



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO IMPACTO NA VIABILIDADE CELULAR DE
NEUROBLASTOMAS DOS PRODUTOS DE PIRÓLISE DE
MISTURAS HERBAIS CONTENDO CANABINÓIDES SINTÉTICOS**

Trabalho submetido por
Mário Alexandre Silvestre de Sousa Moreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2014



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO IMPACTO NA VIABILIDADE CELULAR DE
NEUROBLASTOMAS DOS PRODUTOS DE PIRÓLISE DE
MISTURAS HERBAIS CONTENDO CANNABINÓIDES SINTÉTICOS**

Trabalho submetido por
Mário Alexandre Silvestre de Sousa Moreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Alexandre Quintas

outubro de 2014

Dedicatória

Para a minha família e amigos, que me acompanharam ao longo deste período importante.

Agradecimentos

Quero agradecer à minha família por todo o apoio, paciência e disponibilidade.

Um agradecimento a todos os colegas que me acompanharam no curso.

Quero agradecer aos amigos Pedro Quintas, Henrique Martins, Rui Silva, Carlos Pires, Telma Mangerico, Ana Teresa Valério, Catarina Fragata, Zahra Kará, Margarida Esteves, Maria Jorge Costa, Airton Camboa, Rodrigo Costa, Rui Fernandes e Alexandre Rebocho.

Quero agradecer especialmente ao meu amigo João Martins dos Santos, por todo o apoio durante a realização deste estudo.

Um agradecimento especial ao grupo “gente gira”.

Quero agradecer ao Prof. Doutor Alexandre Quintas, pela orientação, disponibilidade e motivação.

Quero agradecer à Joana Couceiro, pela disponibilidade, paciência e toda a ajuda prestada nos ensaios.

Um agradecimento à Rita Soeiro, pela disponibilidade e ajuda ao longo deste projeto.

Resumo

Os primeiros registos da comercialização de misturas herbais contendo canabinóides sintéticos para fins recreativos datam do início da década passada. Desde então tem-se verificado um aumento quer no consumo destas substâncias quer na emergência de novas substâncias. De facto, o número de casos de hospitalização pelo consumo de canabinóides reportados indica um problema sério de saúde pública, agravado pela ausência de conhecimento sobre os efeitos tóxicos destas substâncias assim como dos seus efeitos farmacológicos. Com o objetivo de contribuir para o conhecimento do impacto toxicológico das misturas herbais e considerando que o consumo é feito pela inalação do fumo referidas misturas, foi utilizado um sistema de fumo para a obtenção dos produtos de pirólise dos canabinóides sintéticos. A identificação dos produtos de pirólise foi realizada por GC-MS, e a respetiva quantificação por HPLC-UV. Após a pirólise de 160 mg de “Spice”, contendo 24 mg de JWH-018, no sistema de queima recuperou-se 3,8mg deste composto e quantidades minoritárias de produtos de pirólise, não identificados pela base de dados de Massas. O impacto celular do JWH-018 e dos produtos de pirólise hidrófilos e hidrófobos da “Spice” foi avaliado na linha celular SH-SY5Y, recorrendo ao teste do MTT. O ensaio com MTT na presença das substâncias referidas na concentração de 0.0026 a 20µg/mL, não aponta uma correlação entre a concentração do pirolisado e a morte celular. No entanto, a repetição deste estudo para outras gamas de concentração de pirolisados é necessária para que se possa compreender o impacto dos produtos de pirólise e dos canabinóides sintéticos na viabilidade celular. O presente estudo é um contributo para o desenvolvimento de uma metodologia que permita medir o impacto de Novas Substâncias Psicoactivas na saúde.

