....	45
4.3 Eritrócitos Humanos.....	45
4.4 Avaliação do potencial hemolítico dos óleos derivados da <i>C. sativa</i> em eritrócitos humanos.....	46
4.5 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos óleos derivados da <i>Cannabis sativa</i>	46
4.6 Ensaios de Atividade Oxidante e Antioxidante.....	47
4.7 Cepas Bacterianas.....	48
4.8 Meio de cultura.....	49
4.9 Obtenção do Inóculo Bacteriano.....	49
4.10 Avaliação do potencial antimicrobiano dos óleos ricos em CBD e THC.....	49
4.11 Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Avaliações Toxicológicas: Potencial hemolítico e oxidativo dos óleos ricos em CBD E THC.....	52
5.2 Propriedades Farmacológicas: Proteção contra o estresse osmótico, Potencial antioxidante e antimicrobiano dos óleos ricos em CBD e THC.....	59
6. DISCUSSÃO.....	76
7. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

As plantas são seres silenciosos e pouco interativos, assim, passamos por elas e muitas vezes não damos a devida atenção a esses organismos que são tão indispensáveis para a nossa sobrevivência. Os seres fotossintetizantes são a ligação mais profunda entre a energia solar e toda a biosfera, sendo assim, elementos essenciais para a manutenção de toda uma rede biológica em constante evolução. Um dos seus produtos metabólicos, o oxigênio, é externalizado de suas células e entra em nossos pulmões, criando um laço íntimo, vital e, em muitos casos, simbiótico.

Os ecossistemas, com diferentes composições biológicas, foram o nosso primeiro laboratório, onde, utilizando a observação e a experimentação com base em nossos sentidos, aprendemos a escolher as melhores espécies de plantas e animais para serem utilizadas como recursos (Thomford et al., 2018). Os produtos naturais, amplamente definidos como produtos químicos produzidos por organismos vivos (Sorokina & Steinbeck, 2020), são nossa maior fonte de materiais e moléculas em diversos contextos, nenhum processo desenvolvido pelos seres humanos conseguiu, até o presente momento, fornecer recursos sintéticos substitutos no mesmo nível quantitativo e qualitativo. Um exemplo disso é que entre os anos de 1981 e 2014 mais de 50% dos medicamentos recém-desenvolvidos foram derivados a partir de produtos naturais (Sorokina & Steinbeck, 2020).

Os produtos naturais evoluíram ao longo de milhões de anos e adquiriram uma grande diversidade e complexidade química (Tung, 2014; Sorokina & Steinbeck, 2020), que confere a essas moléculas diversas atividades biológicas de significativo valor medicinal e impacto sociocultural (Jamieson et al., 2021). Desde a descoberta da penicilina, há mais de 80 anos, foram caracterizados mais de 23.000 produtos naturais; sendo as pesquisas impulsionadas pelas descobertas de que eles são agentes importantes e valiosos: produtos farmacêuticos, herbicidas, inseticidas, etc. Os avanços das últimas décadas promoveram uma grande queda no custo do sequenciamento genômico, fazendo com que seja viável o sequenciamento de vários genomas em um curto espaço de tempo, podendo assim, ser possível identificar a "matéria escura biossintética". Esses dados, juntamente

com os avanços em bioinformática, espectrometria de massas, proteômica, transcriptômica, metabolômica e expressão gênica, estão levando a descoberta de novos metabólitos secundários que podem ser essenciais para diversos contextos humanos, como o farmacêutico (Katz & Baltz, 2016; Tung, 2014).

Dentro desse contexto, as plantas estão em posição de destaque, suas propriedades terapêuticas são reconhecidas desde tempos imemoriais (Zhang, 2018). As plantas possuem uma ampla distribuição, estando presentes em ambientes amenos e inóspitos. Por serem, na maioria, organismos fixos e submetidas a muitos fatores estressantes, como ataques de animais e oscilações ambientais, elas evoluíram para produzir diversos compostos de proteção, possuindo um arcabouço molecular bastante complexo e rico em princípios ativos, que dão às plantas sua capacidade de emitir fragrâncias, cores e toxicidade, onde, historicamente, foram amplamente estudados para a produção de produtos medicamentosos (Thomford et al., 2018).

A passagem do tempo não apagou a cultura de procurar nas plantas recursos para melhorar a saúde humana. A diversidade vegetal tem sido uma das principais fontes de fármacos em todo o mundo, especialmente para o tratamento do câncer e infecções microbianas (Thomford et al., 2018). Em uma catalogação feita entre os anos de 1999 e 2009 a Organização Mundial de Saúde (OMS) listou mais de 21.000 plantas utilizadas para propósitos medicinais em todo o mundo. E é estimado que cerca de 60% da população mundial utiliza medicamentos tradicionais à base de plantas (Sorokina & Steinbeck, 2020).

Historicamente, países e regiões menos desenvolvidas têm estatísticas maiores no uso de extratos vegetais para tratar as mais diversas condições de saúde. Esse é o caso de grande parte dos países asiáticos e africanos, onde a medicina tradicional continua a ser uma parte muito importante por razões culturais, tradicionais e econômicas (Sorokina & Steinbeck, 2020). A OMS estima que cerca de 80% da população dos países em processo de desenvolvimento utiliza remédios tradicionais (Jitäreanu et al., 2023).

Nos países considerados desenvolvidos a medicina tradicional perdeu espaço e os medicamentos sintéticos foram vistos como uma mina de ouro para o tratamento das mais diversas condições. Porém, essa perspectiva vem mudando

com o passar do tempo, atualmente, existe um movimento mundial que visa “voltar à natureza” para obter respostas, uma vez que funcionou para a descoberta de drogas no passado (Sorokina & Steinbeck, 2020). Países classificados como desenvolvidos, como Reino Unido, Alemanha e França estão usando as mais recentes tecnologias na área da biologia molecular e computacional para descobrir moléculas ativas para tratar desafios da medicina moderna, como o câncer, doenças degenerativas, HIV/AIDS e diabetes. Um histórico positivo pode ser usado como estímulo para o avanço dessa perspectiva, como as drogas Paclitaxel e Morfina, ambas isoladas de plantas (Thomford et al., 2018).

Entre as diversas espécies utilizadas pelos humanos está a *Cannabis sativa* L., pertencente à família Cannabaceae, considerada uma das primeiras plantas cultivadas pela humanidade. Os registros mais antigos de utilização da espécie apontam para um uso amplo, estando relacionada com a alimentação, produção de objetos e extratos medicinais (Gontiès, 2003; Nascimento & Dalcin, 2019). Atualmente é mundialmente conhecida por ser usada como uma droga recreativa por conta do seu potencial psicoativo. Devido a esse contexto a espécie é vista, socialmente, com grande preconceito, pois, é considerada um forte incentivo para o uso de drogas ilícitas mais danosas e viciantes. Na utilização não medicamentosa, a espécie costuma ser fumada, inalada ou ingerida sozinha ou com outros alimentos (Nascimento & Dalcin, 2019).

Por muitos anos, a maioria dos estudos se concentraram em verificar os efeitos nocivos provocados pela espécie, e, resumidamente, na utilização aguda foi verificado o desenvolvimento de ansiedade, efeitos psicoativos e crises de pânico. Já no uso contínuo, mostrou-se que pode gerar bronquite crônica, baixa função respiratória, desenvolvimento de psicose e dependência, que por sua vez, promove o aumento de chances do aparecimento de efeitos secundários, como agitação, insônia, irritabilidade, náuseas e câimbras (Gontiès, 2003; Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

Atualmente, existe um grande esforço por parte da comunidade científica que busca entender as propriedades farmacológicas da *C. sativa* de uma forma mais abrangente e clara. A caracterização molecular revelou que a espécie é composta por mais de 400 tipos de compostos químicos diferentes produzidos pelo seu

metabolismo secundário: como terpenos, compostos fenólicos e canabinoides. A última classe citada, a dos canabinoides, recebeu uma grande atenção nas últimas décadas, pois foi descoberto que a molécula Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), responsável pelos efeitos psicotrópicos da Cannabis, pertencia a esse grupo. Além disso, outros canabinoides foram isolados e estudados e mostraram resultados promissores no contexto terapêutico, como o Canabidiol (CBD), segundo maior componente da planta (Nascimento & Dalcin, 2019).

Com o conhecimento sobre as moléculas promotoras do efeito psicotrópico e efeitos terapêuticos relativamente bem estabelecido, a pergunta que precisava ser respondida era como essas moléculas interagem com a fisiologia humana. Essa questão começou a ser desvendada com a descoberta de um sistema de sinalização celular durante a década de 1980, que ficou conhecido como Sistema Endocanabinoide. Esse sistema é formado por um conjunto de proteínas receptoras, os mais bem caracterizados são o receptor CB1 ou CB1R (localizado principalmente no sistema nervoso central) e o CB2 ou CB2R (encontrado principalmente no sistema imunológico e em células periféricas), moléculas sinalização endógenas Anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), conhecidas como endocanabinoides, e as proteínas de síntese e degradação. Além dos endocanabinoides, os receptores CB1 e CB2 interagem e sofrem mudanças conformacionais quando se ligam com os canabinoides específicos derivados da *C. sativa* (Gontiès, 2003; Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

O conhecimento tradicional milenar redescoberto, juntamente com as descobertas do final do século 20 e início do século 21, apontam que a Cannabis é uma planta que pode auxiliar eficientemente no tratamento de diversas doenças, condições neuropsiquiátricas e até atuando como agente antimicrobiano (Iseppi et al., 2019), fazendo-se necessário mais estudos científicos, a legalização da utilização dos seus derivados e o aumento da divulgação dos achados positivos para proporcionar o declínio do preconceito contra a espécie.

Para promover a liberação de medicamentos à base de Cannabis é necessário considerar aspectos relacionados à qualidade e segurança dos produtos. A avaliação toxicológica é um requisito imprescindível para o desenvolvimento de produtos medicamentosos seguros, sendo requerida nas fases pré-clínica e clínica

(Oliveira et al., 2016). É através dela que é feita a verificação dos riscos, reduzindo a probabilidade de um novo fármaco interferir de forma danosa no metabolismo celular do indivíduo, causando intoxicações (Silva et al., 2021).

Assim, o renascimento do interesse nas propriedades da *Cannabis* ilustra o potencial transformador das plantas em nossa saúde, contribuindo com a resolução de problemas importantes que afetam a população em geral. Ao tecer a trama entre tradição e descoberta científica, resgatamos lições ancestrais de cura e coexistência, abrindo caminho para uma abordagem mais harmoniosa e compassiva com o reino vegetal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos botânicos e históricos da *Cannabis sativa* L.

A classificação filogenética da espécie *Cannabis sativa* L. tem sido objeto de estudo e revisão contínua. A espécie pertence ao reino *Plantae* (plantas) e à divisão *Magnoliophyta* (plantas com flor). Dentro dessa divisão, ela se enquadra na classe *Magnoliopsida*, que engloba as dicotiledôneas, um grupo de plantas com duas folhas embrionárias, chamadas cotilédones, em seu estágio inicial de desenvolvimento. A família à qual a *C. sativa* pertence é a *Cannabaceae*, que pertence a ordem *Rosales*, que também inclui outras famílias de plantas, como *Rosaceae* (rosáceas) e *Moraceae* (moricáceas). O gênero ao qual a *C. sativa* pertence é, como o próprio nome sugere, *Cannabis* (Rodziewicz & Kayser, 2020; Schwabe et al., 2021; Carvalho & Trevisan, 2021). A classificação das espécies dentro do gênero ainda gera discussão, pois, devido a sua ampla distribuição geográfica e cultivo sob diferentes condições ambientais, ocorreu a disseminação de diversas variantes; porém, o mais aceito é que o gênero ao qual pertence possui apenas uma espécie: *Cannabis sativa* L., e as outras denominações são consideradas como subespécies: *sativa*, *indica*, *ruderalis* e *spontanea* (Gontiès, 2003; Carvalho & Trevisan, 2021) (TABELA 1).

Tabela 1: Classificação Botânica da Cannabis

Nome da Espécie:	<i>Cannabis sativa</i> L.
Reino:	<i>Plantae</i> (Planta)
Sub-reino:	<i>Tracheobionta</i> (planta vascular)
Subdivisão:	<i>Spermatophyta</i> (planta com sementes)
Divisão:	<i>Magnoliophyta</i> (planta com flores)
Classe:	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledônea)
Subclasse:	<i>Hamamelididae</i>
Ordem:	<i>Urticales</i>
Gênero:	<i>Cannabis</i> L.
Espécie:	<i>Cannabis sativa</i> L.
Subespécies:	<i>sativa, indica, ruderalis e spontanea</i>

Fonte: Classificação botânica da Cannabis segundo o *UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE* (2016) apud Carvalho & Trevisan (2021).

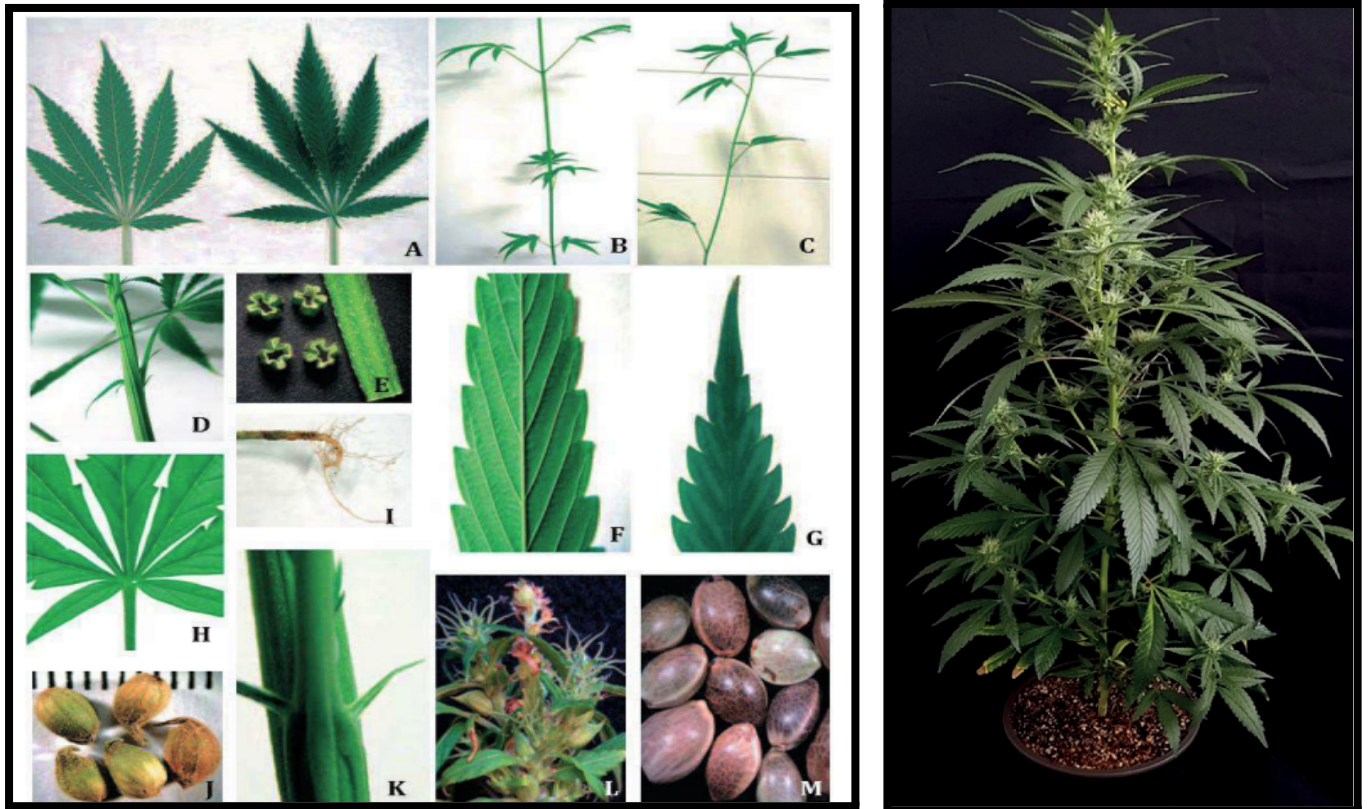
A *C. sativa* é uma planta anual de porte alto, com a altura média variando de 1 a 5 metros. Ela possui uma haste ereta e cilíndrica, com ramificações que se desenvolvem ao longo do seu crescimento. As folhas da *C. sativa* são compostas, digitadas e palmadas, o que significa que são divididas em vários folíolos. Normalmente, cada folha possui de 5 a 9 folíolos serrilhados. As folhas maiores são encontradas na parte inferior da planta, enquanto as superiores são menores. As flores da *C. sativa* são unissexuais, o que significa que há plantas com flores masculinas e plantas com flores femininas. As flores femininas são as mais valorizadas, pois contêm maior quantidade de tricomas, onde são encontrados os canabinoides (Schwabe et al., 2021; Carvalho & Trevisan, 2021), e as flores masculinas produzem pólen para a polinização (Gontiès, 2003) (FIGURA 1).

A inflorescência da *C. sativa* é uma espiga terminal composta por grupos de flores que formam uma estrutura em forma de cacho. Essas inflorescências são chamadas de "cabeças" e são as partes mais utilizadas para fins medicinais e recreativos. Os tricomas são estruturas microscópicas epidérmicas encontradas nas flores, folhas e até mesmo nos caules da planta. Eles são pequenas protuberâncias, que cobrem densamente as superfícies das inflorescências femininas (Booth &

Bohlmann, 2019), que parecem pêlos e são responsáveis pela produção de resina, que contém os canabinoides, como o delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD) (Rodziewicz & Kayser, 2020; Schwabe et al., 2021) (FIGURA 2).

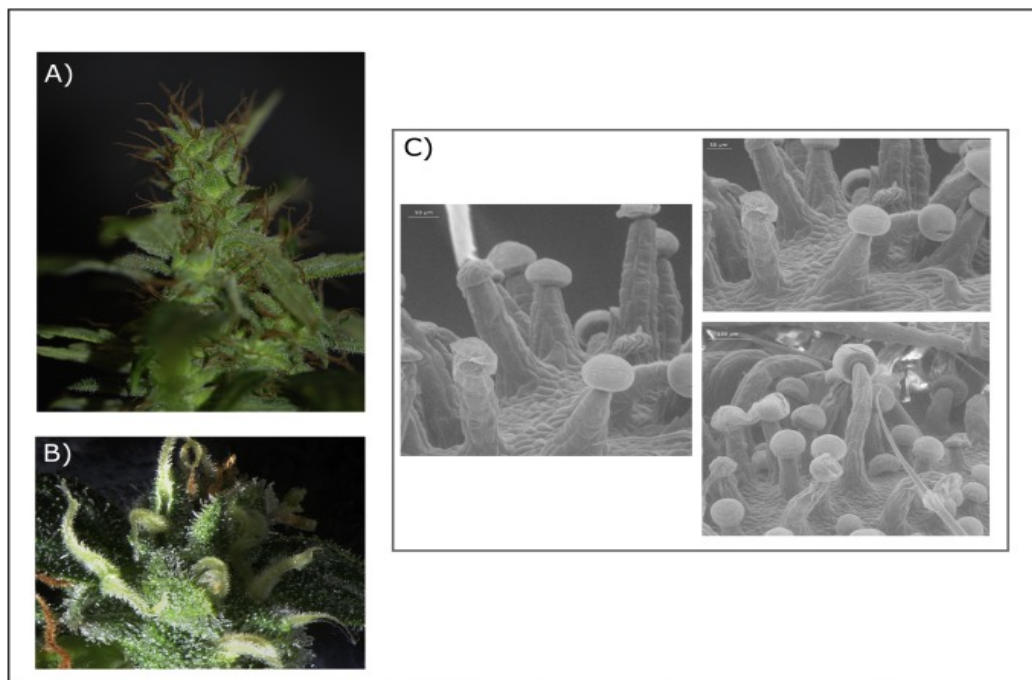
A Cannabis possui uma adaptação bastante plástica, podendo crescer em diferentes tipos de solo, clima e altitude, porém, essas variáveis, juntamente com fatores genéticos, podem gerar variação quanto a estabilidade do seu conteúdo bioquímico e influenciar a aparência e as características específicas de cada planta de Cannabis (Carvalho & Trevisan, 2021). Para manter suas propriedades medicinais e psicoativas, precisa de um clima quente e seco e umidade do solo adequada (Nascimento & Dalcin, 2019; Johnstad, 2020).

Figura 1. Morfologia da *Cannabis sativa* L.



A - Face abaxial (esquerda) e face adaxial (direita). B - Filotaxia oposta cruzada. C - Filotaxia alterna helicoidal. D - Caule de planta com 2,5 meses de vida. E - Corte transversal do caule. F - Face abaxial: detalhe das nervuras. G - Ápice de um segmento. H - Base do limbo foliar. I - Raiz. J - Frutos com cálices persistentes. K - Estípulas na base do pecíolo. L - Extremidade frutificada de espécime feminino. M - Frutos sem cálice. **Fonte:** Souza et al. (2006). N - Planta feminina adulta. **Fonte:** Carvalho & Trevisan, 2021.

Figura 2. Inflorescência de Cannabis e tricomas glandulares caulinares.



A) Inflorescência apical. B) Aglomerado de flores. C) Microscopia eletrônica de varredura de tricomas glandulares caulinares na superfície das flores pistiladas. **Fonte:** Booth & Bohlmann, 2019.

A história da relação dos humanos com a *C. sativa* é longa, complexa e com algumas lacunas desafiadoras. Especialistas apontam que a sua domesticação pode ter ocorrido há cerca de 12.000 anos atrás, a princípio na Eurásia Central e, posteriormente, foi cultivada em outras partes da Ásia, Europa Oriental e Oriente Médio entre os anos 4.000 e 2.000 a.C., onde desempenhou papéis importantes (Gontiès, 2003; Nascimento & Dalcin, 2019; Schwabe et al., 2021) (FIGURA 3).

Figura 3. Dispersão da Cannabis ao longo do tempo.



Fonte: Charitos et al., 2021.

Os primeiros registros escritos sobre o uso da Cannabis datam de cerca de 4.000 a.C., na China, onde a planta era apreciada por suas propriedades medicinais. Na antiga farmacopeia chinesa, é descrito que a planta tinha indicações para dor reumática, constipação intestinal, problemas do sistema reprodutor feminino, malária (Nascimento & Dalcin, 2019) e doenças mentais (Brand & Zhao, 2017). Além disso, a planta era apreciada por suas fibras duráveis, que eram utilizadas para fabricação de tecidos, papel, cordas, alimentos e também era feita a retirada de óleo dos seus frutos (Nascimento & Dalcin, 2019; Brand & Zhao, 2017). Ao longo do tempo, várias referências a Cannabis foram encontradas em toda a literatura chinesa, não sendo restrita apenas ao contexto medicinal e utilitário, a espécie também é citada em obras famosas de filosofia, poesia e agricultura (Brand & Zhao, 2017).

Um outro país com uma íntima e antiga relação com a espécie é a Índia, neste país a planta é mencionada em textos sagrados hindus e era considerada uma planta sagrada associada ao deus Shiva, possuindo um papel de agente de inspiração mística (Crocq, 2020). O sistema medicinal ayurvédico, que busca o equilíbrio entre a mente, o espírito e o corpo, utilizava extratos de Cannabis para tratar uma variedade de condições, incluindo dores, insônia, ansiedade, para melhorar o apetite, relaxar os músculos, tratar problemas digestivos e produzir uma sensação de euforia (Costa et al., 2011; Oliveira et al., 2020; Crocq, 2020).

Por meio das rotas comerciais da Antiguidade, a Cannabis se espalhou pelo mundo. As sociedades africanas cultivavam e usavam a Cannabis de diversas maneiras, para extração de fibras, produção de tecido de cânhamo, como medicamento e na alimentação, porém, o principal uso era como uma droga fumada, que permanece até os dias atuais (Crocq, 2020; Duvall, 2019). Na cultura egípcia, por exemplo, a planta era usada na fabricação de cordas e tecidos, porém, a maior parte do uso era em decorrência dos efeitos psicoativos da espécie (Duvall, 2019). Também alcançou a Europa, onde era valorizada por suas fibras resistentes, utilizadas para a produção de velas de embarcações, cordas, papel e tecidos; chegando a ser, juntamente com o linho, a cultura de fibras mais importante do século XVI ao XVIII, neste continente (Struik et al., 2000).

Durante os séculos XV e XVI, com a expansão dos impérios coloniais europeus, a *Cannabis* foi introduzida em novas regiões, como as Américas, começando pela América do Sul. Os colonizadores utilizaram a planta principalmente por suas fibras, que eram usadas na fabricação de elementos resistentes para as embarcações. Além disso, escravizados, principalmente os oriundos da Angola, trouxeram sementes que foram plantadas para diferentes fins (Zuardi, 2006). Dispersada nos países americanos, a *Cannabis* ganhou importância comercial para a produção de fibras, o que levou a legislações específicas que promoviam o seu cultivo nos novos países (Rodziewicz & Kayser, 2020; Zuardi, 2006). Além disso, um grande volume de usuários da espécie, com fins psicoativos, se estabeleceu, o que gerou muitos debates sobre os limites de uso.

O século XX foi marcado por um movimento em nível global de criminalização da *Cannabis sativa*, derivado de pressões políticas, sociais e econômicas. Esse período histórico foi marcado pelo início da construção da imagem pejorativa da espécie. Toda a história positiva dos séculos anteriores foi forçadamente ocultada pela marca de perigo e condutas antissociais (Rezende et al., 2021). O status de droga ilícita limitou drasticamente a pesquisa científica com a espécie (Simiyu et al., 2022). A planta passou a ser vista como uma fonte de problemas sociais, como o aumento da criminalidade e da violência, e vários países impuseram restrições e proibições ao seu uso recreativo (Wheeldon & Heidt, 2023). Essa atitude repressiva em relação à *Cannabis* foi impulsionada pela campanha de proibição conduzida pelos Estados Unidos, que moldou políticas em todo o mundo. Por exemplo, nos Estados Unidos, a Lei de Impostos sobre a Marihuana de 1937, proibiu quase totalmente o uso e a venda da planta, classificando-a como uma substância nociva e sem valor medicinal. A influência dos Estados Unidos também se manifestou pela Convenção Única sobre Entorpecentes de 1961, um tratado internacional que limitava drasticamente o uso e o comércio da *Cannabis* (Mead, 2019).