Palavras-chave: canabinóides sintéticos, produtos de pirólise, viabilidade celular, SH-SY5Y

Abstract

The first records of the sale of herbal mixtures containing synthetic cannabinoids for recreational purposes date from the beginning of the last decade. Since then, it has been noticed an increase in consumption and emergence of these substances. In fact, the number of hospitalized cases reported by the consumption of cannabinoids indicates a serious public health problem, compounded by the lack of knowledge on the toxic and pharmacological effects of these substances. Aiming to contribute to the knowledge of the toxicological impact of herbal mixtures and considering that consumption is done by inhaling the smoke of the mentioned mixtures, a smoking system was used to obtain the pyrolysis products of synthetic cannabinoids. The identification of the pyrolysis products was done by GC-MS, and the respective quantification by HPLC-UV. Following the pyrolysis of 160 mg of "Spice", containing 24 mg of JWH-018, in the smoking system has been recovered 3,8 mg of this compound and minor amounts of pyrolysis products, not identified by the Mass database. The cell impact of JWH-018 as the impact of the hydrophilic and hydrophobic pyrolysis products were evaluated on the SH-SY5Y cell line using the MTT assay. The MTT assay in the presence of these substances in a concentration ranging from 0.0026. to 20µg/mL, does not indicate a correlation between the concentration of pyrolyzed and cell death. However, similar assays with other ranges of pyrolyzed concentrations are necessary to understand the impact of pyrolysis products and synthetic cannabinoids in cell viability. This study is a contribution to the development of a methodology to measure the impact of New Psychoactive Substances in health

Keywords: Synthetic cannabinoids, pyrolysis products, cell viability, SH-SY5Y

Índice Geral

1.Introdução	19
1.1 Canabinóides.....	21
1.2 Recetores	24
1.3 Administração	25
1.4 Farmacocinética	25
1.4.1 Biodisponibilidade	25
1.4.2 Absorção.....	26
1.4.3 Distribuição	26
1.4.4 Metabolismo.....	26
1.4.5 Eliminação.....	27
1.5 Efeitos	27
1.5.1 Efeitos relacionados com o abuso de canabinóides sintéticos	27
1.6 Toxicidade	28
1.7 Canabinóides sintéticos na indústria farmacêutica e na medicina.....	28
1.8 Regulação.....	29
1.9 Estudos relevantes.....	30
1.10 Métodos de análise.....	31
1.11 Estudos de viabilidade celular	32
1.12 Pirólise	32
1.13 Objetivos	33
2.Materiais e Métodos	35
2.1 Reagentes	35
2.1.2 Amostra para análise	35
2.2 Pirólise	35
2.3 Identificação das substâncias na solução orgânica por GC-MS	36
2.4 Quantificação do JWH-018 na solução orgânica por HPLC-UV	37

2.4.1 Reta de calibração	37
2.4.2 Validação do método.....	38
2.5 Cultura celular.....	38
2.6 Estudo de viabilidade celular	39
2.6.1 Amostra	39
2.6.2 Ensaio MTT.....	39
2.6.3 Validação do método.....	40
3. Resultados e Discussão	41
3.1 Identificação da amostra por GC-MS	41
3.2 Quantificação do JWH-018 na amostra por HPLC-UV	42
3.2.1 Reta de Calibração	42
3.2.2 Amostra	43
3.3 Ensaio com MTT	46
4. Conclusão	47
5. Bibliografia.....	49

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Embalagens de misturas herbais ou "incenso".	19
Figura 2 - Novas substâncias Psicoativas (NSP) reportadas	20
Figura 3 - Moléculas dos fitocanabinóides tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC), canabidiol (CBD) e canabinol (CBN)	21
Figura 4 - Estrutura química da anandamida e do 2-Araquidoilglicerol (2-AG)	22
Figura 5 – Molécula de Δ^9 -THC, fitocanabinóide pertencente ao grupo de canabinóides clássicos; molécula de HU-210, canabinóide sintético pertencente ao grupo dos canabinóides clássicos; molécula de ciclohexilfenol (CP-47,497), canabinóide sintético pertencente ao grupo de canabinóides não-clássicos e molécula de AM-4030, canabinóide sintético pertencente ao grupo de canabinóides híbridos	23
Figura 6 - Canabinóide sintético JWH-018 (aminoalquiloindólico)	24
Figura 7 - Medicamentos que contêm canabinóides na sua composição	29
Figura 8 - Embalagem de Spice utilizado como amostra	35
Figura 9 - Sistema para obtenção dos produtos de pirólise da amostra de spice.	36
Figura 10 – Cromatograma e espectro de massa correspondente ao pico com tempo de retenção 19,216 min obtidos por GC-MS na análise da amostra (solução em DMSO a 100% do extrato resultante da armadilha com clorofórmio).	42
Figura 11 – Fragmentação do ião molecular a m/z 341.1 (JWH-018).	42
Figura 12 - Retra de calibração do JWH-018 com respectiva equação; obtida através das médias das áreas determinadas por HPLC-UV.	43
Figura 13 – Cromatograma (1ª corrida) obtido através da análise da amostra por HPLC-UV, tempos de retenção e áreas dos respectivos picos.	44
Figura 14 - Cromatograma (2ª corrida) obtido através da análise da amostra por HPLC-UV, tempos de retenção e áreas dos respectivos picos.	44
Figura 15 - Cromatograma (3ª corrida) obtido através da análise da amostra por HPLC-UV, tempos de retenção e áreas dos respectivos picos.	45
Figura 16 - Viabilidade celular (média das percentagens de MTT reduzido) para cada uma das soluções-amostra.	46
Tabela 1 - Áreas, médias e desvios padrão correspondentes aos padrões de JWH-018 obtidos por HPL	43

Lista de abreviaturas

Δ^9 – THC	delta-9-tetra-hidrocanabinol
2-AG	2-araquidoilglicerol
AM-4030	9-(hidroximetil)-6-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]-6-metil-3-(2-metil-octano-2-yl)-6a,7,8,9,10,10a-hexahidrobenzo[c]cromeno-1-ol
AM-694	(1-[(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-(2-iodofenil)metanona)
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CB1	Recetor Canabinóide 1
CB2	Recetor Canabinóide 2
CBD	Canabidiol
CBN	Canabinol
CP-47,497	(5-(1,1-dimetil-heptil)-2-[(1R,3S)-3-hidroxiciclohexil]-fenol)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
GC-MS	Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepático
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa
HU-210	(1,1-dimetil-heptil-1-hidroxitetra-hidrocanabinol)
JWH-018	(naftalen-1-il(1-pentilindol-3-il)metanona)

JWH-022	(naftalen-1-il(2-(pent-4-enil)-1H-indol3-il)metanona)
JWH-073	(1-butil3-(1-naftoíl)indol)
JWH-081	(1-pentil3-(4-metoxi1-naftoil)indol)
JWH-122	(1-pentil3-(4-metil1-naftoíl)indol)
JWH-175	(1-pentilindol-3-il)naftoíl-1-il-metano)
JWH-200	(1-[2-(4-morfolino)etil]-3-(1-naftoíl)indol)
JWH-210	(1-pentil3-(4-etil1-naftoil)indol)
JWH-250	(1-pentil3-(2-metoxifenilacetil)indol)
JWH-251	(2-(2-metilfenil)-1-(1-pentil1H-indol3-il)metanona)
JWH-398	(1-pentil3-(4-cloro1-naftoíl)indol)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NSP	Novas Substâncias Psicoativas
PBS	Tampão fosfato-salino
RAPG	Recetores acoplados a proteínas G
RCS-4	2-(4-metoxifenil)-1-(1-pentil-indol-3-il)metanona
RMS	Ressonância Magnética Nuclear
THC	Tetra-hidrocanabinol

TR146	Linha celular humana de carcinoma escamoso do bordo lingual
U2OS	Linha celular humana epitelial de osteossarcoma
UGT's	UDP-glucosiltransferases
UNODC	Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crime
WIN-55,212-2	(R)-(+)-[2,3-di-hidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirolo[1,2,3-di]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona)