A *C. sativa* voltou a despertar o interesse da medicina nas últimas décadas (Hussain et al., 2021). A ciência tem mostrado os benefícios terapêuticos da planta para diversas situações, como a dor crônica, a epilepsia, a esclerose múltipla e a ansiedade. A identificação dos canabinoides, como o THC (tetrahydrocannabinol) e o

CBD (canabidiol), ajudou a compreender como a planta atua no organismo (Chayasirisobhon, 2020; Hussain et al., 2021).

Essa redescoberta medicinal da Cannabis tem desafiado as percepções negativas e estigmatizadas associadas à planta. Países pelo mundo têm mudado suas políticas e leis sobre a Cannabis, autorizando o uso medicinal sob controle e regulação (Ransing et al., 2022). Essa transformação de perspectiva tem sido influenciada pelas evidências científicas crescentes, pela demanda de grupos que defendem os direitos dos pacientes e pelo interesse em novas alternativas terapêuticas. Além disso, alguns países também estão liberando ou descriminalizando o uso recreativo da planta, admitindo que a criminalização não é a melhor forma de lidar com o consumo de Cannabis (Isorna et al., 2022).

Além do uso medicinal, a indústria da Cannabis está crescendo em várias áreas (Procaccia et al., 2022). Os produtos da planta estão sendo usados em setores como cosméticos, alimentos, bebidas e materiais de construção. A fibra da Cannabis também está sendo aproveitada como uma opção sustentável para a fabricação de papel, tecidos e bioplásticos (Adhikary et al., 2021).

Assim pode-se afirmar que a história da *Cannabis sativa* L. é uma prova da sua adaptabilidade e da influência que a planta teve nas sociedades ao longo dos séculos. Desde suas raízes antigas como uma planta sagrada e medicinal até os debates contemporâneos de legalização e uso terapêutico, a Cannabis tem assumido papéis variados na cultura humana. A mudança das percepções e das políticas sobre a planta indica a necessidade de uma abordagem mais equilibrada e baseada em evidências, levando em conta tanto os riscos potenciais quanto os benefícios da Cannabis. Com o avanço das pesquisas e o aumento do conhecimento sobre a planta, é provável que a história da Cannabis continue a se desenvolver, definindo o seu papel na sociedade atual e futura.

2.2 *Cannabis sativa* L. no Brasil

A presença da *Cannabis sativa* no Brasil remonta a tempos ancestrais. A chegada dos portugueses marca o início de muitas mudanças drásticas relacionadas à flora brasileira; o ingresso dos colonizadores europeus exporta muitas árvores nativas e introduz espécies exóticas, como a *C. sativa*, que, inicialmente, esteve presente como parte das embarcações: as velas e também o cordame, eram feitas de fibra de cânhamo. Posteriormente, foi introduzida como uma cultura agrícola. Os portugueses trouxeram sementes da erva e começaram a cultivar a planta no país, principalmente para a produção de fibras. A Cannabis foi cultivada em larga escala nas regiões Nordeste e Sudeste, especialmente para a produção de cordas, tecidos e velas (Carlini, 2006; Zuardi, 2006).

Em documentos oficiais, é atribuída uma outra origem de entrada da espécie no país. É apontado que sementes da *C. sativa* teriam sido introduzidas pelos negros escravizados, a partir de 1549, dentro de bonecas de pano e amarradas nas vestes (MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES, 1959). Independente da origem, a história da espécie no país é antiga e com vários desdobramentos ao longo dos séculos (Carlini, 2006).

A Cannabis no Brasil colonial não servia apenas para a produção de fibras. Há evidências históricas de que a planta também era empregada como remédio e como droga recreativa, embora com menor frequência (Carlini, 2006; Zuardi, 2006). Os povos indígenas faziam uso da planta para diversos fins, desde o tratamento de doenças até a realização de rituais. A Cannabis era valorizada por suas propriedades curativas, podendo aliviar dores, febres e inflamações. Além disso, a planta também tinha um papel importante nas cerimônias e nos ritos sagrados, onde a planta facilitava a busca por uma conexão espiritual (Gaudêncio et al., 2020; Carlini, 2006).

Durante grande parte do século XX, o Brasil acompanhou a tendência mundial de proibição da Cannabis. Em 1932, foi sancionada a Lei de Tóxicos que vedava a produção, comércio e uso de substâncias tidas como entorpecentes, incluindo a erva. Essa postura repressiva aumentou ao longo das décadas seguintes, com a implantação de políticas de guerra às drogas que geram prisões

em massa e na estigmatização dos usuários de Cannabis. No entanto, ao longo dos anos, a visão sobre a Cannabis começou a mudar no Brasil. A percepção de que a política de guerra às drogas não estava dando os resultados esperados e a crescente evidência dos benefícios medicinais da planta conduziram a uma maior discussão sobre a necessidade de revisão da legislação (Carlini, 2006).

A partir da década de 1990, começou a surgir um movimento de reconhecimento dos benefícios medicinais da Cannabis no Brasil. Pacientes que padeciam de condições médicas graves, como epilepsia refratária e dores crônicas, passaram a procurar na Cannabis uma opção de tratamento. No entanto, a falta de regulamentação e o estigma em torno da planta dificultavam o acesso a produtos à base de Cannabis. Foi somente em 2015 que o Brasil deu um passo importante no reconhecimento do uso medicinal da Cannabis. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou a regulamentação para a importação de medicamentos à base de Cannabis, desde que com prescrição médica e autorização prévia (ANVISA, 2015). Essa medida abriu caminho para que pacientes pudessem acessar produtos derivados da planta, como o canabidiol (CBD), que é reconhecido por seus efeitos terapêuticos.

Em uma resolução publicada em 2022, CFM Nº 2.324, o canabidiol pode ser prescrito pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) para o tratamento de epilepsia refratária em crianças e adolescentes com síndrome de Dravet, Lennox-Gastaut ou complexo de esclerose tuberosa. Essas são as únicas indicações terapêuticas permitidas pela norma, que proíbe o uso de outros produtos de Cannabis e a divulgação do canabidiol fora do meio científico. A norma tem validade de três anos e será revista nesse prazo (BRASIL, 2022; AGÊNCIA BRASIL, 2022).

Com o crescente número de evidências positivas sobre o uso da Cannabis em humanos, os estudos se estenderam para os animais de estimação. O deputado Bacelar (Pode-BA) apresentou o Projeto de Lei 369/21, que permite o uso veterinário de produtos derivados da *Cannabis sativa*, com prescrição de médico veterinário habilitado e autorização da Anvisa ou de órgãos estrangeiros. O objetivo é ampliar as possibilidades de tratamento de diversas doenças em animais, seguindo as normas existentes para uso humano (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2021).

Atualmente, o debate em torno da Cannabis no Brasil continua em curso. Embora a importação de medicamentos à base de Cannabis seja permitida, o cultivo da planta para uso pessoal ou o acesso a produtos de Cannabis no mercado interno ainda é alvo de discussões e controvérsias (Oliveira et al., 2020). Há propostas legislativas em andamento no Congresso Nacional que visam regulamentar o cultivo, a produção e a comercialização da Cannabis no Brasil, inclusive para uso recreativo (G1, 2023). Utilizando como base a situação atual, é possível prever que o Brasil irá avançar em direção a uma regulamentação mais ampla e equilibrada em relação à planta, garantindo o acesso seguro e legal aos seus benefícios terapêuticos e promovendo um debate informado sobre seu uso recreativo.

2.3 Aspectos Bioquímicos e Farmacológicos da *Cannabis sativa* L.

O interesse pelos estudos sobre a constituição da *C. sativa* surgiu devido às suas propriedades medicinais, que podem aliviar dores, náuseas e convulsões, e psicoativas, que alteram a percepção, o humor e a cognição. Essas propriedades foram observadas e utilizadas por várias culturas ao longo da história (Procaccia et al., 2022). Os primeiros registros históricos desses estudos datam do século XIX, quando pesquisadores começaram a explorar os benefícios terapêuticos da espécie. Um dos marcos fundamentais nesses estudos ocorreu em 1839, quando o cientista irlandês William Brooke O'Shaughnessy, que trabalhava na Índia, onde a erva era amplamente utilizada na medicina tradicional, publicou um estudo que demonstrou os efeitos da planta em várias condições médicas. O estudo de O'Shaughnessy foi um dos primeiros a fornecer uma análise científica e química da espécie (Crocq, 2020).

Os estudos físico-químicos apontaram que a espécie apresenta mais de 750 constituintes químicos diferentes, entre eles estão as moléculas da classe dos monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, esteroides, compostos nitrogenados, além dos canabinoides, que são a classe de metabólitos secundário que mais receberam atenção nos últimos anos (Nascimento & Dalcin, 2019). Os dois mais conhecidos e estudados são o Δ -9-tetrahidrocanabinol (THC), associado com

efeitos psicoativos, e o canabidiol (CBD), que não possui propriedades psicoativas e tem despertado muito interesse por suas potenciais propriedades medicinais (Crocq, 2020).

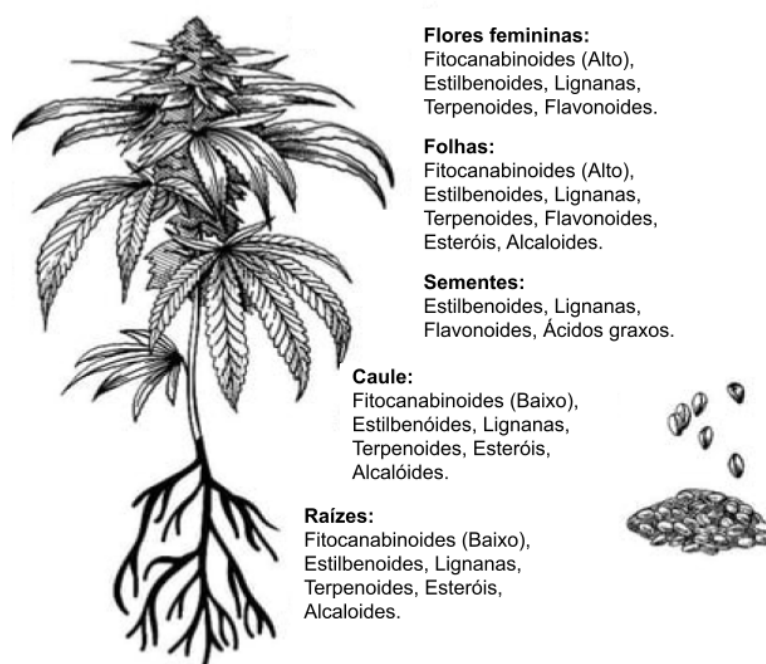
Além disso, a *C. sativa* também contém uma ampla variedade de terpenos, constituintes básicos dos óleos essenciais encontrados em muitas plantas, que são responsáveis pelos aromas distintos das diferentes variedades de Cannabis. Mais de 150 terpenos diferentes foram identificados na resina de diferentes tipos de Cannabis. Alguns estudos apontam propriedades medicinais dessas moléculas (Booth & Bohlmann, 2019). Existe uma hipótese que eles interagem sinergicamente com os canabinoides, potencializando seus efeitos terapêuticos (Booth & Bohlmann, 2019; Lavigne et al., 2021), estando relacionados com um aumento dos resultados positivos no tratamento da depressão, ansiedade, epilepsia, câncer e infecções. No entanto, esse contexto precisa ser melhor entendido, sendo um campo rico de possibilidades (Booth & Bohlmann, 2019).

Outro grupo de compostos encontrados na *C. sativa* são os flavonoides. Eles são pigmentos naturais que dão cor às plantas e estão relacionados com muitos efeitos farmacológicos benéficos. Mais de 20 flavonoides foram identificados na espécie, a maioria dos quais são flavonas (apigenina e luteolina: têm dois grupos hidroxila (OH) em posições diferentes) e flavonol (kaempferol e quercetina: têm um grupo hidroxila a mais do que as flavonas), agliconas e glicosídeos (as agliconas são as formas livres dessas moléculas, sem nenhum açúcar ligado a elas, enquanto glicosídeos são as formas que têm um ou mais açúcares ligados às agliconas) (Bautista et al., 2021; Hoffmann-Ribani & Rodriguez-Amaya, 2008). A bioatividade dessa classe de moléculas está relacionada a efeitos antioxidantes, propriedades anti-inflamatórias, neuroprotetoras, atividades anticancerígenas, antiparasitários e antiviral. Além disso, estudos recentes estão apontando que eles são importantes moduladores de outros fitoquímicos da Cannabis, incluindo os canabinoides (Bautista et al., 2021).

A concentração dessas moléculas nas diferentes partes da planta de Cannabis varia. Os canabinoides, por exemplo, são mais abundantes nas flores e nas folhas das plantas fêmeas. As flores são consideradas a parte mais rica em canabinoides, sendo especialmente importantes para fins medicinais e recreativos.

Porém, os terpenos estão presentes em todas as partes da planta, incluindo as flores, folhas, caules e tricomas. Os flavonoides também estão presentes em todas as partes da planta, incluindo as flores, folhas e caules (FIGURA 4). A concentração e a composição dessas moléculas podem mudar dependendo da variedade de Cannabis (Castillo-Arellano et al., 2023). Fatores como o ambiente de cultivo, o uso de fertilizantes, a exposição à luz solar, a temperatura e a umidade podem afetar a produção e a concentração dos compostos bioativos na planta. Além disso, o processo de secagem, cura e armazenamento adequados após a colheita também são essenciais para preservar a qualidade e a potência dos compostos presentes na Cannabis (Nascimento & Dalcin, 2019).

Figura 4. Metabólitos secundários da *Cannabis sativa* L.



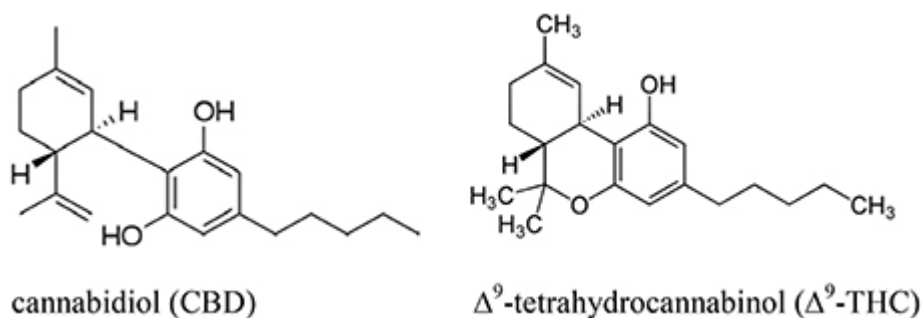
Fonte: Castillo-Arellano et al., 2023.

A *C. sativa* tem uma química muito complexa, rica em bioativos com propriedades farmacológicas importantes, uma compreensão da caracterização bioquímica da planta é essencial para entender seus efeitos terapêuticos e

recreativos, bem como para garantir a qualidade e a segurança dos produtos à base de Cannabis.

Os últimos anos foram marcados por uma intensa busca pelo entendimento das propriedades farmacológicas da *C. sativa*. Muitos estudos apontam um amplo espectro de condições que podem ter os elementos dessa espécie como alternativa para tratamento, sendo considerada uma “biofarmácia” (Li et al., 2020). No centro desse contexto promissor estão os dois canabinoides, CBD e THC, representados abaixo (FIGURA 5). Evidências apontam que a Cannabis possui mais de 120 compostos identificados como canabinoides. Essas moléculas possuem em comum um esqueleto terpenofenólico de 21 átomos de carbono (C₂₁), com variações nos grupos funcionais ligados a ele, que alteram suas propriedades físicas, químicas e biológicas (Brand & Zhao, 2017). Até o momento, esse grupo de moléculas só foi encontrado na Cannabis e na espécie *Trema micrantha*, que mostrou-se produtora de Canabidiol (Correia & Alves, 2023).

Figura 5: Estruturas químicas do Canabidiol (CBD, esquerda) e do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, direita).



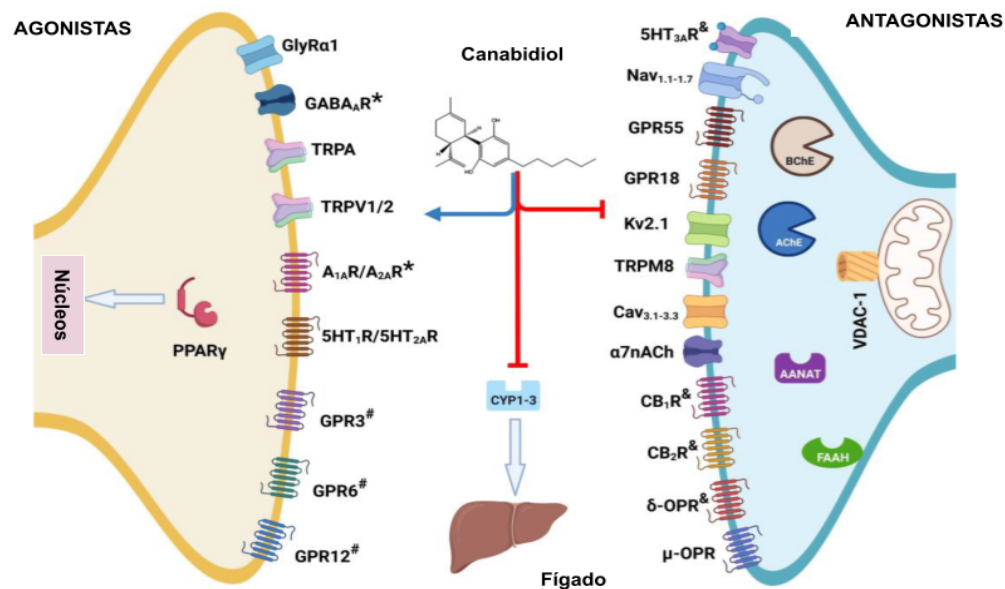
Fonte: Brand & Zhao, 2017.

O descortinar da história do Canabidiol inicia-se com a sua descoberta, que é atribuída a Roger Adams, um químico americano, que em 1940 conseguiu isolar o canabidiol pela primeira vez. No entanto, a estrutura química do CBD só foi elucidada em 1963 por Raphael Mechoulam e Yechiel Gaoni, pesquisadores

israelenses. Isso marcou um ponto de virada na compreensão do composto e suas propriedades. Raphael Mechoulam, muitas vezes chamado de "pai da pesquisa da cannabis medicinal", em 1980, juntamente com outros pesquisadores, descobriram o sistema endocanabinoide do corpo humano, composto por receptores que interagem com substâncias presentes na Cannabis, incluindo o CBD. Essa descoberta iniciou uma revolução na pesquisa médica com a Cannabis e na compreensão da interação entre compostos naturais e nosso sistema biológico (Li et al., 2020).

Logo após a elucidação da estrutura química do CBD, o THC foi isolado. Esse fato fez com que a grande atenção científica se voltasse para o tetrahydrocannabinol, que ficou conhecido por seus efeitos psicoativos. Porém, com o passar do tempo e a evolução dos estudos com a Cannabis em vários contextos e modelos, o CBD foi recebendo cada vez mais atenção, devido às suas potencialidades terapêuticas e não psicoativas. Estudos apontam que o CBD possui propriedades neuroprotetoras, antiepiléticas, ansiolíticas, antipsicóticas, anti-inflamatórias, analgésicas e anticancerígenas (Peng et al., 2022). Além disso, é considerado uma promissora molécula como agente antibacteriano (Blaskovich et al., 2021) e antiviral, inclusive para o tratamento da COVID-19 (Peng et al., 2022). Nos humanos, o CBD promove as suas diferentes atividades biológicas através da interação com diversos receptores do corpo (FIGURA 6), incluindo o Receptor Canabinoide tipo 1 (CB1) e Receptor Canabinoide tipo 2 (CB2) (Peng, et al., 2022; Castillo-Arellano et al., 2023).

Figura 6: O CBD pode ativar, bloquear, inverter ou modificar a ação de certos receptores e enzimas que estão relacionados a doenças. Cada símbolo indica um tipo diferente de ação: * = modulador alostérico positivo (PAM) , # = agonista inverso, e & = modulador alostérico negativo (NAM).



Fonte: Castillo-Arellano et al., 2023.

O avanço do CBD na medicina foi impulsionado por histórias de sucesso no tratamento de epilepsia refratária, especialmente em crianças (Oshiro & Castro, 2022). Isso levou à aprovação do primeiro medicamento à base de CBD nos Estados Unidos, o Epidiolex, em 2018, para o tratamento de duas formas raras de epilepsia (Abu-Sawwa et al., 2020). À medida que a pesquisa continua a desvendar os benefícios potenciais do CBD, seu papel na medicina e na saúde humana continua a se expandir, gerando um interesse crescente em seu uso terapêutico e suas aplicações médicas.

O THC é o principal composto psicoativo da Cannabis, responsável pelos efeitos alucinógenos e eufóricos associados ao uso da planta. Possui afinidade pelos receptores de canabinoides no cérebro e no sistema nervoso central, ativando-os e provocando uma série de respostas fisiológicas e psicoativas. Em 1964, os cientistas israelenses Raphael Mechoulam e Yechiel Gaoni foram os primeiros a isolar e identificar a estrutura química do THC (Appendino, 2020). Eles

conseguiram sintetizar e determinar a estrutura do composto, marcando um progresso significativo na compreensão dos componentes ativos da Cannabis.

A existência dos receptores canabinoides no cérebro de ratos foi revelada em 1988 por uma equipe de pesquisadores liderada por Allyn Howlett na Escola de Medicina de St. Louis (Haney & Hill, 2018). Essa descoberta mostrou que o THC e outras substâncias da Cannabis atuam nesses receptores, provocando diferentes efeitos. Desde então, vários estudos exploraram os possíveis benefícios terapêuticos do THC e da Cannabis. Além do efeito psicoativo, o THC demonstrou ter ações analgésicas, antieméticas e estimulantes do apetite, sendo usado para aliviar os sintomas de pacientes com câncer e AIDS, entre outras doenças (Elikkottil et al., 2009). Há também evidências que o THC pode agir como antioxidante, combatendo os radicais livres que causam danos ao organismo; podendo prevenir a oxidação das células, diminuir a inflamação e regular o sistema antioxidante do corpo (Raja et al., 2020).

O movimento pela legalização da Cannabis para uso medicinal e recreativo se expandiu em diversas regiões do mundo desde o final do século XX até o século XXI. Isso estimulou um crescimento na investigação científica sobre os efeitos do THC e da Cannabis, bem como um maior conhecimento de seus benefícios e riscos potenciais. A pesquisa sobre o THC e seus efeitos continua em desenvolvimento. Com a legalização da Cannabis em mais países, os cientistas estão examinando suas utilidades médicas, modos de ação e possíveis efeitos adversos (Pacula & Smart, 2017).

Outros marcos importantes no estudo das propriedades da Cannabis ocorreram na segunda metade do século 20, sendo um dos mais importantes, a descoberta do Sistema Endocanabinoide, que ocorreu na década de 1980. Essa descoberta foi importante para entender como a bioquímica da Cannabis age na fisiologia humana. De forma simplificada, o Sistema Endocanabinoide é um sistema de comunicação celular, que executa muitos processos fisiológicos. Esse sistema é composto por três componentes principais: os canabinoides endógenos (endocanabinoides), que são moléculas lipídicas que são produzidas pelo próprio organismo, os receptores de canabinoides e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinoides. Estudos indicam que ele está ligado à

memória, apetite, metabolismo, imunidade, função gastrointestinal, movimento e inflamação. O Sistema Endocanabinoide desempenha um papel crucial na regulação de uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a modulação da dor, do humor, do apetite, do sono, da memória, da resposta imune, do controle motor, do estresse e da reprodução. Ele atua como um sistema de retroalimentação, ajudando a manter a homeostase e o equilíbrio interno do organismo. O Sistema Endocanabinoide é composto por receptores ligados à Proteína G (GPCRs) e possui alguns subtipos descritos, como o CB1 e o CB2 (Gontiès, 2003; Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

Os receptores do tipo CB1 são quantitativamente mais representativos, e seus efeitos estão principalmente ligados ao sistema nervoso central, especialmente nas áreas associadas à regulação da memória, emoção, coordenação motora, apetite e percepção da dor, ao sistema gastrointestinal, tecidos dos músculos esqueléticos, fígado, nos adipócitos, sistema nervoso periférico, sistema cardiovascular e os tecidos imunes, além de serem associados às condições psicoativas provocadas pela planta. Já os receptores do tipo CB2 estão relacionados com funções no sistema imunológico, presentes na medula óssea, amígdalas, baço, timo e no sistema nervoso entérico. Nas condições fisiológicas adequadas, esses receptores nos humanos são estimulados por dois endocanabinoides conhecidos, Anandamida (AEA) e 2-Araquidonoilglicerol (2-AG). Esses compostos são sintetizados sob demanda em resposta a estímulos fisiológicos e atuam como mensageiros químicos, ligando-se aos receptores de canabinoides. Os endocanabinoides são produzidos localmente em resposta a estímulos fisiológicos e são liberados nas sinapses neuronais, onde atuam como mensageiros químicos. Eles são rapidamente degradados pelas enzimas MAGL (Mono Acil Glicerol Lipase) e FAAH (Amida Hidrolase dos Ácidos Graxos), para evitar uma ativação prolongada dos receptores de canabinoides (Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

O mecanismo de ação relativo ao estímulo do CB1 é melhor entendido, devido ao maior número de pesquisas que abrangem esse tipo de receptor. Quando os endocanabinoides se ligam aos receptores CB1, eles ativam uma cascata de sinalização, que culmina na liberação de neurotransmissores. Em relação ao mecanismo de ação dos fitocanabinoides, é apontado que os mesmos possuem a

capacidade de regular a intensidade pré-sináptica do cálcio (Ca^{2+}), reduzindo assim a liberação de neurotransmissores, que em muitas patologias estão sendo liberados de forma intensa quando comparado com padrões não patológicos, desta forma, os fitocanabinoides atuam na manutenção da homeostase em diversas condições patológicas e fisiológicas (Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

O Sistema Endocanabinoide desempenha um papel essencial na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos no organismo. Os endocanabinoides, os receptores de canabinoides e as enzimas relacionadas trabalham em conjunto para modular a função celular e manter a homeostase. A compreensão desse sistema complexo tem implicações significativas para a compreensão da fisiologia humana e pode fornecer *insights* importantes para o desenvolvimento de terapias e tratamentos médicos baseados em canabinoides (Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

Com um maior entendimento sobre o Sistema Endocanabinoide, grandes possibilidades no uso da Cannabis no tratamento de diversas condições, tais como na dor neuropática, câncer, Esclerose Múltipla, Doença de Parkinson, Autismo e Epilepsia estão sendo consideradas. Muitos especialistas nessas condições apontam que os derivados da *C. sativa* podem ser a última alternativa conhecida para muitos pacientes que não encontraram resultados significativos utilizando métodos mais tradicionais. Por isso, diversas pessoas ao redor do mundo estão criando iniciativas que visam divulgar os benefícios dessa espécie, buscando diminuir a burocracia de acesso. No Brasil, esse movimento vem ganhando força nos últimos 10 anos, onde foram obtidos resultados importantes: o uso compassivo do CBD foi autorizado pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) para o tratamento de epilepsias em crianças e adolescentes; em 2015, a Anvisa retirou o CBD da lista de substâncias proibidas, incluindo-o na lista C1 da Portaria 344/98, se tornando uma substância controlada; e em 2016, a ANVISA liberou a importação e prescrição médica do THC e o CBD para uso intrínseco e terapêutico, promovendo assim, a possibilidade para o início do estabelecimento de um mercado mais acessível de produtos que contenham essas substâncias (Honório & Arroio, 2005; Nascimento & Dalcin, 2019).