1. Introdução

Os produtos “spice”, designados por “incensos”, apresentam embalagens coloridas (figura 1) com o rótulo “Impróprio para consumo humano”. Estes contêm entre 0.5 a 3g de misturas de ervas de cor castanha esverdeada. As ervas descritas como ingredientes incluem *Pedicularis densiflora*, *Nymphacea caerulea*, *Leonotis leonurus*, *Leonurus sibiricus*, *Carnavalia maritima* e *Zornia latifoli* (United nations Office on Drugs and Crime, 2014a) não referindo qualquer substância sintética na sua composição. As embalagens podem ostentar a indicação de produzirem efeitos semelhantes aos da canábida e, em alguns casos, a potência da mistura produz efeitos psicoativos superiores aos da própria Canábida sativa L. Deste modo o utilizador pode acreditar estar a consumir um produto cujos efeitos se devem apenas à mistura natural de ervas quando o produto contém aditivos sintéticos (Vardakou, Pistos, & Spiliopoulou, 2010).



Figura 1 - Embalagens de misturas herbais ou "incenso" (Clark, 2013).

Inicialmente, a aquisição deste produto era realizada através de sítios na internet. Mais tarde, com o aumento de popularidade, as misturas herbais passaram a ser comercializadas em lojas conhecidas por “headshops” ou “smartshops”, onde era permitida a venda destes produtos a indivíduos com idade superior a 18 anos.

As misturas de ervas conhecidas como “spice” estão disponíveis em países europeus desde 2004, no entanto, foi reportado um aumento do consumo destes produtos a partir

de 2008, ano em que foram publicitados em jornais e televisão alemã como substitutos legais da canábis, aumentando a popularidade do produto (UNODC, 2014a). Em 2008, vários laboratórios revelaram que os efeitos psicoativos das misturas se deviam à presença de uma ou mais substâncias que induzem efeitos semelhantes aos da canábis (canabimiméticas). Estas substâncias são designadas por canabinóides sintéticos (Wiley, Marusich, & Huffman, 2014). Foram encontrados em misturas herbais provenientes da Europa os canabinóides sintéticos JWH-018, JWH-073, JWH-398, JWH-250; HU-210; CP-47,497 (Vardakou *et al.*, 2010).

No período de 2008 a 2013 foram reportadas 348 novas substâncias psicoativas (NSP) em 94 países, dos quais 28% representavam canabinóides sintéticos (figura 2). Novas moléculas apareceram no mercado após a proibição da primeira geração de substâncias, revelando o esforço dos fornecedores em desenvolver moléculas estruturalmente similares para evitar a identificação e regulamentação das mesmas (Lesiak, Musah, Domin, & Shepard, 2014; Tomiyama & Funada, 2014).

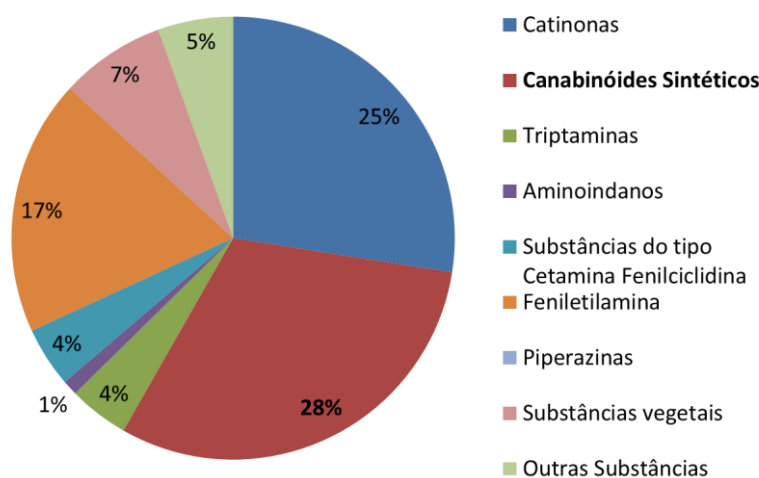


Figura 2 - Novas substâncias Psicoativas (NSP) reportadas globalmente no período 2008-2013 (UNODC, 2014b)