2.4 Toxicologia de Produtos Naturais

2.4.1 Aspectos gerais e históricos

A toxicologia de produtos naturais tem uma longa história, que remonta aos séculos passados, quando os seres humanos começaram a explorar as propriedades medicinais e tóxicas de plantas e outros materiais naturais (Schoental, 1965). O homem primitivo, durante suas explorações e na busca por alimentos, teria observado diferentes propriedades de diversos produtos naturais, ou seja, derivados de plantas, animais, fungos, bactérias, arqueas e dos minerais, e, passaram a utilizá-los em benefício próprio ou do grupo. O uso de substâncias tóxicas foi uma grande revolução no modo de vida dos humanos, pois elas facilitavam a caça e podiam ser usadas para a defesa contra inimigos. Pesquisas arqueológicas apontam que a exploração dos venenos naturais e a produção de flechas, iniciado durante a era mesolítica, foi algo que ocorreu em todas as partes do mundo (com a possível exceção da Austrália e da Nova Zelândia) (Pappas et al., 1999; Watson & Wexler, 2009).

A toxicologia se consolidou como uma ciência formal e organizada no final do século XIX, quando houve um grande crescimento da industrialização e do emprego de substâncias químicas sintéticas na fabricação de medicamentos, alimentos, produtos de consumo e outros produtos (Tompá & Balázs, 2018). Isso gerou uma maior preocupação com os efeitos tóxicos dessas substâncias na saúde humana e no meio ambiente. Paralelamente, o interesse em produtos naturais, como plantas medicinais e substâncias derivadas de animais, também se manteve (Van-Doren, 1996).

A toxicologia de produtos naturais emergiu como uma área de estudo específica nesse cenário. Os cientistas e pesquisadores exploraram os efeitos tóxicos e benéficos de produtos naturais, buscando elucidar sua composição química, mecanismos de ação e potenciais riscos à saúde (Atanasov et al., 2021). As pesquisas nesse campo foram influenciadas por várias áreas do conhecimento científico, como a farmacologia, a química analítica, a botânica e a zoologia. Com o aprimoramento da tecnologia e das técnicas analíticas, os pesquisadores puderam determinar e caracterizar os componentes químicos presentes nos produtos

naturais, possibilitando uma compreensão mais ampla de seus efeitos biológicos (Ciesla & Moaddel, 2016; Atanasov et al., 2021).

A toxicologia de produtos naturais seguiu se desenvolvendo e se diversificando ao longo do século XX, estimulada por avanços tecnológicos e pela necessidade de compreender os efeitos tóxicos e benéficos dos produtos naturais. Novos campos de pesquisa se estabeleceram, como a toxicologia de alimentos, a toxicologia de plantas medicinais, a toxicologia de produtos naturais marinhos, entre outros (Omaye, 2004; Farzaei et al. 2020; Kumar & Sharma, 2021). Os avanços tecnológicos possibilitaram uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade e dos efeitos adversos dos produtos naturais, bem como o desenvolvimento de métodos de análise mais acurados.

A toxicologia de produtos naturais também tem contribuído para a descoberta de novos medicamentos. Muitos medicamentos que estão no mercado atualmente são originados de produtos naturais ou foram baseados em substâncias encontradas na natureza. A toxicologia tem um papel fundamental nesse processo, avaliando a segurança e eficácia desses compostos para uso humano, sendo essenciais para garantir a segurança e a proteção da saúde pública (Thomford et al., 2018).

2.4.2 Importância dos ensaios toxicológicos utilizando células humanas

Os ensaios toxicológicos com células humanas são essenciais, pois permitem uma avaliação direta dos efeitos nos alvos finais das exposições tóxicas. Isso é especialmente relevante na fase inicial de triagem de compostos, ajudando a priorizar substâncias para testes posteriores em modelos animais e estudos clínicos (Carias et al., 2014). Os ensaios com células humanas podem fornecer informações sobre os efeitos tóxicos em tecidos e órgãos específicos do corpo humano (Amorim, 2003). Células sanguíneas, como os eritrócitos, são um sistema modelo útil para avaliar o potencial de toxicidade em órgãos vitais, como o fígado, rins e sistema cardiovascular (Podsiedlik et al., 2020).

Os ensaios utilizando células humanas permitem a investigação dos mecanismos de toxicidade em nível celular. Eles ajudam a descobrir como as

substâncias tóxicas interferem nos processos celulares normais, como a integridade da membrana celular, a função mitocondrial, o estresse oxidativo, a apoptose e outros eventos celulares críticos (Parboosing et al., 2016). Isso pode contribuir para o entendimento dos mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos e ajudar no desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento. Eles contribuem para a redução do uso de animais em testes toxicológicos. Eles podem fornecer dados relevantes e complementares aos estudos em animais, permitindo a avaliação preliminar de substâncias tóxicas sem a necessidade de experimentação em animais vivos (Carias et al., 2014; Parboosing et al., 2016). Isso está de acordo com os princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição) na pesquisa animal (Macarthur, 2018).

A capacidade das substâncias em causar danos às células sanguíneas pode ser indicada pelos ensaios de hemólise e fragilidade osmótica (Oh et al., 2020). A hemólise é a ruptura das células vermelhas do sangue, enquanto a fragilidade osmótica é a resistência das células à variação na pressão osmótica. A toxicidade das substâncias testadas e a possibilidade de danos celulares podem ser sugeridas pela detecção de hemólise ou aumento da fragilidade osmótica. Quando as substâncias têm um efeito citotóxico nos eritrócitos, isso pode indicar sua toxicidade potencial em outras células do organismo (Greco et al., 2020).

Os ensaios de hemólise e fragilidade osmótica podem auxiliar na identificação dos mecanismos pelos quais as substâncias afetam as células sanguíneas. Por exemplo, a hemólise pode ser provocada pela perturbação da membrana celular dos eritrócitos ou pela indução de estresse oxidativo (Tabbara, 1992). Esses ensaios podem fornecer evidências sobre os possíveis mecanismos de toxicidade das substâncias. Eles também são úteis para comparar a toxicidade de diferentes produtos naturais. Eles podem ser usados para determinar se certos produtos têm um maior potencial de causar danos às células sanguíneas do que outros (Marques-Garcia, 2020). Essa informação é valiosa na seleção de produtos mais seguros e na identificação de substâncias que devem ser evitadas ou usadas com cautela. Esses ensaios são essenciais para garantir a proteção da saúde humana e orientar o uso seguro de produtos naturais.

Nos últimos anos, houve um crescimento significativo no número de estudos científicos que tratam da questão toxicológica da *Cannabis sativa* e seus produtos

derivados. Com o aumento do interesse na legalização do uso medicinal e recreativo da Cannabis em várias partes do mundo, a pesquisa toxicológica sobre essa planta tem se ampliado para avaliar os possíveis efeitos nocivos à saúde, bem como os riscos relacionados ao seu consumo (Schep et al., 2020). A *C. sativa* possui uma grande variedade de compostos químicos, incluindo canabinoides, terpenos e flavonoides, que podem ter efeitos terapêuticos e recreativos (Rock & Parker, 2021). No entanto, também é importante compreender os possíveis efeitos negativos e riscos à saúde associados ao uso desses produtos. Esses estudos são realizados em diferentes fases, desde pesquisas em laboratório até estudos clínicos e epidemiológicos.

Em laboratório, os pesquisadores realizaram estudos para compreender os efeitos dos compostos presentes na Cannabis em nível celular e molecular (Martinenghi et al., 2020). Esses estudos analisaram os mecanismos de ação dos canabinoides e outros componentes, avaliaram a citotoxicidade em diferentes tipos de células (Martinenghi et al., 2020) e determinaram a toxicidade aguda e crônica em modelos animais (Rosenkrantz & Hayden, 1979; Schuel et al., 1987; Garberg et al., 2017). Isso ajuda a reconhecer possíveis efeitos tóxicos e a compreender como os produtos derivados da Cannabis podem interagir com o organismo.

Essas avaliações toxicológicas indicam que a toxicidade da planta é relativamente baixa em comparação com muitas outras substâncias. No entanto, é importante ressaltar que a toxicidade pode variar dependendo de vários fatores, como a dose, a via de administração, a composição química do produto e a sensibilidade individual. Em relação ao THC, estudos mostram que doses elevadas podem estar relacionadas a efeitos adversos, como ansiedade, paranoia, alterações cognitivas e psicose transitória. No entanto, é importante ressaltar que esses efeitos são mais frequentemente observados em doses muito acima das normalmente encontradas no consumo recreativo ou medicinal (Lampron et al., 2023).

Já o CBD, tem sido amplamente estudado por suas propriedades terapêuticas e parece ter uma baixa toxicidade. Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que o CBD é bem tolerado em doses elevadas, sem causar efeitos psicoativos significativos. No entanto, é importante notar que o CBD pode interagir

com outros medicamentos, portanto, é importante avaliar todos os cenários possíveis de vias de danos (Dawidowicz et al., 2023) .

2.5 Potencial antimicrobiano de produtos à base de plantas

As infecções bacterianas podiam ser tratadas de forma eficaz com antibióticos, que revolucionaram a medicina. Porém, a resistência antimicrobiana criou uma crise global que limita a eficácia dos antibióticos. Desde tempos antigos, civilizações antigas, como a egípcia, grega e chinesa já reconheciam o poder antimicrobiano de plantas e usavam extratos e preparações vegetais para curar infecções e doenças. Antes do século XX, sem antibióticos sintéticos, as pessoas buscavam na natureza o tratamento para as infecções (Cowan, 1999). Com a descoberta dos antibióticos, os compostos sintéticos ganharam mais atenção, e o uso de produtos à base de plantas diminuiu. Porém, nas últimas décadas, a resistência antimicrobiana e a busca por novas alternativas terapêuticas têm despertado o interesse nas propriedades antimicrobianas das plantas (Nawrot et al., 2014).

Muitas plantas têm moléculas com atividade antimicrobiana, e algumas delas têm sido estudadas pela ciência para verificar sua eficácia e como agem. Os alcaloides são compostos com nitrogênio que ocorrem em várias plantas, e muitos têm atividade antimicrobiana (Mittal & Jaitak, 2019). Por exemplo, a berberina é um alcaloide que existe em plantas como a *Berberis vulgaris* e tem atividade contra vários tipos de bactérias, fungos e parasitas (Wang et al., 2017). Os flavonoides são uma classe de compostos que estão presentes em muitas plantas e têm várias propriedades bioativas, incluindo atividade antimicrobiana (Cushnie & Lamb, 2005). A quercetina, um flavonoide que está em alimentos como cebola e maçãs, também mostrou atividade contra vários microrganismos gram-positivos (Nguyen & Bhattacharya, 2022). Os terpenos são compostos que evaporam facilmente e estão em muitas plantas e têm diversas atividades biológicas. Por exemplo, o timol é um terpeno que está no tomilho e no orégano e tem atividade antimicrobiana contra várias bactérias e fungos (Lee et al., 2020).

As moléculas com propriedades antimicrobianas podem atuar de diferentes formas. Muitas moléculas antimicrobianas têm a habilidade de atrapalhar a formação da parede celular de bactérias, causando fragilidade e rompimento da célula. Algumas moléculas antimicrobianas podem agir impedindo a formação de proteínas essenciais para o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Certas moléculas antimicrobianas podem provocar estragos na membrana celular dos microrganismos, levando à perda de integridade e saída de componentes celulares. Algumas moléculas antimicrobianas têm como alvo enzimas específicas necessárias para as atividades metabólicas dos microrganismos, bloqueando seu funcionamento adequado (Madigan et al., 2016).

As plantas podem oferecer uma alternativa mais integrada para o tratamento de infecções, pois muitas delas apresentam diversas propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomoduladora, como exemplo disso, temos a *C. sativa*. Porém, é essencial destacar que a eficácia e a segurança dos produtos à base de plantas devem ser rigorosamente testadas por meio de estudos científicos e ensaios clínicos. Além disso, a padronização da composição dos produtos à base de plantas e o desenvolvimento de formulações adequadas são aspectos importantes para garantir a qualidade e a eficácia (Lam et al., 2023).

A *Cannabis sativa* possui derivados que podem atuar como agentes antimicrobianos. Um dos primeiros trabalhos com essa perspectiva foi feito por Turner & Elsohly (1981), que avaliaram o potencial do canabinoide Canabicromeno (CBC) e de alguns de seus homólogos e isômeros como agentes antimicrobianos usando bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos semelhantes a leveduras e filamentosos e um dermatófito. O resultado apresentado foi promissor, pois, foi verificado que a ação antibacteriana se apresentou forte para todos os grupos; e a atividade antifúngica foi classificada como leve a moderada (Turner & Elsohly, 1981).

Um outro caminho interessante são os estudos utilizando óleos essenciais derivados da espécie. Essas avaliações vêm consolidando a *Cannabis sativa* como uma alternativa viável no tratamento de infecções microbianas, tanto em humanos, quanto em outras espécies, incluindo as plantas, sendo possíveis alternativas para o setor agrícola no contexto do controle de pragas. Utilizando óleos essenciais

extraídos de variedades legais da planta, Nissen & colaboradores (2010), realizaram a avaliação da inibição do crescimento microbiano através do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Neste trabalho foram utilizadas uma ampla gama de patógenos, subdivididos em três grupos: bactérias gram-positivas (utilizou-se espécies de bactérias patogênicas transportadas por alimentos ou gastrointestinais); bactérias gram-negativas que estão envolvidas em interações com vegetais; e leveduras, também envolvidas em interações com vegetais. Os resultados mostraram um importante potencial, pois os óleos essenciais de cânhamo industrial mostraram-se capazes de promover a inibição significativa do crescimento bacteriano e fúngico. Assim, tornam-se candidatos promissores para aplicações no controle de microrganismos que promovem doenças em espécies vegetais alimentícias e em humanos (Nissen et al., 2010).

Outro exemplo foi uma pesquisa recente utilizando óleos essenciais ricos em terpenos voláteis que demonstraram um desempenho positivo para a atividade antimicrobiana, principalmente para cepas gram-positivas. As avaliações foram feitas utilizando microrganismos patogênicos isolados de ambientes de processamento de alimentos. Os efeitos inibitórios dos óleos essenciais foram avaliados tanto pelo ensaio de difusão de poço em ágar, quanto pela avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Resultando em dados que colaboram para a criação de um arcabouço favorável a utilização de derivados da *C. sativa* como agente antimicrobiano (Iseppi et al., 2019).

As aplicações da *C. sativa* não se restringem apenas ao mundo celular (eucariotos e procariotos), elas se ramificam para o mundo de um dos grupos mais fascinantes da biologia, os vírus. Essa classe de sistemas biológicos foram descobertos através do aperfeiçoamento da microscopia que ocorreu durante o século XX. Evolutivamente, representam um desafio filogenético e são considerados responsáveis pela promoção de uma rede biológica de relação e interação genética, derivada da transferência horizontal de genes. Porém, para grande parte da população mundial, os vírus são seres apenas promotores de malefícios para os seres humanos. Sendo, a pandemia provocada pela Covid-19 um exemplo fortalecedor dessa imagem. Nesse cenário, a busca por alternativas antivirais se tornaram pautas para grupos de pesquisa espalhados por todo o globo. Dentre os diversos trabalhos nessa perspectiva, alguns avaliaram o potencial dos subprodutos

da Cannabis como alternativas para o controle do táxon SARS-CoV-2. Utilizando técnicas *in silico* e *in vitro* foi estimado a atividade antiviral dos canabinoides contra o coronavírus humano SARS-CoV-2 através da ligação dos canabinoides em sítios de ligação de enzimas que têm um papel fundamental na replicação e transcrição viral; assim, as descobertas sugerem que o CBD e o THC são possíveis drogas contra o coronavírus humano que podem ser usadas em combinação ou com outras moléculas de drogas para tratar pacientes (Mahmud et al., 2021; Raj et al., 2021).

Produtos à base de plantas com atividade antimicrobiana apresentam uma alternativa promissora para o tratamento de infecções, especialmente em face do desafio crescente da resistência antimicrobiana. A descoberta e a caracterização de moléculas com atividade antimicrobiana, bem como o entendimento de seus mecanismos de ação, podem auxiliar no desenvolvimento de terapias mais eficazes e sustentáveis (Nawrot et al., 2014). Porém, são necessárias mais pesquisas para explorar totalmente o potencial desses produtos e assegurar sua segurança e eficácia .

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Analisar aspectos toxicológicos e microbiológicos (*in vitro*) dos canabinoides Canabidiol (CBD) e Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) derivados da *Cannabis sativa*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade sobre eritrócitos humanos oriundos de sangue dos tipos A, B e O utilizando o Modelo de Hemólise.
- Avaliar a capacidade de proteção dos canabinoides CBD e THC contra o estresse osmótico, através do Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária.
- Investigar o perfil oxidante e antioxidante dos óleos derivados da *C. sativa* frente a eritrócitos humanos na presença do agente oxidante Fenilhidrazina.
- Avaliar a atividade antibacteriana através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente às linhagens bacterianas gram-positivas e gram-negativas de importância clínica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Óleos derivados da *Cannabis sativa*

As amostras dos óleos derivados da *C. sativa* foram obtidas através da colaboração com a Dra. Micheline Freire Donato, sob o termo de cooperação 02/2020. Ao total, foram analisadas 3 composições com diferentes teores de CBD e THC, mostradas na TABELA 2 abaixo:

Tabela 2. Composição das amostras dos óleos derivados da *C. sativa*

AMOSTRAS	NOME	COMPOSIÇÃO	VEÍCULO
Óleo 1	CBD CLÁSSICO 20mg/ml	CBD: 20mg / THC: < 0,2%	Óleo de milho: QSP
Óleo 2	THC CLÁSSICO 15mg/ml	THC: 15mg / CBD: < 1%	Óleo de milho: QSP
Óleo 3	CBD/THC CLÁSSICO	THC: 15mg / CBD: 15mg	Óleo de milho: QSP

4.2 Preparação das amostras dos óleos de CBD e THC para os ensaios

Para a obtenção das concentrações utilizadas nos ensaios, os óleos foram solubilizados usando DMSO 5% (SIGMA), Twen 80 (1%) e água destilada.

4.3 Eritrócitos Humanos

Os eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A-, B+ e O+, utilizados nesta pesquisa, foram provenientes de bolsas de descartes disponibilizadas pela Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. Que foram manipuladas e descartadas de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade.

4.4 Avaliação do potencial hemolítico dos óleos derivados da *C. sativa* em eritrócitos humanos

Para avaliar a capacidade hemolítica dos óleos ricos em CBD e THC utilizou-se concentrados de eritrócitos humanos dos tipos A-, B+ e O+. A primeira etapa foi a lavagem: as células foram misturadas com uma solução de NaCl 0,9% e centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos; posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos ressuspensos em NaCl 0,9% (este procedimento foi repetido por 3 vezes).

Após a realização da lavagem, foi realizada a preparação de suspensões de hemácias a 0,5% em NaCl 0,9%; que foram distribuídas em *ependorfs* e feita a adição das concentrações (50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL) de CBD e THC. Como controle negativo foram utilizadas amostras das suspensões dos eritrócitos a 0,5% preparadas com NaCl a 0,9%, que foram consideradas geradoras de 0% de hemólise. O controle positivo foi feito por amostras das suspensões de eritrócitos submetidas à ação de um agente comprovadamente hemolítico, o Triton X-100 (50 µl/mL), onde foi considerado 100% de hemólise.

As amostras foram incubadas por 1 hora sob agitação lenta e constante (80 rpm) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante retirado e a hemólise avaliada por espectrofotometria a 540 nm (Rangel et al., 1997). Todas as experiências foram realizadas em triplicata. As porcentagens de hemólise das concentrações de CBD e THC foram obtidas calculando a média das amostras e comparando com a média do controle positivo (consideramos 100% de hemólise).

4.5 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos óleos derivados da *Cannabis sativa*

Diferentes concentrações de CBD e THC (50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL) foram adicionadas em suspensões de eritrócitos a 0,5% em NaCl 0,9%, por 1 hora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após isso, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos

e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos, posteriormente, foram ressuspensos em solução hipotônica de cloreto de sódio (0,24%) e agitados a 80 rpm por 20 minutos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A hemólise foi quantificada por espectrofotometria em 540 nm. Como controle negativo foram utilizadas amostras das suspensões dos eritrócitos a 0,5% preparadas com NaCl a 0,9% (0% de hemólise); e uma solução de eritrócitos na presença de uma solução de cloreto de sódio a 0,24% foi usada como controle positivo (100% de hemólise). As experiências foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem (%) de hemólise em comparação com o grupo de controle positivo (Lira et al., 2018; Vasconcelos, 2015).

4.6 Ensaios de Atividade Oxidante e Antioxidante

4.6.1 Avaliação do potencial oxidante do CBD e THC sobre hemoglobinas humanas

Para a realização desse ensaio, o sangue do tipo O+ foi previamente lavado com NaCl a 0,9% (2 vezes), para a obtenção de um concentrado de eritrócitos. Em seguida, foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 33% em PBS (11,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36 g Na_2HPO_4 e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) e suplementado com glicose (200 mg/dL). Posteriormente, foi feita a adição de 50 μL de Triton X-100 (agente hemolítico) para a obtenção de um concentrado de hemoglobinas, que foi distribuído em *eppendorfs* e feita a adição das concentrações dos óleos (50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubados por 1 hora sob agitação lenta e constante (100 rpm) a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos.

Para a realização da leitura do potencial oxidante foram preparados tubos contendo 6 e 3 mL de tampão de leitura M60. Nos tubos de 6 mL foi adicionado 100 μL dos concentrados de hemoglobina incubados com as concentrações dos óleos e feita a homogeneização. Depois, foi retirado 300 μL da solução dos tubos de 6 mL e adicionados nos tubos de 3 mL. Amostras das duas diluições foram retiradas e lidas em espectrofotômetro: a 540 nm para detecção de hemoglobinas (amostras dos tubos de 3 mL) e a 630 nm para detecção de metemoglobina (amostras dos tubos de 6 mL). Como controle negativo utilizou-se amostras das diluições apenas do concentrado de hemoglobina; enquanto o controle positivo foi feito com as

hemoglobinas na presença da fenilhidrazina (PH), que é um agente com capacidade comprovada de provocar oxidação.

4.6.2 Avaliação do potencial antioxidante do CBD e THC na presença de Fenilhidrazina

Para realizar a avaliação da atividade antioxidante foi preparado um concentrado de hemoglobinas, utilizando uma suspensão de eritrócitos a 33% em PBS (11,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36 g Na_2HPO_4 e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) e suplementado com glicose (200 mg/dL) e feita a adição de 50 μL de Triton X-100. Com o concentrado de hemoglobinas pronto, foi realizada sua distribuição em *eppendorfs* para realizar a mistura com as concentrações dos canabinoides (50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/ml}$). As amostras foram incubadas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitadas a 100 rpm por 1 hora. Após a incubação, foi adicionado um agente oxidante, a Fenilhidrazina (PH) 1 mmol/L. As amostras foram mantidas sob agitação a 100 rpm por 30 minutos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente a isso, foram realizadas duas diluições para a realização das leituras.

Para preparar a primeira diluição, retirou-se 100 μL do conteúdo dos *eppendorfs* e transferiu-se para tubos contendo 6 mL de tampão de leitura M60; essa diluição foi lida no espectrofotômetro no comprimento de 630 nm. Para a segunda diluição usou-se 300 μL da primeira, que foram adicionados em 3 mL de tampão de leitura M60 e lidas por espectrofotometria a 540 nm. A porcentagem de MetHb formada nas amostras com as concentrações de CBD e THC foram comparadas com os valores obtidos nas amostras do controle positivo (hemoglobinas + Fenilhidrazina). Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como porcentagem de formação de metemoglobina, em função da hemoglobina-MetHb (% Hb).

4.7 Cepas Bacterianas

A avaliação da atividade antibacteriana foi feita utilizando 22 espécies de importância clínica (34 cepas), sendo 13 espécies Gram-positivas (17 cepas):

Bacillus clausii, *Bifidobacterium* + *Lactobacillus* (misturadas em uma única amostra), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* do grupo *viridans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pyogenes*, e *Streptococcus sanguinis*; e 9 espécies Gram-negativas (17 cepas): *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella anatum*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella boydii* e *Shigella flexneri*. A nomeação completa das cepas está nas TABELAS 3 e 4, na seção dos resultados.

4.8 Meio de cultura

O meio de cultura bacteriano utilizado foi o BHI (*Brain Heart Infusion*), composto por: extrato de levedura 10 g, triptona 5 g, NaCl 10 g para 1 L, que foi preparado de acordo com as especificações do fabricante e esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm por 1 hora.

4.9 Obtenção do Inóculo Bacteriano

Para o preparo do inóculo bacteriano, as linhagens bacterianas foram adicionadas em caldo de cultura BHI e, posteriormente, foi feita a incubação a 37°C por 24 horas. As culturas utilizadas nos testes foram ajustadas até o valor 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônias) (VASCONCELOS, 2015).

4.10 Avaliação do potencial antimicrobiano dos óleos ricos em CBD e THC

4.10.1 Triagem das cepas nas concentrações de 1.500, 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg

O primeiro passo para verificar o potencial antimicrobiano dos 3 óleos ricos em CBD e THC foi realizar uma triagem na concentração de 1.500 µg das substâncias. Para isso, em *eppendorfs* estéreis (1 hora de autoclavação a 121°C) foi

adicionado 90 µl do meio de cultura BHI, 150 µl da solução dos óleos (a concentração da solução mãe era de 10 mg/mL) e 10 µl dos inóculos microbianos (feito em triplicata para cada cepa). O controle de esterilidade do meio e da substância também foram feitos em triplicata. Posteriormente, os *eppendorfs* foram armazenados em estufa a 37° C por 12 horas. Depois do período de incubação foi feita a adição 10 µl de Resazurina em cada *eppendorfs*. A mudança de cor do indicador metabólico de azul (Resazurina) para vermelho (Resofurina), indica presença de células viáveis e, portanto, consideramos que não houve inibição do crescimento bacteriano. As cepas que apresentaram a coloração azulada foram plaqueadas em meio BHI sólido para verificar se a inibição era bacteriostática ou bactericida.

As cepas que tiveram o seu crescimento inibido na dose de 1.500 µg foram testadas nas doses de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg. Após o período de incubação (37°C por 12 horas) foi adicionada a resazurina e as cepas que apresentaram um perfil inibitório foram plaqueadas em meio BHI sólido para verificar se a inibição era bacteriostática ou bactericida. As cepas que apresentaram um perfil de inibição na dosagem de 1.100 µg foram selecionadas para o teste de microdiluição em placa, descrito por Eloff, 1998.

4.10.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após a triagem inicial foi feito o teste da Concentração Inibitória Mínima com as bactérias sensíveis, em placas de microdiluição de 96 poços (distribuídos em 8 linhas horizontais contendo 12 poços cada), fundo em U e estéril. Inicialmente, foi distribuído 90 µl de meio de cultura BHI nos poços selecionados e 100 µl das substâncias (1.000 µg) no primeiro poço da linha de cada cepa bacteriana, seguido de uma diluição da substância nos poços subsequentes (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg). Após a diluição, 10 µl dos inóculos bacterianos foram adicionados nos poços com as diferentes concentrações obtidas. As placas foram armazenadas em estufa à 37°C por 12 horas. Depois do período de incubação, foi feita a adição de 10 µL de uma solução 0,01% (p/v) de Resazurina sódica em todos os poços, e incubadas a 37°C por 1 hora para se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A mudança de cor do indicador metabólico de azul (resazurina) para

vermelho (resofurina), indicará presença de células viáveis e, portanto, consideramos que não houve inibição do crescimento bacteriano.

Controles utilizados:

- Meio BHI: Controle de esterilidade do meio;
- BHI + cepas bacterianas: Controle do crescimento bacteriano;
- BHI + veículo (DMSO 5% + twen 80 1% + H₂O) + cepas bacterianas: Controle de interferência do veículo sobre as cepas bacterianas;
- BHI + Óleos derivados da *C. sativa*: Controle da esterilidade do óleo.

4.10.3 Caracterização da atividade antibacteriana

Para caracterizar a atividade antibacteriana dos óleos como bactericida ou bacteriostática, foi retirado uma amostra com uma alça de 1 µl dos poços com as concentrações dos óleos que provocaram inibição do crescimento, e estes foram semeados em placas contendo meio BHI sólido e incubados a 37°C por 24 horas. A ausência de crescimento bacteriano indica ação bactericida, enquanto que a presença de crescimento bacteriano indica ação bacteriostática.

4.11 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como a porcentagem da média aritmética simples. Os dados foram analisados pelo teste t de *Student* utilizando o *Software* estatístico Minitab 19, disponível em: <https://www.minitab.com/pt-br/>. O nível de significância de 5% foi adotado para comparar dados de um mesmo experimento. Assim, adotamos como significantes as diferenças que geraram $p < 0,05$. E as representações gráficas e as tabelas foram feitas utilizando planilhas do Google Drive.

5. RESULTADOS

A presente pesquisa objetiva contribuir com os esforços científicos que buscam compreender de uma forma robusta as propriedades da *Cannabis sativa* L. no contexto farmacológico. Abaixo estão descritos e discutidos os resultados dos experimentos que visaram avaliar aspectos toxicológicos e as atividades antioxidantes, de proteção contra o estresse osmótico e antimicrobiana dos canabinoides CBD e THC. As pesquisas científicas são importantes agentes contra os preconceitos estruturados pelas sociedades humanas ao longo dos séculos e, são cruciais para buscar melhorias para o bem-estar humano e de toda a biosfera, com isso, os resultados aqui expostos buscam ser uma pequena fagulha importante no longo caminho que levará a iluminação para o uso seguro e legalizado dos compostos de uma espécie que tem se provado cada vez mais valiosa para a saúde humana.

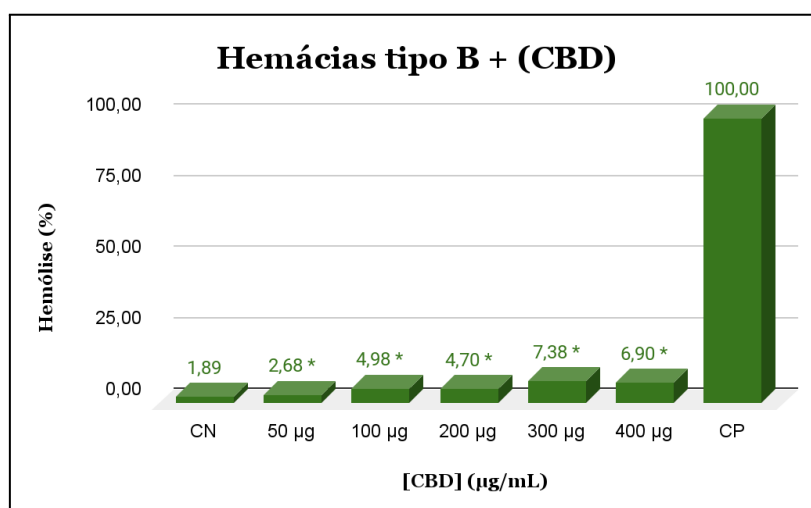
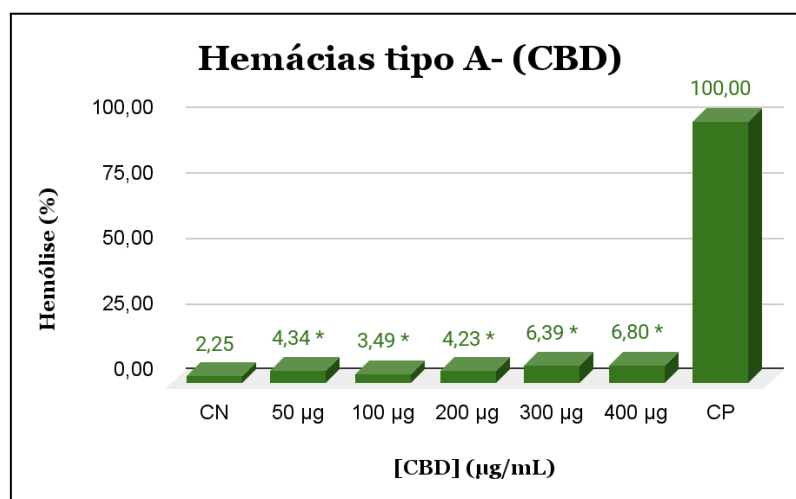
5.1 Avaliações Toxicológicas: Potencial hemolítico e oxidativo dos óleos ricos em CBD E THC

5.1.1 Avaliação do potencial hemolítico dos óleos ricos em CBD e THC

A avaliação toxicológica iniciou-se com a verificação do potencial hemolítico dos óleos ricos nos canabinoides CBD e THC, utilizando eritrócitos humanos dos tipos A-, B+ e O+. O teste foi feito com os três óleos (CBD, THC e CBD+THC) utilizando as concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL. E a quantificação da hemólise foi feita utilizando dados da presença de hemoglobinas, que são liberadas em abundância quando os glóbulos vermelhos são lisados e detectadas no comprimento de onda de 540 nm (Naoum et al., 2004). Sendo a espectrofotometria considerada o método mais preciso para medir a hemólise (Van Buren et al., 2020).

Como resultado, foi possível observar que os três óleos não promoveram ação hemolítica acima de 8% em todas as concentrações e nos três tipos sanguíneos, como demonstrado nas Figuras 7, 8 e 9. Esses dados apontam que a toxicidade promovida pelas moléculas CBD e THC é baixa em células sanguíneas humanas.

De forma específica, as amostras testadas com o CBD apresentaram porcentagens inferiores a 8% de hemoglobinas em comparação com o grupo controle positivo (100% de hemólise) em todas as concentrações testadas. Os maiores resultados foram obtidos nas concentrações de 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (6,39% e 6,80% no sangue A-; 7,38% e 6,90% no sangue B+; e 7,87% e 6,89% no sangue O+, respectivamente). Os valores de p calculados foram menores que 0,05, indicando que há uma pequena probabilidade de que as diferenças observadas entre os dados sejam ao acaso, assim, todas as concentrações foram significativamente diferentes do controle positivo (onde foi considerado promotor de 100% de hemólise) (FIGURA 7).



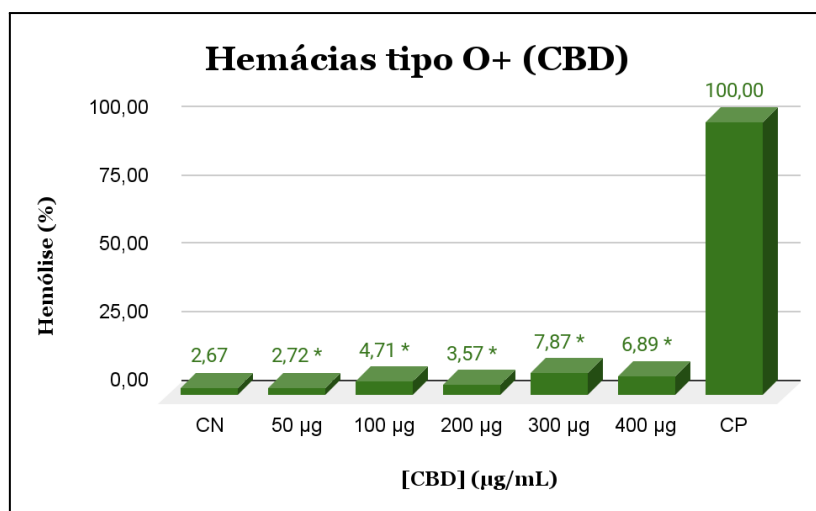


Figura 7: Porcentagem de hemólise induzida por óleo rico em CBD frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A- (a), B+ (b) e O+ (c). CN = suspensão de eritrócitos (controle negativo), CP = eritrócitos + Triton X-100 (controle positivo). Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t * $p < 0,05$ ($n=3$) (comparação com o controle positivo).

Os resultados do teste hemolítico utilizando o óleo rico em THC mostraram uma baixa toxicidade da molécula em eritrócitos humanos, como demonstrado na Figura 8. As porcentagens de hemoglobinas detectadas nas amostras dos três tipos sanguíneos foram baixas, não ultrapassando os 7% em todas as concentrações testadas; sendo esse resultado parecido com o encontrado nos testes com o CBD. Porém, uma diferença observada é que as porcentagens de hemoglobinas nas amostras tratadas com o THC não apresentam um padrão de aumento dependente da concentração, ou seja, em concentrações mais baixas foram encontrados alguns dos maiores valores da presença de hemoglobinas. Como exemplo, podemos perceber que no sangue A-, tratado com o THC, as maiores porcentagens de hemoglobina foram detectadas nas concentrações de 100 e 400 µg/mL (4,21% e 4,76%, respectivamente); no sangue B+, na concentração de 100 µg/mL a porcentagem de hemoglobina foi de 6,74% e em 400 µg/mL foi de 6,27%; e no sangue do tipo O-, os maiores valores foram nas concentrações de 50 µg/mL (6,73%) e na de 200 µg/mL (5,88%). Porém, mesmo com essas diferenças, assim como nos resultados com o CBD, todos os valores estão dentro da classificação de baixa toxicidade. Todas as concentrações foram significativamente diferentes do controle positivo (onde foi considerado promotor de 100% de hemólise).

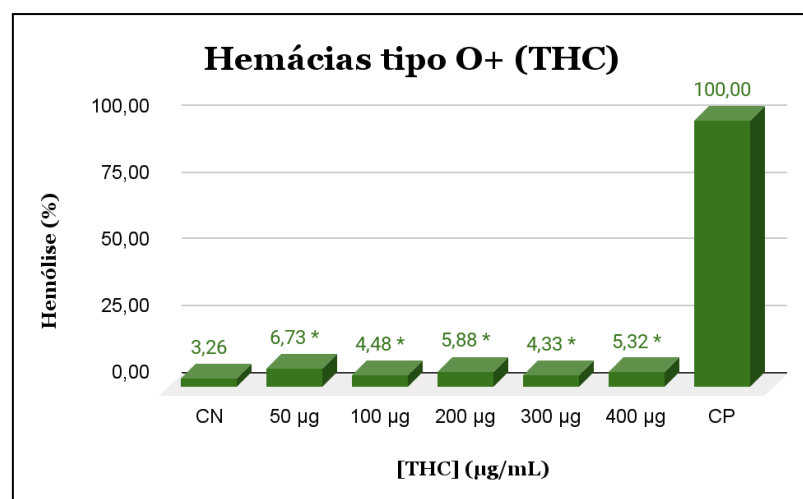
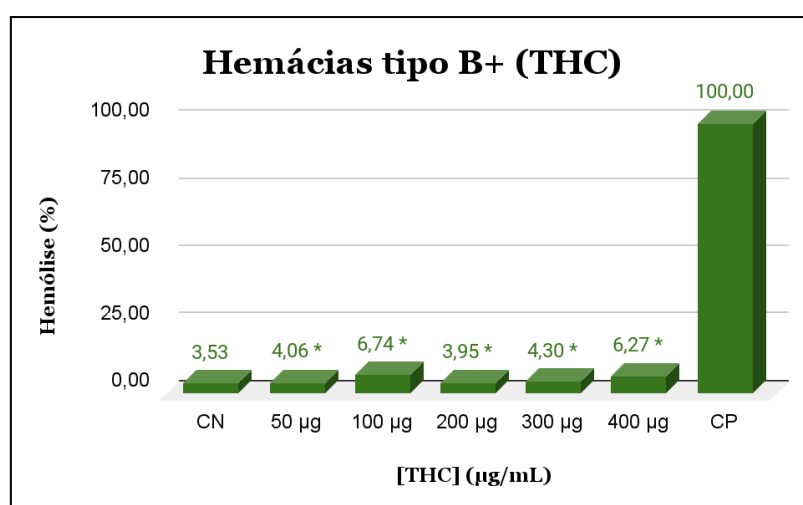
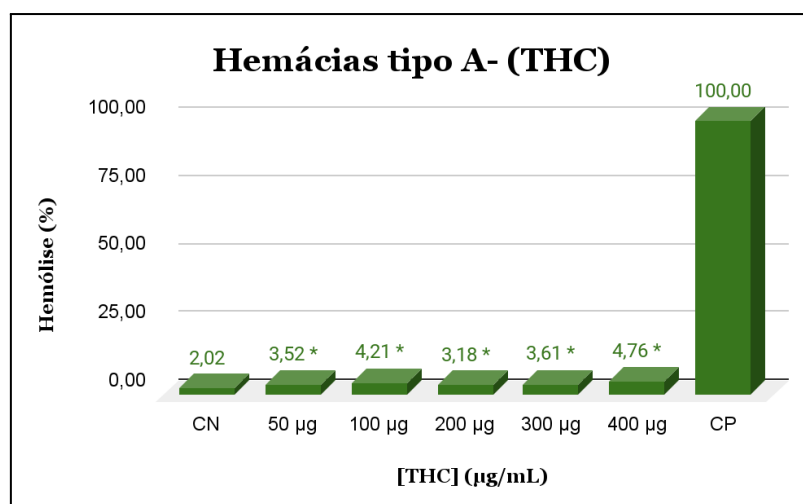
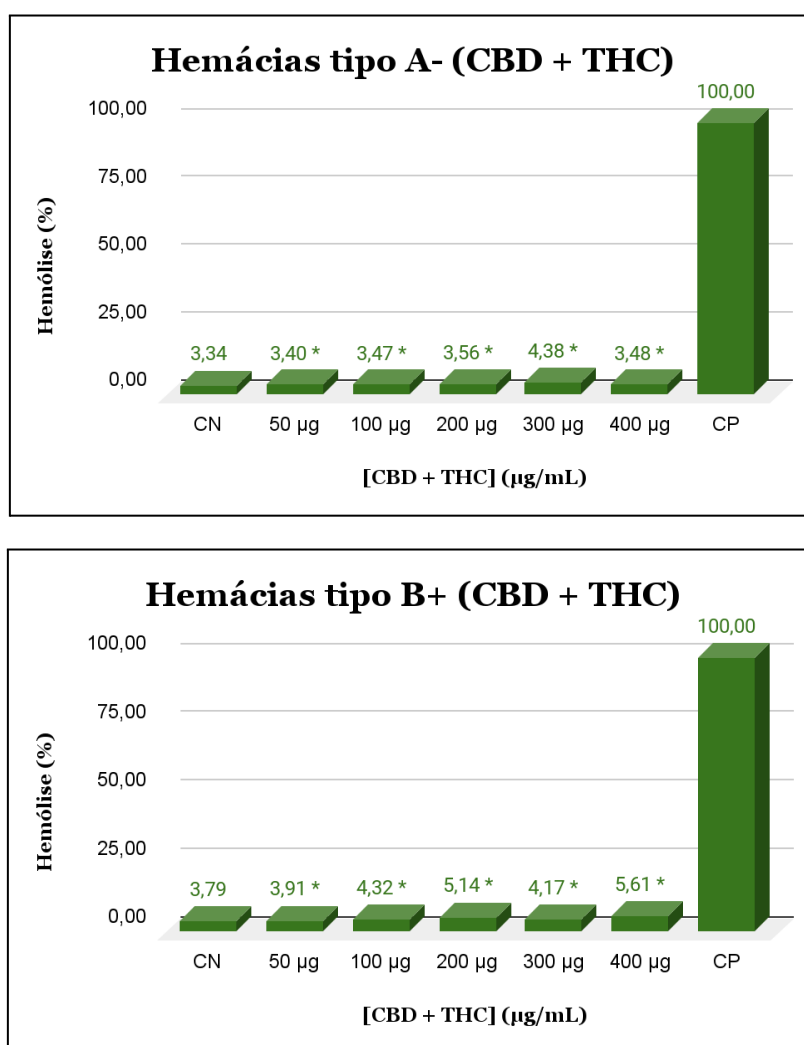


Figura 8: Porcentagem de hemólise induzida por óleo rico em THC frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A- (a), B+ (b) e O+ (c). CN = suspensão de eritrócitos (controle negativo), CP = eritrócitos + Triton X-100 (controle positivo). Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t * $p < 0,05$ ($n=3$) (comparação com o controle positivo).

O óleo contendo a mistura dos dois canabinoides, ao ser avaliado, mostrou-se com uma toxicidade inferior aos resultados obtidos com os óleos das substâncias separadas. Em quase todas as amostras, as porcentagens de hemoglobinas detectadas não ultrapassaram os 5%, sendo isso diferente apenas no sangue B+ nas concentrações de 200 µg/mL (5,14%) e 400 µg/mL (5,61%), FIGURA 9. Podendo ser um indício que a associação dos dois canabinoides diminui ainda mais a toxicidade de ambos, que já foi descrita, acima, como baixa. Todas as concentrações foram significativamente diferentes do controle positivo (onde foi considerado promotor de 100% de hemólise).



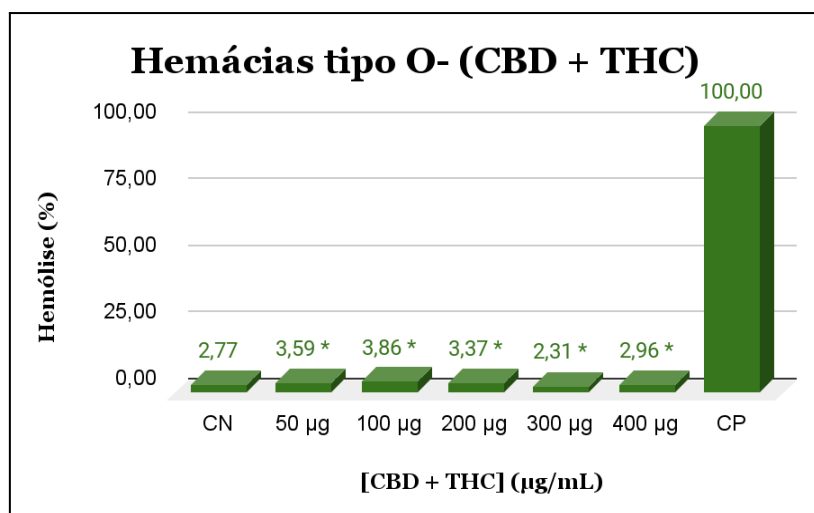


Figura 9: Porcentagem de hemólise induzida por óleo rico em CBD+THC frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A- (a), B+ (b) e O+ (c). CN = suspensão de eritrócitos (controle negativo), CP = eritrócitos + Triton X-100 (controle positivo). Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t * $p < 0,05$ ($n=3$) (comparação com o controle positivo).

5.1.2 Avaliação do potencial oxidante dos óleos ricos em CBD e THC

A segunda análise toxicológica feita foi a verificação do potencial oxidante dos três óleos (CBD, THC e CBD+THC), utilizando hemoglobinas humanas. Nesta avaliação, observamos que as quantidades de metemoglobina (MetHb) formada na presença do CBD, THC e CBD+THC não apresentaram diferenças estatisticamente significativas dos controles negativos (concentrado de hemoglobinas), porém, apresentaram diferenças significativa do controle positivo (concentrado de hemoglobina + fenilhidrazina), portanto, não foram capazes de promover níveis altos de oxidação da hemoglobina (FIGURA 10). Porém, nos gráficos abaixo, é possível perceber que o CBD apresentou valores menores de metemoglobina (3,5 a 4,7%) quando comparado ao THC (5,6 a 6,2%). Ao avaliarmos a ação das duas moléculas juntas podemos ver que não promoveu resultados muito diferentes, variando entre 3,9 a 4,8%. Um ponto importante é que os valores de metemoglobina tem uma tendência de aumentar conforme as concentrações das substâncias aumentam, porém, os valores obtidos nas diferentes concentrações não foram estatisticamente diferentes entre eles. Todas as concentrações foram significativamente diferentes do controle positivo (onde foi considerado promotor de 100% de formação de metemoglobina).

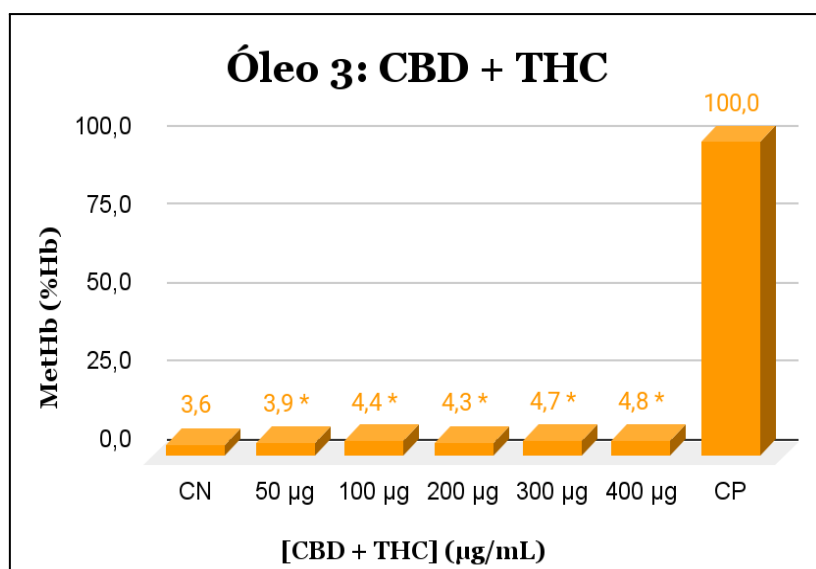
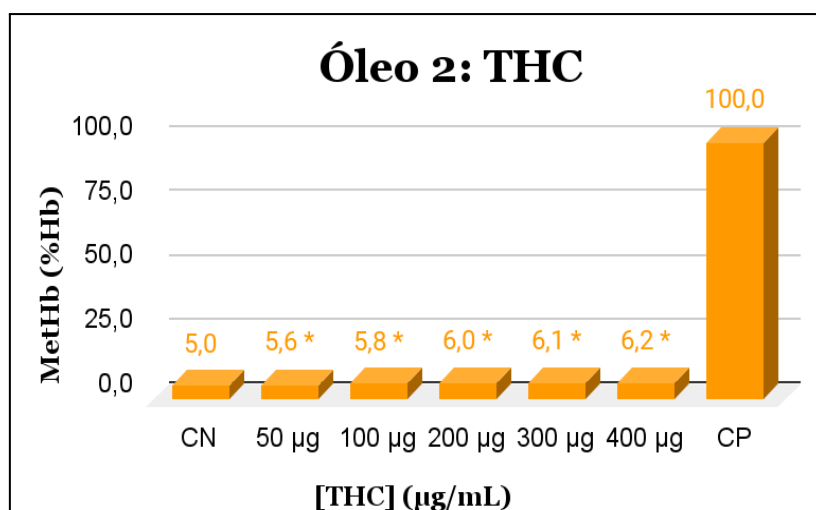
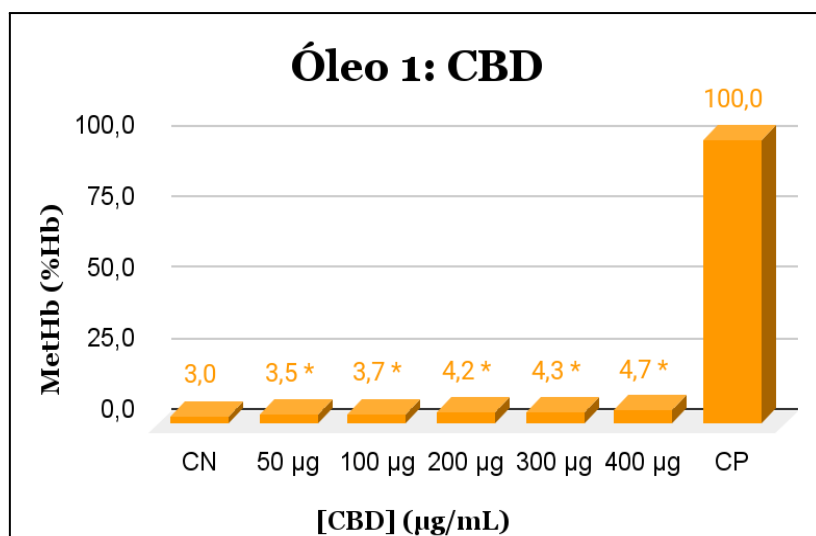


Figura 10: Efeitos oxidantes dos óleos ricos em CBD (a), THC (b) e CBD+THC (c) frente a hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t * $p < 0,05$ ($n=3$) (comparação com o controle positivo).

5.2 Propriedades Farmacológicas: Proteção contra o estresse osmótico, Potencial antioxidante e antimicrobiano dos óleos ricos em CBD e THC

5.2.1 Avaliação do potencial anti-hemolítico dos óleos ricos em CBD e THC

Devido ao baixo potencial hemolítico das moléculas, descrito anteriormente, no contexto do presente trabalho, o Teste de Fragilidade Osmótica foi utilizado para avaliar se os canabinoides CBD e THC promovem alguma proteção contra a hemólise em células vermelhas fragilizadas por solução hipotônica. A primeira molécula avaliada foi o CBD, e como resultado, foi possível observar que em comparação com o controle positivo (100% de hemólise), todas as concentrações promoveram uma diminuição nas porcentagens de lise das hemácias dos tipos A-, B+ e O+. Os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 300 e 400 µg/mL e nos sangues A- e B+; nesses tipos sanguíneos a proteção das hemácias variaram de 8% a 15% (FIGURA 11 (a e b)). Já no sangue do tipo O+, nenhuma concentração foi capaz de proteger mais que 4,29% das hemácias (FIGURA 11. (c)). Porém, não houve diferenças estatisticamente significativas do controle positivo (considerado promotor de 100% de hemólise).

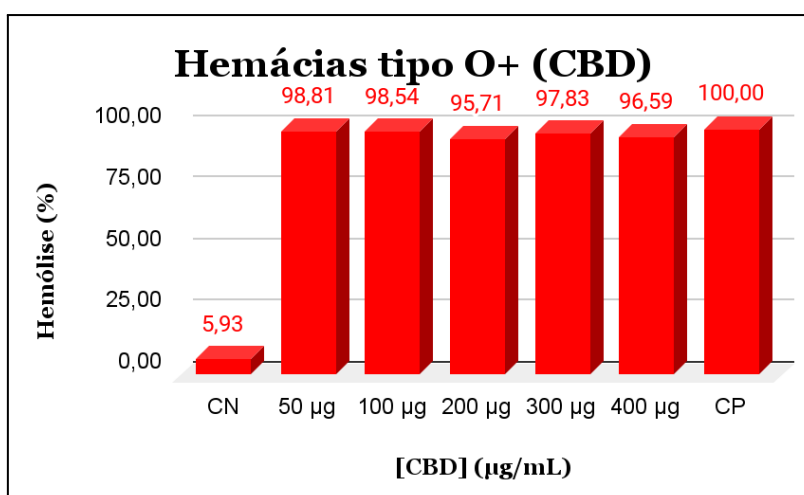
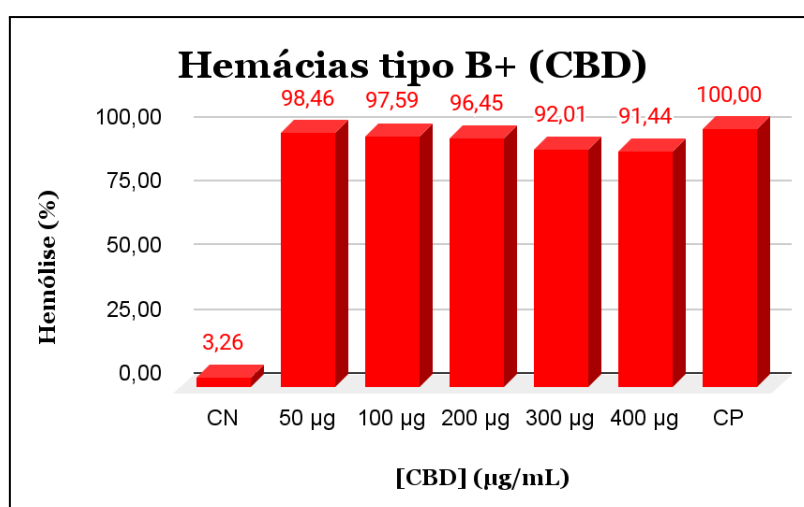
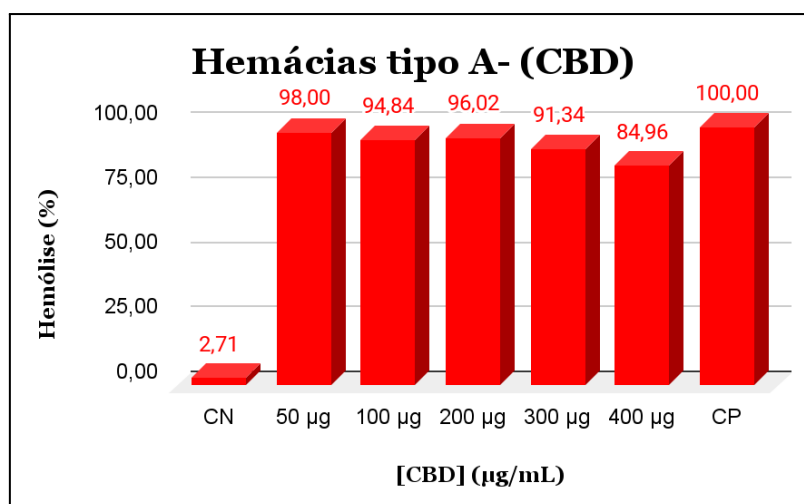
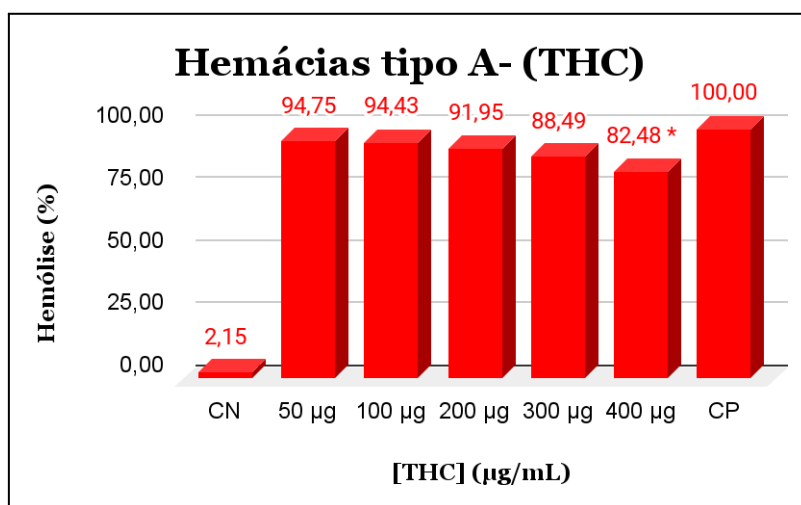


Figura 11: Proteção do CBD contra o estresse osmótico em eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A- (a), B+ (b) e O+ (c). CN = eritrócitos em NaCl 0,9% (controle negativo), CP = eritrócitos em NaCl 0,24% (controle positivo). Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t (n=3) (todas as concentrações promoveram resultados estatisticamente semelhantes ao controle positivo: $p>0,05$).

Os resultados promovidos pelo THC não foram muito diferentes dos do CBD (FIGURA 12). No sangue do tipo A- foi possível observar uma proteção das hemácias dependente de concentração. A concentração de 200 µg/mL teve uma porcentagem de diminuição da hemólise em 8,05%, já a de 300 µg/mL promoveu uma proteção de 11,51% (nenhum desses resultados foram estatisticamente diferentes do controle positivo). Porém, na concentração de 400 µg/mL foi obtido uma diminuição de 17,52% da hemólise, sendo esse resultado estatisticamente diferente do controle positivo. No tipo sanguíneo B+, o melhor resultado foi obtido na concentração de 300 µg/mL (10,67% de proteção) e na de 400 µg/mL (7,47%); porém, não apresentaram diferenças significativas do controle positivo (100% de hemólise). Assim como no teste com o CBD, nesse caso, o resultado com menores porcentagens de proteção foi obtido com o sangue do tipo O+; neste tipo sanguíneo os valores de proteção variaram entre 0,51% a 5,68%. Porém, um ponto interessante é que a concentração com o melhor resultado de proteção (5,68%) foi a de 50 µg/mL, a menor testada.



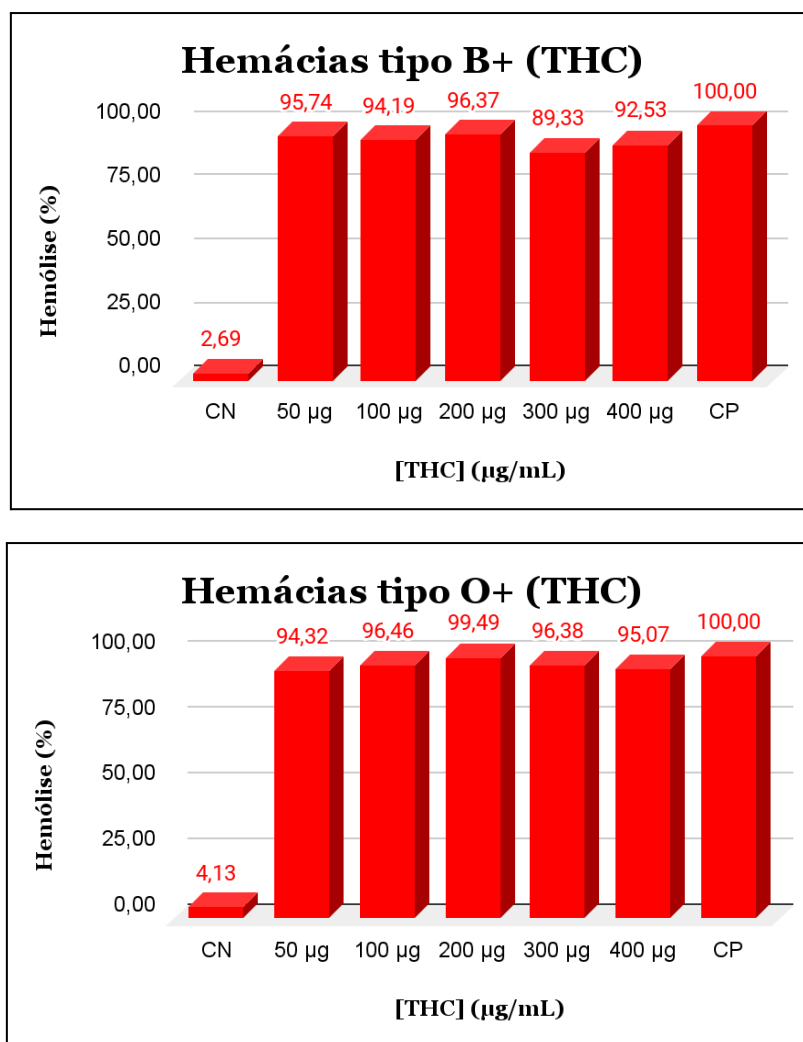


Figura 12: Proteção do THC contra o estresse osmótico em eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A- (a), B+ (b) e O+ (c). CN = eritrócitos em NaCl 0,9% (controle negativo), CP = eritrócitos em NaCl 0,24% (controle positivo). Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t * $p < 0,05$ ($n=3$) (comparação com o controle positivo).

O teste utilizando as duas moléculas juntas foi feito, buscando verificar se haveria algum grau de sinergismo por adição ou por potenciação. E como resultado, foi possível perceber que no contexto da atividade anti-hemolítica, a combinação dos dois canabinóides promoveu resultados parecidos com eles separados (FIGURA 13). No sangue A- a maior proteção das hemácias se deu nas concentrações de 300 µg/mL (9,08%) e 400 µg/mL (8,85%), porém, não se mostraram estatisticamente significativas. Nas demais concentrações a proteção foi menor que 5%. No sangue do tipo B+, houve uma diminuição nos níveis de hemólise, porém, nenhuma concentração foi capaz de proteger mais que 4,05%. Já no sangue do tipo O+ os valores de proteção seguiram baixos em quase todas as

concentrações, variando de 2,01% a 7,13%; porém, na maior concentração, 400 µg/mL, a porcentagem de proteção foi de 18,72%, sendo a maior comparada a todas as outras porcentagens expostas e, estatisticamente significativa, quando comparada com o controle positivo.

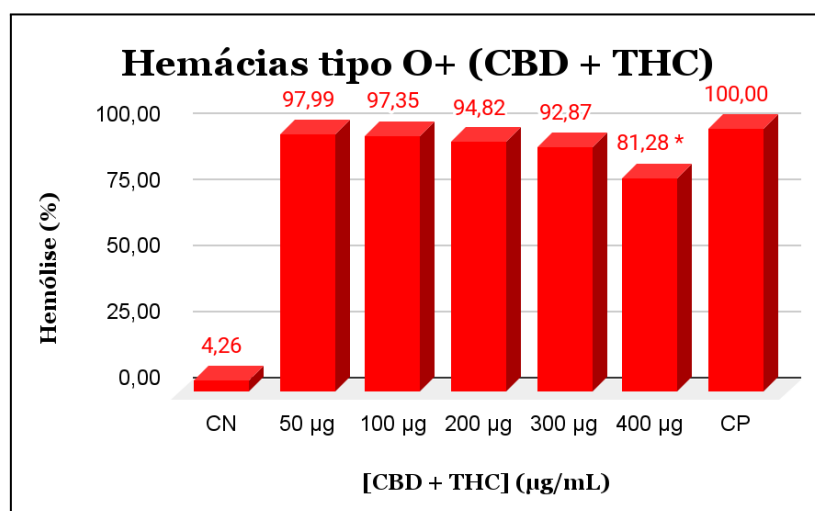
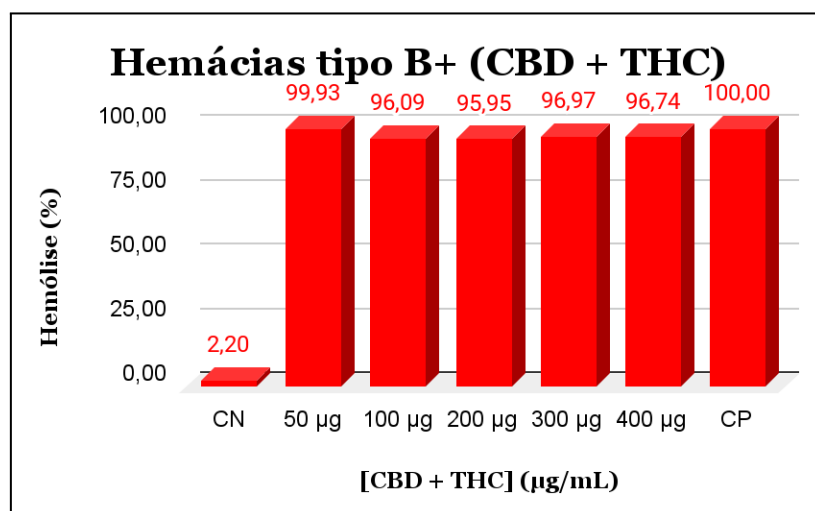
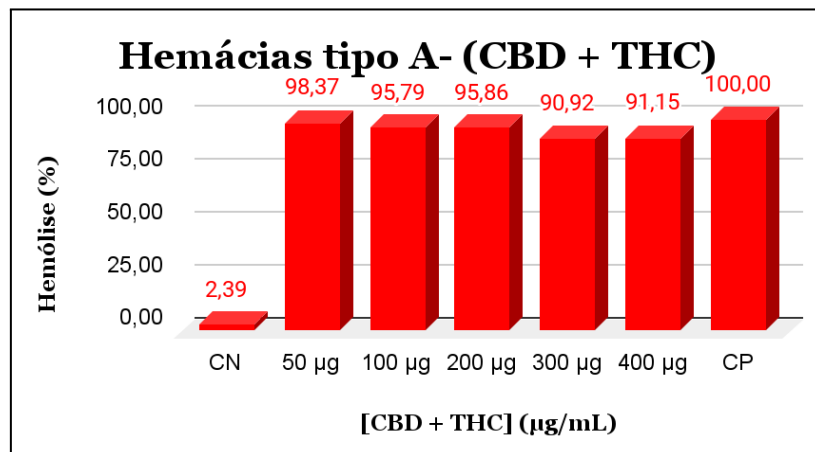


Figura 13: Proteção do CBD+THC contra o estresse osmótico em eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A- (a), B+ (b) e O+ (c). CN = eritrócitos em NaCl 0,9% (controle negativo), CP = eritrócitos em NaCl 0,24% (controle positivo). Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t * $p < 0,05$ (n=3) (comparação com o controle positivo).

Com isso, podemos concluir que os canabinoides, separados ou em combinação, diminuíram a porcentagem de hemólise das células fragilizadas por solução hipotônica, porém, com baixa eficiência, mesmo nas maiores concentrações.

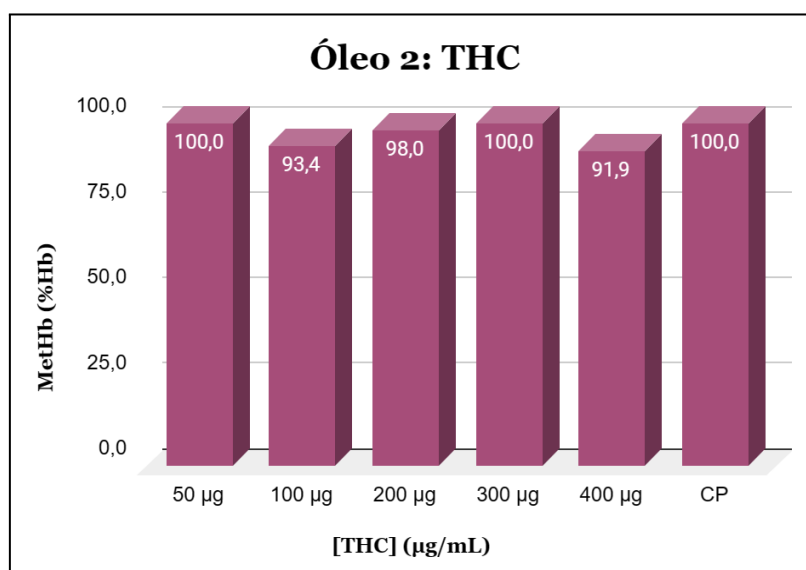
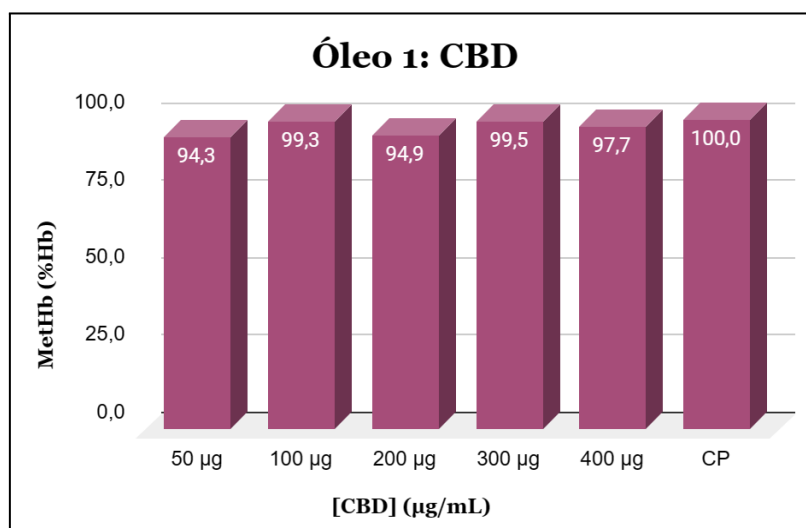
5.2.2 Avaliação do potencial antioxidante dos óleos ricos em CBD e THC

A segunda atividade farmacológica avaliada foi o potencial antioxidante dos canabinoides. O CBD isoladamente, não demonstrou capacidade de promover proteção contra a oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina. Os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ (5,7% a menos de metemoglobina) e 200 $\mu\text{g/mL}$ (5,1% a menos de metemoglobina); as outras concentrações promoveram proteção igual ou inferior a 2,3% (FIGURA 14 (a)). Nenhuma das concentrações se mostrou estatisticamente diferente do controle positivo, onde consideramos que houve 100% de oxidação da hemoglobina.

Os resultados relacionados com o THC seguiram o mesmo padrão descrito anteriormente para o CBD. O THC se mostrou incapaz de diminuir a ação da fenilhidrazina sobre as hemoglobinas humanas. Em dois resultados, nas concentrações de 100 e 400 $\mu\text{g/mL}$, o canabinoide apresentou uma proteção de 6,6% e 8,1%, respectivamente (FIGURA 14 (b)). Porém, não apresentaram diferença significativa do controle positivo (100% de oxidação).

Os melhores resultados de proteção contra a oxidação das hemoglobinas pela fenilhidrazina se deu com a união dos dois canabinoides. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ a proteção foi de 14,7%; 100 $\mu\text{g/mL}$ foi de 7,9%; 200 $\mu\text{g/mL}$ foi de 8,5%; 300 $\mu\text{g/mL}$ foi de 9,1%; e na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ a proteção foi de 9% (FIGURA 14 (c)). Nenhuma apresentando diferença significativa do controle positivo (100% de oxidação). Os valores de proteção contra a oxidação não são

considerados altos comparados com moléculas antioxidantes padrão, porém, em comparação com os valores das moléculas isoladas, a dinâmica da mistura do CBD e THC se mostraram mais potentes na proteção contra a oxidação das hemoglobinas pela fenilhidrazina.



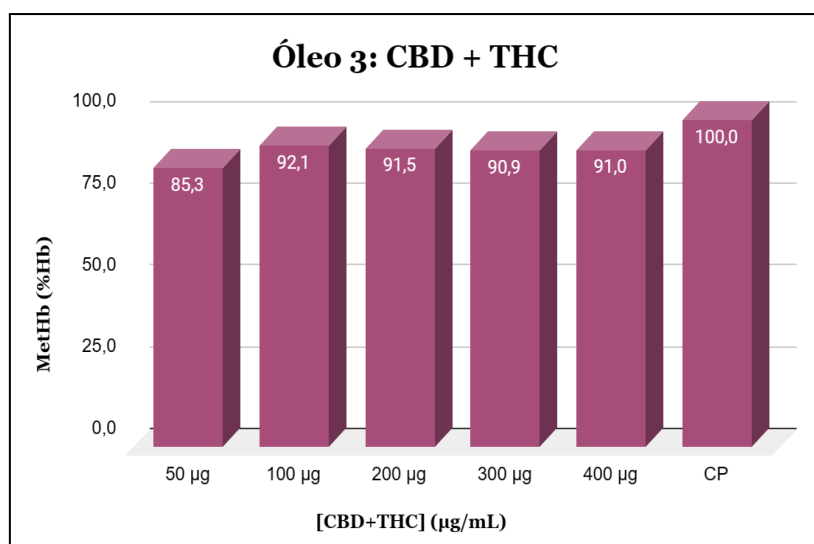


Figura 14: Efeitos antioxidantes do CBD (a), THC (b) e CBD+THC (c) frente a hemoglobinas oriundas de eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t (n=3) (todas as concentrações promoveram resultados estatisticamente semelhantes ao controle positivo: $p>0,05$).

5.2.3 Avaliação do potencial antimicrobiano dos óleos ricos em CBD e THC

5.2.3.1 Primeira triagem: concentração de 1.500 µg de CBD e THC:

A primeira avaliação do potencial antimicrobiano foi feita utilizando a concentração de 1.500 µg das moléculas CBD e THC em 17 cepas Gram-positivas e 17 Gram-negativas. O resultado dessa primeira triagem mostrou que com essa dose, as moléculas conseguiram inibir o crescimento de cepas gram-positivas e gram-negativas (TABELAS 3 e 4) .

O CBD inibiu o crescimento de 11 cepas Gram-positivas (64,7% das cepas testadas): *Bacillus clausii*, *Bifidobacterium sp.* + *Lactobacillus sp.* (espécies de dois gêneros em uma mesma amostra), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* VRE ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Streptococcus sanguinis*. E 4 Gram-negativas (23,52% das cepas testadas): *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Pseudomonas aeruginosa* resistente a metilicina (MR).

O THC inibiu o crescimento de 8 cepas Gram-positivas (47,05% das cepas testadas): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* VRE ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Streptococcus sanguinis*. E 1 Gram-negativa (5,9% das cepas testadas): *Pseudomonas aeruginosa*.

Já a mistura dos dois canabinoides inibiram o crescimento de 8 cepas Gram-positivas (47,05% das cepas testadas): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* VRE ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus sanguinis*. E 3 cepas Gram-negativas (17,65% das cepas testadas): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas aeruginosa* MR.

As 9 cepas comuns que foram inibidas pelo CBD e o THC foram: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* VRE ATCC, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus sanguinis* (8 cepas Gram-positivas); e *Pseudomonas aeruginosa* (1 Gram-negativa). Todas as cepas que tiveram o seu crescimento inibido pelo THC também foram inibidas pelo CBD, porém, o CBD inibiu cepas que nem o THC e nem a mistura dos dois canabinoides conseguiram inibir.

Após a aplicação da resazurina, as cepas que tiveram o crescimento inibido com a concentração de 1.500 µg foram plaqueadas em meio BHI sólido para verificar se a inibição foi bacteriostática ou bactericida. Depois de 24 horas, todas as cepas testadas mostraram crescimento, apontando que o mecanismo de inibição é bacteriostático.

Tabela 3: Resultado da primeira triagem com a concentração de 1.500 µg de CBD e THC em Cepas Gram-positivas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	CBD	THC	CBD + THC
<i>Bacillus clausii</i>	Inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Bifidobacterium sp. + Lactobacillus sp.</i>	Inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inibiu	Não inibiu	Inibiu
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 33591*	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Streptococcus do grupo viridans</i>	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Streptococcus mitis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus mutans</i>	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Streptococcus oralis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Inibiu	Inibiu	Não inibiu
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu

**Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Tabela 4: Resultado da primeira triagem com a concentração de 1.500 µg de CBD e THC em cepas Gram-negativas

CEPAS GRAM-NEGATIVAS	CBD	THC	CBD + THC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Não inibiu	Não inibiu	Inibiu
<i>Escherichia coli</i> ESBL+ (I)	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Escherichia coli</i> ESBL+ (II)	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Escherichia coli</i> ESBL+ AC (III)	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP X	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> IV	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR*	Inibiu	Não inibiu	Inibiu
<i>Salmonella anatum</i> ATCC 9270	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu

* *Pseudomonas aeruginosa* resistente à meticilina.

7.2.3.2 Segunda triagem: 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de CBD e THC

A segunda triagem foi feita utilizando as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de CBD e THC separados e misturados. Em relação ao CBD, o padrão de inibição das 11 cepas Gram-positivas continuou até a concentração de 1.200 µg, porém, na dose de 1.100 µg, *Bifidobacterium* sp. + *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, não tiveram seu crescimento inibido, exibindo assim, a coloração rosa nas suas amostras, quando feito a adição da resazurina. Em relação às Gram-negativas, o CBD inibiu as 4 cepas testadas nas

concentrações de 1.400 e 1.300 µg, porém, a partir da dose de 1.200 µg apenas as cepas *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram inibidas (TABELA 5).

Tabela 5: Resultado da segunda triagem com as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de CBD em Cepas Gram-positivas e Gram-negativas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	1.400 µg de CBD	1.300 µg de CBD	1.200 µg de CBD	1.100 µg de CBD
<i>Bacillus clausii</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Bifidobacterium sp. + Lactobacillus sp.</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus mitis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus oralis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
CEPAS GRAM-NEGATIVAS	1.400 µg de CBD	1.300 µg de CBD	1.200 µg de CBD	1.100 µg de CBD
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu

O THC inibiu o crescimento das 8 cepas Gram-positivas nas concentrações de 1.400 e 1.300 µg, porém, na dose de 1.200 µg esse número caiu para 6 e na de 1.100 µg a quantidade de cepas foi 5. Em relação às gram-negativas, a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* teve seu crescimento inibido apenas na concentração de 1.400 µg (TABELA 6).

TABELA 6: Resultado da segunda triagem com as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de THC em Cepas Gram-positivas e Gram-neativas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	1.400 µg de THC	1.300 µg de THC	1.200 µg de THC	1.100 µg de THC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu
<i>Streptococcus mitis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus oralis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu
CEPAS GRAM-NEGATIVAS	1.400 µg de THC	1.300 µg de THC	1.200 µg de THC	1.100 µg de THC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu

A mistura dos dois canabinoides promoveu a inibição das 8 cepas gram-positivas testadas na concentração de 1.400 µg, 7 na dose de 1.300 µg (*Streptococcus oralis* não foi inibida), 6 na dose de 1.200 µg (*Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis* não foram inibidas), e 4 na dose de 1.100 µg. Em relação às gram-negativas, as doses de 1.400 e 1.300 µg inibiram o crescimento de 3 cepas, porém a de 1.200 µg inibiu 2 e a de 1.100 µg apenas 1 cepa (TABELA 7).

TABELA 7: Resultado da segunda triagem com as concentrações de 1.400, 1.300, 1.200 e 1.100 µg de CBD+THC em Cepas Gram-positivas e Gram-negativas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	1.400 µg de CBD+THC	1.300 µg de CBD+THC	1.200 µg de CBD+THC	1.100 µg de CBD+THC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus mitis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu
<i>Streptococcus oralis</i>	Inibiu	Não Inibiu	Não inibiu	Não inibiu
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não inibiu
CEPAS GRAM-NEGATIVAS	1.400 µg de CBD+THC	1.300 µg de CBD+THC	1.200 µg de CBD+THC	1.100 µg de CBD+THC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inibiu	Inibiu	Não Inibiu	Não Inibiu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu

5.2.3.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após o processo de triagem com concentrações altas dos canabinoides, foi feita a avaliação da Concentração Inibitória Mínima com as cepas que tiveram o seu crescimento inibido na concentração de 1.100 µg dos canabinoides. Em microplacas de 96 poços a diluição iniciou-se com a dose de 1.000 µg das substâncias, que, posteriormente, foi diluída em 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg e 31,25 µg de CBD,

THC e CBD+THC. Os resultados da Concentração Inibitória Mínima de cada cepa está detalhada nas TABELAS 8, 9 e 10, abaixo. Em vários dos resultados, consta o símbolo de “maior que” (>), isso se deve ao fato de que muitas cepas não foram inibidas na concentração de 1.000 µg dos canabinoides, primeiro valor do teste feito nas microplacas (o menor valor de inibição testado para essas cepas foi o de 1.100 µg dos canabinoides).

Nove cepas Gram-positivas, padrão e de origem clínica, foram avaliadas no teste da Concentração Inibitória Mínima com a molécula CBD, destas, 3 cepas apresentaram crescimento na dose de 1.000 µg (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus sanguinis*), 5 tiveram o crescimento inibido em 1.000 µg (*Bacillus clausii*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* VRE ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 6569 e *Streptococcus oralis*) e 1 cepa apresentou uma CIM de 500 µg (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Em relação às Gram-negativas, as duas apresentaram crescimento no valor de 1.000 µg (TABELA 8).

Tabela 8: Resultado da avaliação da Concentração Inibitória Mínima do CBD frente a Cepas Gram-positivas e Gram-negativas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	CIM de CBD
<i>Bacillus clausii</i>	1.000 µg
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1.000 µg
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	1.000 µg
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	1.000 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500 µg
<i>Streptococcus mitis</i>	>1.000 µg
<i>Streptococcus oralis</i>	1.000 µg
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	>1.000 µg
<i>Streptococcus sanguinis</i>	>1.000 µg
CEPAS GRAM-NEGATIVAS	CIM de CBD
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	>1.000 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1.000 µg

A CIM com o THC isolado só foi realizada com cepas Gram-positivas, pois, nenhuma cepa Gram-negativa foi inibida na dose de 1.100 µg. Das 4 cepas avaliadas, 3 apresentaram crescimento na dose de 1.000 µg (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615), apenas 1 teve o crescimento inibido no valor de 1.000 µg (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) (TABELA 9).

Tabela 9: Resultado da avaliação da Concentração Inibitória Mínima do THC frente a Cepas Gram-positivas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	CIM de THC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1.000 µg
<i>Streptococcus mitis</i>	> 1.000 µg
<i>Streptococcus oralis</i>	> 1.000 µg
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	> 1.000 µg

A CIM da mistura dos dois canabinoide foi realizada com 4 cepas Gram-positivas e 1 Gram-negativa. Em relação ao primeiro grupo, 1 cepa apresentou crescimento na dose de 1.000 µg (*Streptococcus mitis*), 2 tiveram seu crescimento inibido na dose de 1.000 µg (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Enterococcus faecium* ATCC 6569) e 1 cepas mostrou inibição no valor de 500 µg (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) mesmo valor obtido com o CBD isolado. A Gram-negativa testada apresentou crescimento na dose de 1.000 µg (*Pseudomonas aeruginosa* MR) (TABELA 10).

Tabela 10: Resultado da avaliação da Concentração Inibitória Mínima da combinação do CBD+THC frente a cepas gram-positivas e gram-negativas

CEPAS GRAM-POSITIVAS	CIM de CBD+THC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1.000 µg
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	1.000 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500 µg
<i>Streptococcus mitis</i>	> 1.000 µg
CEPAS GRAM-NEGATIVAS	CIM de CBD+THC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	>1.000 µg

5.2.3.4 Caracterização da atividade antibacteriana

Na caracterização da atividade antimicrobiana as cepas que foram inibidas retomaram o crescimento após serem semeadas em meio BHI na ausência dos canabinoides. Sendo assim, neste estudo, o CBD e o THC não apresentaram atividade bactericida frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, padrão e de origem clínica.

6. DISCUSSÃO

Os canabinoides CBD e THC estão associados a muitas perspectivas positivas no contexto farmacológico atual, com isso, aumenta-se a necessidade de estudos da segurança dessas moléculas, pois, nenhuma molécula está livre de toxicidade, independente da sua origem: sintética ou derivada de produtos naturais (Lira et al., 2018).

Para a avaliação da citotoxicidade dos canabinoides foram utilizadas hemácias e hemoglobinas humanas, pois, a integridade das células vermelhas e a funcionalidade das hemoglobinas são fatores essenciais para a sobrevivência dos diversos sistemas que compõem o corpo humano. Além disso, as hemácias contêm altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, oxigênio molecular e íons ligados no estado ferroso, tornando as células altamente vulneráveis a reações envolvendo radicais livres e suscetíveis à peroxidação lipídica nas membranas celulares, o que contribui para a ocorrência de hemólise (Duarte et al., 2016; Lira et al., 2018), sendo assim, um excelente modelo para uma análise geral do potencial tóxico de candidatos a fármacos.

A hemólise é definida como o rompimento das membranas dos glóbulos vermelhos (BHARGAVA et al., 2020), que, de forma elevada, está relacionada com várias condições patológicas, como a anemia aguda, icterícia, hematúria, dispneia, fadiga, taquicardia e hipotensão (Phillips & Henderson, 2018), sendo sua avaliação importante nas fases de desenvolvimento de fármacos (Dobrovolskaia et al., 2008).

Os dados apresentados neste estudo mostraram que as amostras de hemácias tratadas com o CBD e o THC apresentaram um baixo potencial hemolítico. Este resultado é corroborado, em parte, por Martinenghi e colaboradores, 2020, que testaram a capacidade do CBD como agente hemolisante. Nos seus resultados, concluíram que o CBD manifestou baixa atividade hemolítica em glóbulos vermelhos humanos, valores menores ou igual a 0,8%, em todas as concentrações testadas (4 a 1 µg/mL). Da mesma forma, o CBD não apresentou toxicidade significativa em relação às células de queratinócitos humanos (Martinenghi et al., 2020). Esse trabalho é um interessante comparativo, pois, um dos modelos celulares avaliados é igual ao utilizado no presente trabalho

(hemácias) e as concentrações utilizadas são consideravelmente mais baixas do que as utilizadas no presente estudo, e o padrão de baixo potencial hemolítico é confirmado nas duas situações.

O sangue é um sistema multicelular complexo, que possui várias características importantes que podem ser comprometidas, levando a condições patológicas graves: incluindo anemia falciforme, doença cardiovascular, doença vascular periférica, aterosclerose, diabetes, acidente vascular cerebral e outras condições. Dentre essas características estão a viscosidade e a elasticidade do sangue, além da integridade das membranas dos eritrócitos (um dos pontos centrais deste trabalho, e que afeta diretamente as outras duas) (Baskurt et al., 2007).

Um estudo recente, teve como objetivo avaliar o efeito "*in vitro*" do THC e do CBD, sobre as propriedades físicas e funcionais do sangue total. Para isso, os autores coletaram amostras de sangue de voluntários saudáveis e as incubaram com diferentes concentrações (0 a 100 ng/ml, os efeitos se apresentaram significativos a partir de 50 ng/ml) de THC e CBD. Essas concentrações foram escolhidas com base nos dados sobre os níveis de canabinoides detectados no sangue de usuários depois da utilização da Cannabis de forma fumada. Em seguida, eles mediram a viscosidade (resistência ao fluxo), a elasticidade (capacidade de retornar à forma original) e a integridade da membrana (resistência à ruptura) do sangue e dos eritrócitos. Os resultados mostraram que o THC aumentou significativamente a viscosidade e a elasticidade do sangue, o que pode dificultar a circulação e aumentar a pressão arterial. O THC também causou uma maior destruição dos eritrócitos e uma menor capacidade deles se deformarem para passar pelos vasos sanguíneos estreitos. Por outro lado, o CBD reduziu significativamente a viscosidade e a elasticidade do sangue, o que pode facilitar a circulação e diminuir a pressão arterial. O CBD também preservou a integridade dos eritrócitos e aumentou a sua deformabilidade. Os autores concluíram que o THC pode ter efeitos prejudiciais sobre a saúde cardiovascular, enquanto o CBD pode ter efeitos benéficos. No entanto, eles ressaltaram que esses achados foram obtidos em condições experimentais e que mais estudos são necessários para confirmar os efeitos *in vivo* do THC e do CBD sobre o sangue (James et al., 2022).

Esse apontamento final também é relevante no contexto do presente trabalho, pois, podemos perceber que no exemplo acima, parte dos resultados, relativos ao CBD, se encaixam nos apresentados neste trabalho, e parte, relacionados ao THC, se mostram contrários aos nossos resultados. Esse padrão de resultados conflitantes se estendem pelo resto do trabalho. Os canabinoides isolados e os extratos da *C. sativa*, dependendo do modelo estudado e da origem do material, apresentam resultados muito diferentes. É preciso ter em mente que a espécie *C. sativa* possui uma bioquímica muito complexa, e que qualquer alteração mínima nos processos de manipulação dos seus produtos e no desenho experimental, pode gerar dados conflitantes.

Um estudo recente, publicado em 2023, traz uma perspectiva contrária ao encontrado no presente trabalho. Em um estudo, que buscou compreender o impacto do uso da Cannabis antes da doação de sangue, foi avaliado o impacto de uma mistura de canabinoides (incluindo CBD e THC) na qualidade das hemácias e plaquetas, desde o momento da coleta e processamento até o armazenamento do conteúdo sanguíneo. Os resultados apontaram que a mistura dos canabinoides aumentaram a quantidade de hemoglobinas livres, promoveram hemólise das hemácias e também reduziram a capacidade de agregação das plaquetas, utilizando concentrações que variaram de 1-24 µg/mL (Lampron et al., 2023), muito inferiores às utilizadas no presente estudo.

Os estudos que objetivam entender os efeitos dos derivados da *C. sativa* sobre os componentes das células vermelhas ainda são pouco abundantes (Lampron et al., 2023). Porém, outros contextos podem ajudar no entendimento mais abrangente da toxicidade dessas moléculas. Dentro do contexto dos estudos toxicológicos do CBD e THC utilizando células humanas *in vitro*, Dziwenka e colaboradores, 2023, realizaram uma avaliação da segurança do óleo extraído da *C. sativa* com uma alta concentração de canabidiol, além de outros fitocanabinoides e terpenos. Um ensaio *in vitro* de micronúcleos foi realizado para avaliar o potencial nocivo nos cromossomos, utilizando linfócitos de sangue periférico humano. Como resultado, o extrato de óleo de *C. sativa* não induziu danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos em linfócitos humanos quando utilizado em concentrações de até 10 µg/mL sem ativação metabólica e até 60 µg/mL com ativação metabólica (Dziwenka et al., 2023).

Em estudos pré-clínicos utilizando animais, foram relatados vários efeitos adversos agudos. Utilizando ratos e doses de 0,6, 0,8 ou 1,2 mg/kg de CBD, Rosenkrantz e Hayden, 1979, perceberam que houve um aumento do peso dos órgãos, degeneração dos túbulos seminíferos e interferência na maturação espermática dos animais (Rosenkrantz & Hayden, 1979). Um outro estudo com células germinativas de ouriço-do-mar, com doses de 0,1, 0,5, 1,0 ou 10 µM de CBD na água do mar, foi percebido que houve uma diminuição dose-dependente da fertilidade dos óvulos e espermatozoides, além da inibição da fertilização quando as células foram avaliadas juntas (Schuel et al., 1987). Garberg e colaboradores, 2017, realizaram uma avaliação dos efeitos do CBD no sistema cardiovascular de leitões, utilizando doses de 10, 25 ou 50 mg/kg de CBD administradas pela rota intravenosa, e foi relatado que o canabinoide promoveu hipotensão e parada cardíaca (Garberg et al., 2017).

Efeitos adversos crônicos também foram encontrados associados ao uso do CBD e THC em pesquisas pré-clínicas (Huestis et al., 2019). Utilizando o modelo animal Macacos Rhesus, com administração via oral de doses de 30, 100 ou 300 mg/kg/dia por 90 dias de CBD, foram detectados vários efeitos adversos: aumento de peso do fígado, coração, rim e tireóide; além da diminuição do tamanho testicular e inibição da espermatogênese (Rosenkrantz & Hayden, 1981). A toxicidade no desenvolvimento também apresenta dados importantes; em um estudo publicado em 2018, ratas prenhes foram submetidas a doses de 75, 150 ou 250 mg/kg/dia de CBD por via oral durante a gravidez e lactação, e os resultados mostraram que houve toxicidade no desenvolvimento, aumento da mortalidade embriofetal, diminuição do crescimento, atraso na maturação sexual, alterações neurocomportamentais, alterações do desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos e fertilidade na prole (*CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH*, 2018).

No teste de hemólise, os dados apontaram baixos níveis hemolíticos dos canabinoides CBD e THC, sendo significativamente diferente, em todas as concentrações, do controle positivo (100% de hemólise). Porém, todas as concentrações proporcionaram algum percentual de lise, mesmo que baixo. Esse contexto, aliado a outros dados toxicológicos podem tornar as moléculas pouco atrativas para tratamentos que usam a corrente sanguínea como veículo de

transporte, por isso, os dados do potencial oxidante são importantes, para verificar os efeitos nos eritrócitos de uma forma mais ampla.

A hemoglobina é uma proteína que contém ferro e que está presente no sangue de muitos animais. A sua função é transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos do corpo. A hemoglobina forma uma ligação reversível e instável com o oxigênio (Farid et al., 2023). Quando está ligada ao oxigênio, ela é chamada de oxihemoglobina e tem uma cor vermelha brilhante; quando está sem oxigênio, ela é chamada de desoxihemoglobina e tem uma cor azul arroxeada. A hemoglobina pode existir em diferentes formas, dependendo do seu estado de oxidação (Patel et al., 2023). O ferro da hemoglobina deve estar na forma Fe^{2+} para se ligar ao oxigênio. Se o ferro for oxidado para a forma Fe^{3+} , a hemoglobina se torna incapaz de se ligar ao oxigênio e é chamada de metemoglobina. A porcentagem média de oxidação que as hemoglobinas sofrem naturalmente é de cerca de 1%, mas pode variar de acordo com fatores como a presença de agentes oxidantes, o pH do sangue e a temperatura corporal (Marden et al., 1995).

As moléculas de CBD e THC são lipofílicas, com isso, várias são as vias possíveis de interação com as hemácias: ligação dos canabinoides com proteínas de membrana, solubilização em lipídios nas membranas celulares e penetração das substâncias nos eritrócitos e interação com hemoglobina e outros compostos (Duarte et al., 2016). Danos oxidativos em eritrócitos humanos podem gerar hemólise, diminuição do nível de glutathione e formação de metemoglobina (Olchowik-Grabarek et al., 2018).

Devido a essas possibilidades interacionais, foi testado, neste estudo, o potencial oxidativo dos canabinoides sobre hemoglobinas humanas. O excesso de metemoglobina no sangue está relacionado a uma condição conhecida como metemoglobinemia. A metemoglobinemia interfere na capacidade do sangue em transportar oxigênio para os tecidos do corpo, causando uma redução na quantidade de oxigênio disponível para as células. Além disso, o estresse oxidativo em demasia nas células vermelhas pode levar à eriptose, uma espécie de morte celular programada, que em grande escala, pode levar ao desenvolvimento de anemia (Olchowik-Grabarek et al., 2018).

Como resultado, a ação dos canabinoides CBD e THC proporcionou baixa formação de metemoglobina em todas as concentrações testadas. As porcentagens de metemoglobina formada pelos três óleos (CBD, THC e CBD+THC) variaram entre 3,5 e 6,2%. Inicialmente, parecem porcentagens elevadas, principalmente levando em consideração o dado referenciado acima, de que a porcentagem média de oxidação que as hemoglobinas sofrem naturalmente é de cerca de 1% (Marden et al., 1995), porém, devemos levar em consideração que em condições fisiológicas normais, o corpo humano tem um arcabouço significativo de sistemas antioxidantes, que minimizam os danos, o que não ocorre em condições experimentais.

Um dado importante é que as amostras tratadas com THC tiveram valores maiores de metemoglobina (5,6 a 6,2%) comparadas com as amostras tratadas com o CBD (3,5 a 4,7%). Esse dado é importante, visto que na literatura o CBD é correlacionado com efeitos antioxidantes, enquanto o THC mostra ter um papel dual, dependendo do modelo ele está relacionado com atividade antioxidante ou como promotor de oxidação. Essa questão dual também foi obtida no presente trabalho, pois, como mencionado acima, no teste de oxidação, o THC se mostrou, mesmo que com baixa eficiência, mais propício para induzir a formação de metemoglobina; porém, como discutido em parágrafos abaixo, no teste do potencial antioxidante, o THC se mostrou mais potente na inibição da oxidação pela fenilhidrazina sobre as hemoglobinas humanas, mesmo que com pouca eficiência, foi mais potente que o CBD.

Em um trabalho publicado em 2015, foi avaliado os efeitos do THC na função mitocondrial de células do cérebro e no estresse oxidativo, fatores que são amplamente relacionados no Acidente Vascular Cerebral (AVC). Nesse contexto, o THC apresentou um efeito de toxicidade dose-dependente nas mitocôndrias isoladas incubadas com diferentes concentrações de THC e promoveu inibição dos complexos I, II e III da cadeia transportadora de elétrons. E, além disso, o THC se mostrou responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelo cérebro, o que resultou no aumento de sua toxicidade no órgão (Wolff et al., 2015). Sarafian e colaboradores, em 1999, investigaram o estresse oxidativo produzido pela fumaça da cannabis com um teor de THC de 0, 1,77 ou 3,95%, em uma linhagem de células endoteliais (ECV 304). O estresse oxidativo foi observado

nas exposições de longo prazo (30 minutos) e nas de curto prazo (5 minutos) (Sarafian et al., 1999).

Porém, existem dados na literatura que apontam que o THC possui propriedades antioxidantes. Raja e colaboradores (2020), investigaram os efeitos do THC e do CBD na redução do estresse oxidativo em células neuronais diferenciadas (SY-SH5Y). Os autores seguiram duas abordagens para imitar o estresse oxidativo semelhante à doença de Alzheimer, tratando as células com peróxido de hidrogênio e também com β -amiloide1-42 e cobre no estado de oxidação. Como resultado, eles viram que o THC tinha alta potência para combater o estresse oxidativo em ambos os modelos *in vitro*, porém, o CBD mostrou-se inferior como agente antioxidante (Raja et al., 2020).

Devido aos resultados do teste do potencial oxidante, foi realizada a avaliação da atividade antioxidante das duas moléculas. Para o teste, foi utilizado o agente oxidante fenilhidrazina, buscando avaliar se o THC e o CBD teriam a capacidade de limitar a ação oxidante sobre hemoglobinas humanas. Os resultados obtidos mostraram que a formação de metemoglobina não teve uma diminuição expressiva. Porém, nesse caso, o melhor resultado foi da molécula THC na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, que promoveu uma diminuição de 8,1% na formação de metemoglobina promovida pela fenilhidrazina, comparada com o controle positivo. No experimento de oxidação, o THC se mostrou mais propício à formação de metemoglobina que o CBD. Os melhores resultados da proteção contra a oxidação pela fenilhidrazina foram encontrados quando as duas moléculas foram testadas juntas, chegando a apresentar uma proteção de 14,7% contra a formação de metemoglobina. Esse cenário de sinergismo entre os dois canabinoides é bastante estudado, e, em muitos casos, estritamente necessário para um resultado promissor das duas moléculas, podendo ser um caminho interessante para a realização de ajuste finos nas proporções dos dois canabinoides, buscando assim, minimizar as oscilações nas suas propriedades terapêuticas.

O cenário que busca entender o efeito dessas moléculas como agentes antioxidantes ainda não está suficientemente claro, principalmente em relação ao THC, que demonstra ser tóxico em muitos testes, porém, apresenta resultados promissores em outros, principalmente quando está associado com outras

moléculas derivadas da *C. sativa*. Dawidowicz e colaboradores (2023) realizaram uma avaliação das propriedades antioxidantes de óleos ricos em canabinoides e apontou que os óleos obtidos a partir dos extratos das plantas possuem uma atividade antioxidante maior do que a apresentada por óleos preparados a partir de canabinoides isolados (Dawidowicz et al., 2023) e essa variável deve ser levada em consideração, pois variações nos métodos de produção podem gerar produtos finais com características farmacológicas distintas (Dziwenka et al., 2023).

Muitos trabalhos apontam que o CBD possui atividade antioxidante e é sugerido que possa ser usado no tratamento de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Pellati et al., 2018). Sua atividade antioxidante está relacionada com a capacidade de eliminar radicais livres, prevenir o processo de oxidação e reduzir íons metálicos, sendo comparada com a vitamina E (Dawidowicz et al., 2021).

No contexto da comparação com a vitamina E, Tura e colaboradores (2019), compararam a atividade antioxidante do canabidiol (CBD) e do α -tocoferol (vitamina E) adicionados a óleos refinados de oliva (ROO) e de girassol (SO). Os autores mediram o índice de peróxido, o índice de estabilidade oxidativa (OSI), a ressonância de *spin* eletrônico (ESR) e os ensaios de DPPH para avaliar a capacidade dos antioxidantes de prevenir ou retardar a oxidação dos óleos. Os resultados mostraram que o CBD tem uma atividade antioxidante superior ao α -tocoferol em ambos os óleos, especialmente no de oliva. O CBD também aumenta o tempo de indução da oxidação dos óleos, reduz a formação de radicais livres e sequestra os radicais DPPH. Os autores sugerem que o CBD pode ser usado como um aditivo natural para melhorar a qualidade e a estabilidade dos óleos vegetais (Tura et al., 2019). Demonstrando assim, a plasticidade do uso dos derivados da *C. sativa*.

Um estudo publicado em 2020, investigou os efeitos do canabidiol (CBD) na expressão de genes antioxidantes em queratinócitos humanos, as células mais abundantes da epiderme. Os autores demonstram que o CBD aumenta a expressão de genes envolvidos na defesa contra o estresse oxidativo, como NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase (quinone)), GCLM (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit), GCLC (Glutamate—cysteine ligase catalytic subunit) e HMOX1 (Heme Oxygenase

1), por meio da inibição do fator de transcrição BACH1 (*BTB and CNC homology 1*), que normalmente reprime esses genes. O CBD também reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e previne a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em queratinócitos. Além disso, o CBD aumenta a expressão de genes relacionados à diferenciação e à função da barreira cutânea, como KRT1 (*Keratin 1*), KRT10 (*Keratin 10*), FLG (*Filaggrin*) e LOR (*Loricrin*). Os autores concluem que o CBD tem potencial terapêutico para o tratamento de doenças de pele associadas ao estresse oxidativo e à inflamação, como psoríase, dermatite atópica e câncer de pele (Casares et al., 2020).

Atalay e colaboradores (2019), apresenta e discute evidências experimentais e clínicas dos efeitos do CBD em diversas doenças associadas ao estresse oxidativo e à inflamação, como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e doenças hepáticas. E conclui que o CBD é um composto promissor para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e à inflamação, mas que são necessários mais estudos para elucidar seus mecanismos de ação e sua segurança (Atalay et al., 2019).

Em resumo, a atividade antioxidante do THC e do CBD pode variar dependendo de vários fatores, como a fonte, a pureza, a concentração, a proporção e o método de avaliação dos compostos, a seguir são apresentados mais exemplos que contextualizam a complexidade do apontamento das propriedades dos dois canabinoides. Segundo Silva et al. (2022), o THC tem uma alta potência para conter o estresse oxidativo, enquanto o CBD não apresenta atividade antioxidante notável. No entanto, outros autores afirmam que o CBD tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso, alguns estudos mostram que os extratos de Cannabis podem ter uma maior atividade antioxidante do que os canabinoides isolados, dependendo da presença de outros compostos como terpenos e flavonoides, como sugerido por Raja et al. (2020) e por Bonfá et al. (2008). Por fim, alguns ensaios *in vitro* podem ter diferentes sensibilidades e especificidades para medir a atividade antioxidante dos canabinoides, o que pode levar a resultados inconsistentes ou contraditórios, como observado por Marques (2021). Portanto, é difícil estabelecer uma conclusão definitiva sobre a atividade antioxidante do THC e do CBD, pois ela pode depender de vários fatores que precisam ser considerados e padronizados nos estudos.

Como descrito acima, a homeostase das hemácias é um fator vital para a sobrevivência do organismo, porém, vários são os fatores que podem gerar desequilíbrios graves em diversos componentes dessas células. Com isso, avaliações plurais com essas unidades são importantes para buscar medidas de prevenção e tratamento contra os danos que as mesmas podem sofrer. No contexto do presente trabalho, o Teste de Fragilidade Osmótica foi utilizado para avaliar se os canabinoides CBD e THC promovem alguma proteção contra a hemólise em células vermelhas fragilizadas. Porém, os resultados mostraram baixa atividade de proteção contra a hemólise de hemácias causadas por solução hipotônica.

Parte da água que entra nas células passa diretamente através da membrana, uma outra porcentagem atravessa através de proteínas chamadas aquaporinas, que permitem um movimento mais rápido da água para dentro da célula. O tráfego da água ocorre constantemente para dentro e para fora da célula, dependendo das condições do ambiente interno e externo. Quando a solução extracelular é hipertônica (elevada concentração de soluto) a água tenderá a sair do interior da célula, fazendo com que a mesma murche. Já a solução hipotônica é caracterizada como uma solução com uma quantidade de soluto inferior ao encontrado em uma célula de referência. Uma menor concentração fora da célula faz com que mais água flua para dentro da célula do que para fora, e isso acaba gerando inchaço celular e aumentando o potencial de hemólise. Flutuações no ambiente extracelular das células podem acontecer sem gerar grandes danos, porém, se a diferença for extrema ou a longo prazo, as células podem perder a sua viabilidade (Alberts et al., 2017).

Na literatura médica existem várias doenças relacionadas à danos às hemácias. Sendo indispensável o constante desenvolvimento de métodos de detecção, prevenção e tratamento dessas condições, sendo o Teste de Fragilidade Osmótica amplamente utilizado. No contexto toxicológico é usado para avaliar os possíveis danos que produtos químicos, derivados de produtos naturais e poluentes podem causar na integridade das células vermelhas (Duarte et al., 2016). Já na clínica, está relacionado com a avaliação da resistência ou a fragilidade osmóticas dos eritrócitos, sendo, rotineiramente, usado para diagnosticar doenças, como as anemias hemolíticas. A anemia hemolítica é definida pela destruição prematura das hemácias, podendo ser crônica ou fatal (Phillips & Henderson, 2018); doenças com

variada heterogeneidade clínica e molecular (Jamwal et al., 2019). Pacientes com hemólise podem apresentar anemia aguda, icterícia, hematúria, dispneia, fadiga, taquicardia e, possivelmente, hipotensão (Phillips & Henderson, 2018; Scheckel & Go, 2022), sendo assim, indispensável novos medicamentos que busquem sanar essas condições.

A tonicidade extracelular tem uma influência significativa na capacidade de deformação das hemácias humanas. Fluidos intravenosos hipertônicos promovem a saída da água do interior dessas células e, como consequência, a agregação das hemoglobinas e danos em proteínas de membrana. Já em solução hipotônica, o excesso de água intracelular pode causar perda de hemoglobinas e até a lise celular (Lukose et al., 2020).

Uma condição associada a uma baixa concentração de sódio, inferior a 135 mEq/L, no sangue é a hiponatremia, que pode ser hipotônica e não hipotônica (Hoorn & Zietse, 2017). A hiponatremia é uma baixa homeostática das concentrações eletrolíticas, causada pelo excesso de água corporal total em comparação ao conteúdo de sódio no corpo, bastante comum em pacientes hospitalizados, principalmente idosos. As manifestações clínicas mais conhecidas estão principalmente relacionadas a efeitos neurológicos; nessa condição, o líquido extracelular se torna hipotônico em relação ao líquido intracelular, fazendo com que a água seja desviada para o interior das células, podendo gerar uma hipertensão intracraniana (Rocha, 2011).

Os óleos ricos nos canabinoides CBD e THC, neste estudo, tiveram um baixo potencial de proteção contra o estresse osmótico, porém, todas as concentrações promoveram uma diminuição nas porcentagens de lise das hemácias dos tipos A-, B+ e O+. Levando em consideração esse ponto, a limitação da bibliografia sobre esse tema e os resultados dual das propriedades dos canabinoides em outros testes e estudos, apontamos que mais pesquisas precisam ser feitas antes do descarte da possibilidade da atuação dos canabinoides no contexto do estresse osmótico. Os canabinoides se mostram moléculas dinâmicas e com um amplo espectro interacional, sendo assim indispensável que estudos complementares em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* sejam realizados para nortear mais claramente as reais decisões futuras sobre a espécie *C. sativa* e seus derivados.

Por fim, discutimos os resultados da análise antimicrobiana e os relacionamos com o contexto atual da pesquisa sobre o potencial dos canabinoides no tratamento de infecções.

A resistência microbiana aos antibióticos é um dos maiores problemas da medicina moderna. Alternativas derivadas de produtos naturais estão sendo avaliadas para buscar soluções para essa questão. Nesta pesquisa avaliamos o potencial antimicrobiano dos canabinoides CBD e THC frente a cepas de importância clínica gram-positivas e gram-negativas. Como resultado, foi obtido que os canabinoides possuem a capacidade de inibir o crescimento microbiano, principalmente das cepas gram-positivas. O CBD isolado conseguiu melhores resultados em comparação com o THC isolado e com a mistura dos dois canabinoides. A ação antimicrobiana se deu em concentrações altas dos canabinoides, entre 1.500 e 1.000 µg de CBD e THC, com exceção da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que teve sua Concentração Inibitória Mínima de 500 µg de CBD isolado e de CBD+THC.

Os resultados encontrados na avaliação antimicrobiana corroboram o potencial antimicrobiano do CBD e do THC, principalmente contra cepas gram-positivas. Porém, devemos apontar para um fato importante, as doses inibitórias dos canabinoides que promoveram ação antimicrobiana bacteriostática foram altas, comparadas com antibióticos de referência e outros trabalhos com a mesma temática (Appendino et al., 2008; Gildea et al., 2022). Uma hipótese para a discrepância dos valores inibitórios podem ser explicados pela origem dos canabinoides. Assim como apontado anteriormente, os métodos de isolamento dos canabinoides e produção dos óleos, podem influenciar na sua bioatividade.

Neste estudo, as cepas dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* tiveram os melhores resultados de inibição pelos canabinoides, todos gram-positivos. Esses gêneros de bactérias podem causar uma variedade de doenças em humanos, sendo necessária uma constante busca por moléculas que limitem o crescimento de espécies dos mesmos (Hanchi et al., 2018). Por exemplo, algumas espécies do gênero *Enterococcus* podem causar infecções graves do trato urinário especialmente em pacientes com cateteres urinários e imunocomprometidos-neoplásicos (Giannakopoulos et al., 2019); endocardite, que é

uma inflamação da camada interna do coração (endocárdio), principalmente em pessoas com válvulas cardíacas anormais (Pericás et al., 2015); infecções intra-abdominais, como peritonite e abscessos intra-abdominais; podem causar infecções em feridas cirúrgicas ou outras lesões na pele; pode entrar na corrente sanguínea e causar infecções disseminadas em todo o corpo (Lebreton et al., 2014); além disso, algumas cepas de *Enterococcus* têm mostrado resistência a antibióticos, tornando o tratamento dessas infecções mais desafiador. Uma das espécies desse gênero, *Enterococcus faecium*, está relacionada com uma das principais causas de infecção enterocócica multirresistente. Muitos dos seus isolados patogênicos expressam resistência à vancomicina e a ampicilina (Boccella et al., 2021). Sendo, consideradas mais resistentes a esses antibióticos do que a *Enterococcus faecalis* (Agudelo & Huycke, 2014). O CBD e o THC se mostraram capazes de inibir o crescimento dessas espécies na CIM de 1.000 µg.

O gênero *Streptococcus* é um grupo de bactérias gram-positivas que pode causar diversas doenças em humanos e outros animais, como a faringite estreptocócica, uma infecção na garganta causada pelo *Streptococcus pyogenes* (Ashurst & Edgerley-Gibb, 2023). A escarlatina, uma doença causada pela mesma bactéria da faringite estreptocócica, o *Streptococcus pyogenes*, provoca erupções cutâneas, febre, dor de garganta e língua "em framboesa" (caracterizada por uma língua vermelha com pontos inchados que se assemelham à superfície de uma framboesa) (Silva-Costa et al., 2014). O *Streptococcus pneumoniae* pode causar pneumonia, uma infecção dos pulmões, onde os sintomas incluem tosse, dificuldade respiratória, febre e fadiga (Weiser et al., 2018). Alguns tipos de *Streptococcus* podem causar infecções no trato urinário, incluindo cistite e uretrite (Leclercq et al., 2016). Endocardite bacteriana, que é uma infecção das válvulas cardíacas que pode ser uma condição grave que requer tratamento imediato (Schmalzle, 2020). Alguns *Streptococcus*, como o *Streptococcus pyogenes*, podem causar infecções na pele, como celulite e erisipela (Stevens & Bryant, 2022). Febre reumática, que é uma complicação rara, mas grave, da faringite estreptocócica não tratada, que pode causar inflamação nas articulações, no coração, na pele e em outros órgãos (Pereira et al., 2015). Espécies do gênero *Streptococcus* foram inibidas neste presente estudo, porém, todas acima de 1.000 µg dos canabinoides; apenas a *Streptococcus oralis* teve a CIM de 1.000 µg de CBD.

O gênero *Staphylococcus* possui algumas espécies que são parte normal da microbiota humana, mas outras são patogênicas e podem levar a infecções (Foster, 1996). O *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de infecções da pele, como furúnculos, impetigo, celulite e foliculite (Del Giudice, 2020). Essas infecções geralmente começam como pequenas lesões e podem se agravar se não forem tratadas adequadamente. O *Staphylococcus aureus* também pode causar infecções mais profundas nos tecidos moles, como abscessos e fasciite necrosante, uma infecção grave que pode se espalhar rapidamente (Saliba et al., 2003); infecções respiratórias, como pneumonia, especialmente em pessoas com sistema imunológico enfraquecido ou em ambientes hospitalares (He & Wunderink, 2020); Síndrome do choque tóxico (SCT), uma condição rara, mas potencialmente grave, caracterizada por febre alta, erupção cutânea, queda da pressão arterial e falência de múltiplos órgãos (Silversides & Ferguson, 2010); e endocardite, uma infecção das válvulas cardíacas, que pode ser fatal se não tratada adequadamente (Thompson, 1982). Infecções graves de *Staphylococcus* podem se disseminar pela corrente sanguínea, causando septicemia, uma condição com risco de vida que requer tratamento imediato (Gelatti et al., 2009). É importante notar que o *Staphylococcus aureus* está entre as principais causas de infecções bacterianas em todo o mundo e é frequentemente resistente a múltiplos antibióticos, o que torna o tratamento dessas infecções mais desafiador (Gelatti et al., 2009; Rungelrath & DeLeo, 2021). Outra espécie do gênero que pode causar infecções graves é o *Staphylococcus saprophyticus*, que pode causar infecções do trato urinário, principalmente em mulheres jovens sexualmente ativas; também é responsável por complicações, incluindo pielonefrite aguda, uretrite, epididimite e prostatite (Ehlers & Merrill, 2022). Aqui, obtivemos a melhor inibição do crescimento microbiano frente a espécie *Staphylococcus aureus* (CIM de 500 µg de CBD e CBD+THC.)

Um dos primeiros trabalhos neste contexto avaliou o efeito dos canabinoides THC e CBD sobre bactérias gram-positivas em diferentes condições (contra estafilococos e estreptococos). Eles observaram que tanto o THC quanto o CBD foram capazes de inibir e matar as bactérias em baixas concentrações quando cultivadas em caldo puro, na faixa de 1-5 µg/ml. No entanto, quando o caldo foi enriquecido com soro ou sangue, a atividade antibacteriana dos canabinoides

diminuiu significativamente (CIM 50 µg/ml), indicando que eles podem ser inativados por componentes do plasma (Van Klingerem & Ten Ham, 1976).

As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA), devido a sua relevância clínica atual, são testadas em vários estudos que buscam meios de inviabilizá-las. Appendino e colaboradores (2008), realizou um dos primeiros trabalhos de avaliação do potencial antimicrobiano dos canabinoides sobre esse táxon. Utilizando cinco tipos de canabinoides (canabidiol, canabicromeno, canabigerol delta-9-tetrahydrocannabinol e canabinol) e foi verificado que todos possuíam uma potente atividade contra uma variedade de cepas *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (Appendino et al., 2008).

Na triagem inicial, feita com a dose de 1.500 µg testamos o efeito do CBD e do THC, isolados e em combinação, contra duas cepas do gênero *Salmonella*: *S. anatum* ATCC 9270 e *S. enteritidis* ATCC 13076, porém, as duas cepas demonstraram crescimento após 24 horas de incubação. Resultados pouco promissores com bactérias gram-negativas são comuns na literatura, porém, o CBD se mostra o mais promissor, entre as duas moléculas. Um estudo experimental avaliou a atividade antibacteriana de um extrato de CBD contra duas cepas de *Salmonella*: *S. typhimurium* e *S. newington*. Os autores usaram um método de microdiluição em caldo para testar diferentes concentrações do extrato (1,25; 0,125; 0,0125; e 0,00125 µg/mL) e compararam com um antibiótico padrão (ampicilina). Eles mediram a densidade óptica das culturas bacterianas a cada hora por 6 horas, usando um espectrômetro. Eles descobriram que o extrato de CBD foi capaz de reduzir significativamente a densidade óptica das culturas de *S. typhimurium* e *S. newington* em todas as concentrações testadas, exceto pela mais baixa (0,00125 µg/mL), que mostrou um aumento da densidade óptica em *S. typhimurium*, sugerindo uma possível resistência bacteriana. Eles calcularam que a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de CBD foi de 0,125 µg/mL para *S. typhimurium* e 0,0125 µg/mL para *S. newington*, indicando que *S. newington* foi mais sensível ao extrato de CBD do que *S. typhimurium*. Eles concluíram que o extrato de CBD tem potencial para ser usado como um agente antibacteriano natural contra *Salmonella*, e que mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação e a eficácia in vivo (Gildea et al., 2022).

Autores sugerem que canabinoides não fenólicos são mais ativos, no contexto antimicrobiano, do que os canabinoides fenólicos, sugerindo que a presença do grupo hidroxila na posição 1 do anel aromático reduz a atividade antibacteriana (Appendino et al., 2008). Porém, devemos levar em consideração que isso não é um padrão e focar em mais estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* com derivados da *C. sativa* de diferentes origens para se chegar a uma conclusão mais clara sobre as suas aplicações no contexto antimicrobiano.

7. CONCLUSÕES

Por fim, concluo que a presente pesquisa lança luz sobre as propriedades farmacológicas da *Cannabis sativa* L., especialmente no que diz respeito aos canabinoides CBD e THC. E confirma, em parte, a hipótese inicial do trabalho. Os experimentos realizados revelaram uma notável baixa toxicidade em relação às células sanguíneas humanas, respaldando a segurança potencial dessas substâncias. Embora tenham demonstrado uma atividade antioxidante limitada, a combinação de CBD e THC apresentou uma dinâmica mais robusta na proteção contra a oxidação, sugerindo um potencial promissor para futuras aplicações antioxidantes. A atividade antimicrobiana exibida pelos canabinoides, embora predominantemente bacteriostática, realça sua capacidade de interação com cepas bacterianas, indicando um papel relevante no campo da pesquisa antimicrobiana. No entanto, os resultados destacam a necessidade de considerar variações nas concentrações e nas cepas avaliadas ao interpretar as atividades observadas. Este estudo contribui, assim, de maneira significativa para o entendimento científico das propriedades da *C. sativa* L., reforçando a importância contínua da pesquisa nesta área e incentivando um enfoque seguro e benéfico na exploração desses compostos na medicina contemporânea.

REFERÊNCIAS

ABU-SAWWA, R.; SCUTT, B.; PARK, Y. Emerging use of Epidiolex (Cannabidiol) in epilepsy. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 485-499, 2020. DOI: 10.5863/1551-6776-25.6.485.

ADHIKARY, D. et al. Medical cannabis and industrial hemp tissue culture: present status and future potential. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 627240, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.627240.

AGÊNCIA BRASIL. CFM publica nova norma sobre prescrição de canabidiol. Brasília, DF, 14 out. 2022. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2022-10/cfm-publica-nova-norma-sobre-prescricao-de-canabidiol>. Acesso em: 18 ago. 2023.

AGUDELO HIGUITA, N. I.; HUYCKE, M. M. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In: GILMORE, M. S. et al. (Ed.). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: **Massachusetts Eye and Ear Infirmary**, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ALBERTS, B. et al. Biologia molecular da célula. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003. DOI: 10.1590/S1415-790X2003000200009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 17, de 6 de maio de 2015. Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1(86), p. 44-56, 8 maio 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2015/rdc0017_06_05_2015.pdf. Acesso em: 01 ago. 2023.

APPENDINO, G. et al. Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: a structure-activity study. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1427-1430, 2008. DOI: 10.1021/np8002673.

APPENDINO, G. The early history of cannabinoid research. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, v. 31, p. 919-929, 2020. DOI: 10.1007/s12210-020-00956-0.

ASHURST, J. V.; EDGERLEY-GIBB, L. Streptococcal pharyngitis. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525997/>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ATALAY, S.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, art. 21, 2019. DOI: 10.3390/antiox9010021.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 200-216, 2021. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z.

BASKURT, O. K.; HARDEMAN, M. R.; RAMPLING, M. W. Handbook of hemorheology and hemodynamics. Amsterdam: **IOS Press**, 2007.

BAUTISTA, J. L.; YU, S.; TIAN, L. Flavonoids in Cannabis sativa: biosynthesis, bioactivities, and biotechnology. **ACS Omega**, v. 6, n. 8, p. 5119-5123, 2021. DOI: 10.1021/acsomega.1c00318.

BHARGAVA, S. et al. The hemolyzed sample: to analyse or not to analyse. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 232-238, 2020. DOI: 10.1007/s12291-019-00821-4.

BLASKOVICH, M. A. T. et al. The antimicrobial potential of cannabidiol. **Communications Biology**, v. 4, art. 7, 2021. DOI: 10.1038/s42003-020-01530-y.

BOCELLA, M. et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species: A Retrospective Cohort Study in Italy. **Antibiotics** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 12, p. 1552, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10121552.

BONFÁ, L.; VINAGRE, R. C. O.; FIGUEIREDO, N. V. Uso de canabinóides na dor crônica e em cuidados paliativos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 1, p. 60-75, jan./fev. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/rba/a/ZWVq3GBC3FnxqDLyX7jKck/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

BOOTH, J. K.; BOHLMANN, J. Terpenes in Cannabis sativa - From plant genome to humans. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 284, p. 67-72, 2019. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.03.022.

BRAND, E. J.; ZHAO, Z. Cannabis in Chinese Medicine: Are Some Traditional Indications Referenced in Ancient Literature Related to Cannabinoids? **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 108, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00108.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM nº 2.324, de 11 de outubro de 2022. Aprova o uso do canabidiol para o tratamento de epilepsias da criança e do adolescente refratárias às terapias convencionais na Síndrome de Dravet e Lennox-Gastaut e no Complexo de Esclerose Tuberosa. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 out. 2022. Seção 1, p. 140-141. Disponível em: <https://in.gov.br/web/dou/-/resolucao-cfm-n-2.324-de-11-de-outubro-de-2022-435843700>. Acesso em: 18 ago. 2023.

BRASIL. Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006. Institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas - Sisnad; prescreve medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas;

estabelece normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas; define crimes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2006.

CÂMARA DOS DEPUTADOS. Projeto autoriza veterinários a prescrever produtos à base de Cannabis sativa. 2021. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/729824-projeto-autoriza-veterinarios-a-prescrever-produtos-a-base-de-cannabis-sativa/>. Acesso em: 18 ago. 2023.

CARIAS, R. B.; BOROJEVIC, R.; GRANJEIRO, J. M. Obtenção de células humanas certificadas. Um desafio da biometrologia. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 2-12, 2014. DOI: 10.3395/vd.v2n3.311.

CARLINI, E. A.. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 314-317, 2006. DOI: 10.1590/S0047-20852006000400008.

CASARES, L. et al. Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1. **Redox biology**, v. 28, p. 101321, 2020. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101321.

CASTILLO-ARELLANO, J. et al. The Polypharmacological Effects of Cannabidiol. **Molecules**, Basel: MDPI AG, (2023). v. 28, n. 7, p. 3271. DOI: 10.3390/molecules28073271.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Non-clinical reviews. **US FDA Report**. 2018. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210365Orig1s000PharmR.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

CHARITOS, I. A. et al. The Cannabis Spread throughout the Continents and its **Therapeutic Use in History**. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, v. 21, n. 3, p. 407-417, 2021. DOI: 10.2174/1871530320666200520095900.

CHAYASIRISOBHON, S. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. **The Permanente Journal**, v. 25, p. 1-3, 2020. DOI: 10.7812/TPP/19.200.

CIEŚLA, Ł.; MOADDEL, R. Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. **Natural product reports**, v. 33, n. 10, p. 1131-1145, 2016. DOI: 10.1039/c6np00016a.

CORREIA, C.; ALVES, D. Pesquisadores da UFRJ encontram canabidiol em planta nativa. **Conexão UFRJ**, Rio de Janeiro, 29 jun. 2023. Disponível em: <https://conexao.ufrj.br/2023/06/pesquisadores-da-ufrj-encontram-canabidiol-em-plant-a-nativa/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

CROCCQ, M. A. History of cannabis and the endocannabinoid system. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 223-228, 2020. DOI: 10.31887/DCNS.2020.22.3/mcroccq.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>

DAWIDOWICZ, A. L. et al. CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. **Fitoterapia**, v. 152, p. 104915, 2021. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.104915.

DAWIDOWICZ, A. L. et al. Natural vs. artificial cannabinoid oils: the comparison of their antioxidant activities. **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 2, p. 359-366, 2023. DOI: 10.1007/s00217-022-04121-9.

DEL GIUDICE, P. Skin Infections Caused by Staphylococcus aureus. **Acta dermato-venereologica**, v. 100, n. 9, p. adv00110, 2020. DOI: 10.2340/00015555-3466.

DHADWAL, G.; KIRCHHOF, M. G. The Risks and Benefits of Cannabis in the Dermatology Clinic. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 194-199, 2017. DOI: 10.1177/1203475417738971.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties in Vitro. **Nano Letters**, v. 8, n. 8, p. 2180-2187, 2008. DOI: 10.1021/nl0805615.

DUARTE, A.E. et al. Polyphenolic Composition and Evaluation of Antioxidant Activity, Osmotic Fragility and Cytotoxic Effects of Raphiodon echinus (Nees & Mart.) Schauer. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 2, 2016. DOI: 10.3390/molecules21010002.

DUVALL, C. S. A brief agricultural history of cannabis in Africa, from prehistory to canna-colony. **EchoGéo** [online], n. 48, 2019 [consultado em 11 ago. 2023]. Disponível em: <http://journals.openedition.org/echogeo/17599> ; DOI: <https://doi.org/10.4000/echogeo.17599>.

DZIWENKA, M.; DOLAN, L.; MITCHELL, J. Toxicological safety of VOHO Hemp Oil; a supercritical fluid extract from the aerial parts of hemp. **PLOS ONE** [online], v. 16, n. 12, p. e0261900, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0261900.

EHLERS, S.; MERRILL, S. A. Staphylococcus saprophyticus Infection. In: StatPearls [online]. **StatPearls Publishing**, 2022 [consultado em 24 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470579/>.

ELIKKOTIL, J. et al. The analgesic potential of cannabinoids. **Journal of opioid management**, v. 5, n. 6, p. 341-357, 2009.

ELOFF, J. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica** [online], v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998. DOI: 10.1055/s-2006-957563.

FARID, Y.; BOWMAN, N. S.; LECAT, P. Biochemistry, Hemoglobin Synthesis. In: StatPearls [online]. **StatPearls** Publishing, 2023 [consultado em 24 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536912/>.

FARZAEI, M. H. et al. Poisoning by Medical Plants. **Archives of Iranian medicine**, v. 23, n. 2, p. 117-127, 2020.

FOSTER, T. Staphylococcus. In: BARON, S. (Ed.). Medical Microbiology [online]. 4.ed. **University of Texas Medical Branch at Galveston**, 1996 [consultado em 24 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>.

G1.STF retoma em 23 de agosto julgamento sobre porte de drogas para consumo próprio. **G1**, 17 ago. 2023. Disponível em: <https://g1.globo.com/politica/noticia/2023/08/17/stf-marca-para-23-de-agosto-julgamento-sobre-porte-de-drogas-para-consumo-proprio.ghtml>. Acesso em: 18 ago. 2023.

GARBERG, H.T. et al. High-dose cannabidiol induced hypotension after global hypoxia-ischemia in piglets. **Neonatology**, v. 112, p. 143-149, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000471786>.

GAUDÊNCIO, J. da S.; RODRIGUES, S. P. J.; MARTINS, D. R. Indígenas brasileiros e o uso das plantas: saber tradicional, cultura e etnociência. **Khronos** [online], n. 9, p. 163-182, 2020. DOI: <https://doi.org/10.11606/khronos.v0i9.171134>.

GELATTI, L. C. et al. Sepse por Staphylococcus aureus resistente à metilicina adquirida na comunidade no sul do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de **Medicina Tropical** [online], v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000400019>.

GIANNAKOPOULOS, X. et al. Impact of enterococcal urinary tract infections in immunocompromised - neoplastic patients. **Journal of B.U.ON.**: official journal of the Balkan Union of Oncology [online], v. 24, n. 5, p. 1768-1775, 2019.

GILDEA, L. et al. Cannabis sativa CBD Extract Shows Promising Antibacterial Activity against Salmonella typhimurium and S. newington. **Molecules** (Basel, Switzerland) [online], v. 27, n. 9, p. 2669, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27092669>.

GONTIÈS, B. Maconha: uma perspectiva histórica, farmacológica e antropológica. **MNEME Revista de Humanidade** [online], v. 4, n. 7, 2003.

GRECO, I. et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports** [online], v. 10, p. 13206, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>.

HANCHI, H. et al. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. **Frontiers in Microbiology** [online], v. 9, p. 1791, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01791.

HANEY, M.; HILL, M. Cannabis and Cannabinoids: From Synapse to Society. **Neuropsychopharmacology** [online], v. 43, p. 1-3, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/npp.2017.255>.

HE, H.; WUNDERINK, R. G. *Staphylococcus aureus* Pneumonia in the Community. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine** [online], v. 41, n. 4, p. 470-479, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709992>.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1378–1384, 2008.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. Aspectos Terapêuticos De Compostos Da Planta *Cannabis sativa*. **Química Nova** [online], v. 29, n. 3, p. 483-489, 2005.

HOORN, E. J.; ZIETSE, R. Diagnosis and Treatment of Hyponatremia: Compilation of the Guidelines. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN** [online], v. 28, n. 5, p. 1340-1349, 2017. DOI: 10.1681/ASN.2016101139.

HUESTIS, M. A. et al. Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. **Current Neuropharmacology** [online], v. 17, n. 10, p. 974-989, 2019. DOI: 10.2174/1570159X17666190603171901.

HUSSAIN, T. et al. Cannabis sativa research trends, challenges, and new-age perspectives. **iScience** [online], v. 24, n. 12, p. 103391, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103391>.

ISEPPI, R. et al. Chemical Characterization and Evaluation of the Antibacterial Activity of Essential Oils from Fibre-Type *Cannabis sativa* L. (Hemp). **Molecules** [online], v. 24, n. 12, p. 2302, 2019. DOI: 10.3390/molecules24122302.

ISORNA, M. et al. Impacto de la legalización del consumo recreativo del cannabis. **Adicciones** [online], v. 0, n. 0, p. 1694, 2022. DOI: <https://doi.org/10.20882/adicciones.1694>.

JAMES, T. R. et al. The in vitro effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on whole blood viscosity, elasticity and membrane integrity. **Journal of Cannabis Research** [online], v. 4, n. 1, p. 15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00126-z>.

JAMWAL, M. et al. Laboratory Approach to Hemolytic Anemia. **Indian Journal of Pediatrics** [online], v. 87, n. 1, p. 66-74, 2020. DOI: 10.1007/s12098-019-03119-8.

JITĂREANU, A. et al. Current Trends in Toxicity Assessment of Herbal Medicines: A Narrative Review. **Processes** [online], v. 11, n. 1, p. 83, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr11010083>.

KARAS, J. A. et al. The Antimicrobial Activity of Cannabinoids. **Antibiotics** [online], v. 9, n. 7, p. 406, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070406>.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** [online], v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.

KUMAR, M. S.; SHARMA, S. A. Toxicological effects of marine seaweeds: a cautious insight for human consumption. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** [online], v. 61, n. 3, p. 500-521, 2021.

LAM, W.; CAI, W.; LI, Y.; XU, Z.; YANG, J. Editorial: Quality control for efficacy and safety of herbal medicinal products. **Frontiers in pharmacology**, v. 14, p. 1162698, 2023. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1162698>.

LAMPRON, M. C.; DESBIENS-TREMBLAY, C.; LOUBAKI, L. In vitro exposure of whole blood to a cannabinoid mixture impairs the quality of red blood cells and platelets. **Blood Transfusion** [online], v. 21, n. 3, p. 240-250, 2023. DOI: 10.2450/2022.0100-22.

LAVIGNE, J. E. et al. Cannabis sativa terpenes are cannabimimetic and selectively enhance cannabinoid activity. **Scientific Reports** [online], v. 11, n. 1, p. 8232, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87740-8>.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: GILMORE, M. S. et al (Eds.). Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [online]. Boston: **Massachusetts Eye and Ear Infirmary**; 2014-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK190427/>.

LECLERCQ, S. Y. et al. Pathogenesis of Streptococcus urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence. **Scientific Reports** [online], v. 6, p. 29000, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep29000>.

LEE, S.; KIM, H.; BEUCHAT, L.R.; KIM, Y.; RYU, J.H. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. **Food microbiology**, v. 90, p. 103489, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103489>

LI, H. et al. Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry** [online], v. 192, p. 112163, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112163>.

LIRA, A. B. et al. Isopropyl Caffeate: A Caffeic Acid Derivative-Antioxidant Potential and Toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** [online], v. 2018, p. 6179427, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/6179427>.

LOPEZ, H. L. et al. Effects of Hemp Extract on Markers of Wellness, Stress Resilience, Recovery and Clinical Biomarkers of Safety in Overweight, But Otherwise Healthy Subjects. **Journal of Dietary Supplements** [online], v. 17, n. 5, p. 561-586, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/19390211.2020.1765941>.

LUKOSE, J. et al. Red blood cells under varying extracellular tonicity conditions: an optical tweezers combined with micro-Raman study. **Biomedical Physics & Engineering Express** [online], v. 6, n. 1, p. 015036, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ab6e1a>.

MACARTHUR CLARK, J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition** [online], v. 120, n.S1, p.S1-S7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114517002227>.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: **ArtMed**, 2016.

MAHMUD, M. S. et al. Antimicrobial and Antiviral (SARS-CoV-2) Potential of Cannabinoids and Cannabis sativa: **A Comprehensive Review**. *Molecules* [online], v. 26, n. 23, p. 7216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26237216>.

MARDEN, M. C.; GRIFFON, N.; POYART, C. Oxygen delivery and autoxidation of hemoglobin. **Transfusion Clinique et Biologique** [online], v. 2, n. 6, p. 473-480, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1246-7820\(05\)80074-6](https://doi.org/10.1016/s1246-7820(05)80074-6).

MARQUES, G. V. L. Síntese e avaliação da atividade antioxidante de derivados e análogos do canabidiol. 2021. **Dissertação** (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

MARQUES-GARCIA, F. Methods for Hemolysis Interference Study in Laboratory Medicine - **A Critical Review**. *EJIFCC* [online], v. 31, n. 1, p. 85-97, 2020.

MARTINENGHI, L.D.; JØNSSON, R.; LUND, T.; JENSSEN, H. Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from Cannabis sativa L. **Biomolecules** [online], v. 10, n. 6, p. 900, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10060900>.

MARX, T.K.; REDDEMAN, R.; CLEWELL, A.E.; ENDRES, J.R.; BÉRES, E.; VÉRTESI, A.; GLÁVITS, R.; HIRKA, G.; SZAKONYINÉ I.P. An Assessment of the Genotoxicity and Subchronic Toxicity of a Supercritical Fluid Extract of the Aerial Parts of Hemp. **Journal of Toxicology** [online], v. 2018, p.8143582, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/8143582>.

MEAD, A. Legal and Regulatory Issues Governing Cannabis and Cannabis-Derived Products in the United States. **Frontiers in Plant Science** [online], v. 10, p. 697, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00697>.

MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES – COMISSÃO NACIONAL DE FISCALIZAÇÃO DE ENTORPECENTES. Cannabis brasileira (pequenas anotações). Rio de Janeiro: **Ministério das Relações Exteriores** – Comissão Nacional de Fiscalização de Entorpecentes, 1957.

MITTAL, R.P.; JAIRAK V. Plant-Derived Natural Alkaloids as New Antimicrobial and Adjuvant Agents in Existing Antimicrobial Therapy. **Current drug targets** v.20 n14 p1409–1433 2019 <https://doi.org/10.2174/1389450120666190618124224>

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. da S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842004000100004>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NASCIMENTO, A. G.; DALCIN, M. F. Uso terapêutico da Cannabis sativa: Uma breve revisão. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 27, n. 2, p. 164-169, 2019.

NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A. Plant antimicrobial peptides. **Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 181-196, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>.

NGUYEN, T.L.A.; BHATTACHARYA, D. Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 27, n. 8, p. 2494, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27082494>

NISSEN, L. et al. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, v. 81, n. 5, p. 413-419, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.11.010>. Acesso em: 24 ago. 2022.

OH, J. Y. et al. Damage to red blood cells during whole blood storage. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 89, n. 2, p. 344-350, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000002730>.

OLCHOWIK-GRABAREK, E.; MAKAROVA, K.; MAVLYANOV, S.; et al. Comparative analysis of BPA and HQ toxic impacts on human erythrocytes, protective effect mechanism of tannins (*Rhus typhina*). **Environ Sci Pollut Res.**, v. 25, p. 1200–1209, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0520-2>.

OLIVEIRA, M.B.de; VIEIRA, M.S.; AKERMAN, M.O. autocultivo de Cannabis e a tecnologia social. **Saúde e Sociedade** [online]. v29, n3, p.e190856, (2020). Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0104-12902020190856>>. Acesso em: 16 ago. (2023). ISSN 1984-0470.

OMAYE, S. T. Introduction to food toxicology. Pesticide, Veterinary and Other Residues in **Food**, p. 1-26, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781855739109.1>.

OSHIRO, C. A.; CASTRO, L. H. M. Cannabidiol and epilepsy in Brazil: a current review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 80, n. 5, p. 182-192, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0004-282X-ANP-2022-S137>.

PACULA, R. L.; SMART, R. Medical Marijuana and Marijuana Legalization. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 13, p. 397-419, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032816-045128>.

PAPPAS, A.; MASSOLL, N.A.; CANNON,D.J.Toxicology: past,present,and future.**Ann Clin Lab Sci**.,v29,n4,p253-62,(1999).PMID:10528824.

PARBOOSING,R.et al.Cell-based Assays for Assessing Toxicity:A Basic Guide.**Medicinal chemistry** (Shariqah (United Arab Emirates)),v13,n1,p13-21,(2016).Disponível em:<<https://doi.org/10.2174/1573406412666160229150803>>.

PATEL,S.; JOSE,A.; MOHIUDDIN,S.S.Physiology,Oxygen Transport And Carbon Dioxide Dissociation Curve.**In StatPearls**.StatPearls Publishing,(2023).

PELLATI,F.et al.Cannabis sativa L.and Non Psychoactive Cannabinoids:Their Chemistry and Role against Oxidative Stress,Inflammation,and Cancer.**BioMed research international**,v2018,p1691428,(2018).Disponível em:<<https://doi.org/10.1155/2018/1691428>>.

PENG, J. et al. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 130, n. 4, p. 439-456, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bcpt.13710>.

PEREIRA, B. Á. de F.; BELO, A. R.; SILVA, N. A. da . Rheumatic fever: update on the Jones criteria according to the American Heart Association review - 2015. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 364-368, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.03.001>.

PERICÁS, J.M.et al.Enterococcal endocarditis revisited.**Future microbiology**,v10,n7,p1215-1240,(2015).Disponível em:<<https://doi.org/10.2217/fmb.15.46>>.

PHILLIPS, J.; HENDERSON, A. C. Hemolytic anemia: evaluation and differential diagnosis. **American Family Physician**, v. 98, n. 6, 2018, p. 354-361.

PHILLIPS,J.; HENDERSON,A.C.Hemolytic Anemia:Evaluation and Differential Diagnosis.**American family physician**,v98,n6,p354-361,(2018).

PODSIEDLIK,M.; MARKOWICZ-PIASECKA,M.; SIKORA,J.Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment,cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery.**Chemico-biological interactions**,v332,p109305,(2020).Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109305>>.

PRIBUSH,A.et al.Erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media as studied by conductometry.**Physiological**

Measurement,v34,n2,p139-150,(2013).Disponível em:<<https://doi.org/10.1088/0967-3334/34/2/139>>.

PROCACCIA, S. et al. Cannabis for Medical Use: Versatile Plant Rather Than a Single Drug. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 894960, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.894960>.

RAJ, V. et al. Assessment of antiviral potencies of cannabinoids against SARS-CoV-2 using computational and in vitro approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 474-485, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.020>.

RAJA, A. et al. Attenuation of Oxidative Stress by Cannabinoids and Cannabis Extracts in Differentiated Neuronal Cells. **Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 13, n. 11, p. 328, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph13110328>.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI,S.M.M.; FREITAS,J.C.Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*.**Toxicon**,v35,n2,p305-309,(1997).Disponível em:<[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00151-4)>.

RANSING,R.et al.Current state of cannabis use,policies,and research across sixteen countries:cross-country comparisons and international perspectives.**Trends in psychiatry and psychotherapy**,v44,nSuppl 1,p20210263,(2022).Disponível em:<<https://doi.org/10.47626/2237-6089-2021-0263>>.

REZENDE, M. A. P.; FERRAZZA, D. A.; PRADO, G. A. S. Um estudo sobre o paradigma proibicionista e a (des)criminalização da maconha no Brasil. **Revista Polis e Psique**, v. 11, n. 2, p. 179-199, 2021. Disponível em: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2238-152X2021000300010&lng=pt&nrm=iso.

RISS, T. et al. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In: MARKOSSIAN, S.; GROSSMAN, A.; BRIMACOMBE, K. et al. (Eds.). **Assay Guidance Manual** [em linha]. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>. Acesso em: 1 maio 2019.

ROCHA, P. N. Hiponatremia: conceitos básicos e abordagem prática. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 33, n. 2, p. 248-260, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-28002011000200022>.

ROCK, E. M.; PARKER, L. A. Constituents of Cannabis Sativa. In: ROCK, E. M.; PARKER, L. A. (Eds.). **Advances in Experimental Medicine and Biology** [em linha]. Cham: **Springer**, 2021. v. 1264, p. 1-13. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_1.

RODZIEWICZ, P.; KAYSER, O. Cannabis sativa L. –Cannabis. In: NOVAK, J.; BLÜTHNER, W.D. (Eds.). **Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants** [em linha]. Cham: Springer, 2020. v. 12, p. 1-23. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_3.

ROSENKRANTZ, H.; FLEISCHMAN, R.W.; GRANT, R.J. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.58, p.118–131, (1981). Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(81\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(81)90122-8)>.

ROSENKRANTZ, H.; HAYDEN, D. W. Acute and subacute inhalation toxicity of Turkish marihuana, cannabichromene, and cannabidiol in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 375-386, 1979. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(79\)90421-6](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(79)90421-6). Acesso em: 17 ago. 2023.

RUNGELRATH, V.; DELEO, F. R. Staphylococcus aureus, Antibiotic Resistance, and the Interaction with Human Neutrophils. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, n. 6, p. 452-470, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8127>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SALIBA, W. R.; GOLDSTEIN, L. H.; RAZ, R.; MADER, R.; COLODNER, R.; ELIAS, M. S. Subacute necrotizing fasciitis caused by gas-producing Staphylococcus aureus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, v. 22, n. 10, p. 612-614, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-003-1023-2>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SARAFIAN, T. A. et al. Oxidative stress produced by marijuana smoke. An adverse effect enhanced by cannabinoids. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1286-1293, 1999. DOI: 10.1165/ajrcmb.20.6.3424.

SCHECKEL, C. J.; GO, R. S. Autoimmune Hemolytic Anemia: Diagnosis and Differential Diagnosis. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 315-324, 2022. DOI: 10.1016/j.hoc.2021.12.001.

SCHEP, L. J.; SLAUGHTER, R. J.; GLUE, P.; GEE, P. The clinical toxicology of cannabis. The New Zealand Medical Journal, v. 133, n. 1523, p. 96-103, 2020.

SCHMALZLE, S. A. A classic and fatal case of Streptococcus mutans subacute bacterial endocarditis; A now potentially underappreciated disease. **IDCases**, v. 19, e00701, 2020. DOI: 10.1016/j.idcr.2020.e00701.

SCHOENTAL, R. Toxicology of natural products. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 3, n. 4, p. 609-620, 1965. DOI: 10.1016/s0015-6264(65)80209-7.

SCHUEL, H. et al. Cannabinoids reduce fertility of sea urchin sperm. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 65, n. 2, p. 130-136, 1987. DOI: 10.1139/o87-018.

SILVA, A. P. et al. O uso de cannabis como alternativa no tratamento da doença de Alzheimer. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO E HUMANIDADES**, 2., 2022, Online. Anais [...]. João Pessoa: Realize Editora, 2022. p. 1-10. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/86629>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA-COSTA, C.; CARRIÇO, J. A.; RAMIREZ, M.; MELO-CRISTINO, J. Scarlet fever is caused by a limited number of *Streptococcus pyogenes* lineages and is associated with the exotoxin genes *ssa*, *speA* and *speC*. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 3, p. 306-310, 2014. DOI: 10.1097/INF.0000000000000088.

SILVERSIDES, J. A.; LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 5, p. 392-400, 2010. DOI: 10.1007/s11908-010-0119-y.

SIMIYU, D. C.; JANG, J. H.; LEE, O. R. Understanding *Cannabis sativa* L.: Current Status of Propagation, Use, Legalization, and Haploid-Inducer-Mediated Genetic Engineering. **Plants (Basel)**, v. 11, n. 9, p. 1236, 2022. DOI: 10.3390/plants11091236.

SOUZA, D. Z. et al. Roteiro morfológico ilustrado para identificação da *Cannabis sativa* L. **Revista da Perícia Federal**, Ano VII, n. 24, p. 16-22, 2006.

STEVENS, D. L.; BRYANT, A. E. *Streptococcus pyogenes* Impetigo, Erysipelas, and Cellulitis. In: FERRETTI, J.J.; STEVENS, D.L.; FISCHETTI V.A., eds. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. 2nd ed. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022 Oct 8. Chapter 23. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587091/>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

STRUIK, P.C. et al. Agronomy of fibre hemp (*cannabis sativa* L.) in Europe Ind. **Crop Prod.**, v. 11, n. 2-3, p. 107-118, 2000.

TABBARA, I. A. Hemolytic anemias. Diagnosis and management. **The Medical Clinics of North America**, v. 76, n. 3, p. 649-668, 1992. DOI: 10.1016/s0025-7125(16)30345-5.

THOMFORD, N. E. et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061578.

THOMPSON, R. L. Staphylococcal infective endocarditis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 57, n. 2, p. 106-114, 1982.

TOMPA, A.; BALÁZS, P. A toxikológia rövid története – a tapasztalattól a tudományig [Concise history of toxicology - from empiric knowledge to science]. **Orvosi Hetilap**, v. 159, n. 3, p. 83-90, 2018. DOI: 10.1556/650.2018.30950.

TUNG, C.-W. Public databases of plant natural products for computational drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 10, n. 3, p. 191-196, 2014. DOI: 10.2174/1573409910666140414145934.

TURA, M.; MANDRIOLI, M.; GALLINA TOSCHI, T. Preliminary Study: Comparison of Antioxidant Activity of Cannabidiol (CBD) and α -Tocopherol Added to Refined Olive

and Sunflower Oils. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3485, 2019. DOI: 10.3390/molecules24193485.

TURNER, C. E.; ELSOHL, M. A. Biological Activity of Cannabichromene, its Homologs and Isomers. **The Journal of Clinical Pharmacology** [online]. v. 21, n. S1, p. 283s-291s, 1981. [Acessado em 24 de agosto de 2022]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1981.tb02606.x>>.

USDA. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service (2016). Disponível em: <<http://plants.usda.gov/classification.html>>. Acesso em: 26 maio. 2023.

VAN BUREN, T.; ARWATZ, G.; SMITS, A.J. A simple method to monitor hemolysis in real time. **Scientific Reports**, v. 10, n. 5101, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-62041-8.

VAN-DOREN, P. M. The effects of exposure to "synthetic" chemicals on human health: a review. **Risk Analysis**, v. 16, n. 3, p. 367-376, 1996. DOI: 10.1111/j.1539-6924.1996.tb01471.x.

VAN KLINGEREN, B.; TEN HAM, M. Antibacterial activity of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 42, n. 1-2, p. 9-12, 1976. DOI: 10.1007/BF00399444.

VASCONCELOS, I. R. A. Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill. 2015. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015. [Acessado em 24 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://tede.biblioteca.ufpb.br:8080/handle/tede/8639>.

WANG K; FENG X; CHAI L; CAO S; QIU F The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. **Drug metabolism reviews** v49 n2 p139–157 2017 <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1306544>.

WATSON, K. D.; WEXLER, P. Information Resources in Toxicology. 4. ed. Amsterdam: **Elsevier**, 2009. p. 11-29.

WEISER, J. N.; FERREIRA, D. M.; PATON, J. C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 355-367, 2018. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8.

WOLFF, V. et al. Tetrahydrocannabinol induces brain mitochondrial respiratory chain dysfunction and increases oxidative stress: a potential mechanism involved in cannabis-related stroke. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 323706, 2015.

YIN, H. Y. et al. Commercial Cannabinoid Oil-Induced Stevens-Johnson Syndrome. **Case Reports in Ophthalmological Medicine** [online]. v. 2020, p. 1-5, 2020. [Acessado em 24 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/6760272>.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Mass spectrometry-driven drug discovery for development of herbal medicine. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 37, n. 3, p. 307-320, 2018. DOI: 10.1002/mas.21529.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 153-157, 2006. DOI: 10.1590/S1516-44462006000200015.