O consumo revelou-se bastante popular entre os utilizadores de várias idades e condições socioeconómicas (UNODC, 2014b), no entanto, a procura é sobretudo realizada pelos utilizadores que necessitam de realizar testes de identificação de estupefacientes à urina, uma vez que os métodos comuns não detetam canabinóides sintéticos (Gunderson, Haughey, Ait-Daoud, Joshi, & Hart, 2014).

1.1. Canabinóides

Os canabinóides são uma família de substâncias com estrutura química diversa, relacionados funcionalmente com o tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC) (figura 3), principal componente psicoativo da planta fêmea da *Cannabis Sativa* (Marijuana) (Mechoulam & Parker, 2013; Sun & Bennett, 2007) , usado de forma medicinal ou recreativa há milhares de anos (Sun & Bennett, 2007).

Dependendo da sua origem, podem ser classificados em três grupos: fitocannabinóides, endocannabinóides e canabinóides sintéticos (Vardakou *et al.*, 2010). Os fitocannabinóides encontram-se em quantidades substanciais na planta da canábis (Hill, Williams, Whalley, & Stephens, 2012), sendo os principais isolados o tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC), o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN) (figura 3) (Vardakou *et al.*, 2010).

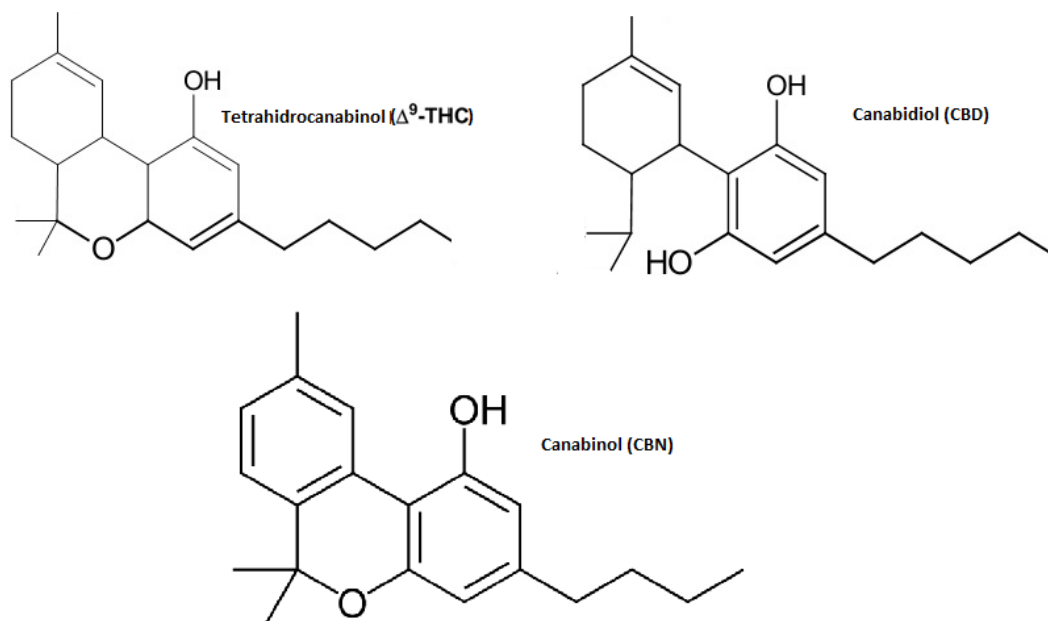


Figura 3 - Moléculas dos fitocannabinóides tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC), canabidiol (CBD) e canabinol (CBN) (Rosenthaler *et al.*, 2014)

Os endocannabinóides pertencem a um grupo de moléculas derivadas do ácido araquidónico designado por eicosanóides no qual se inserem todos os canabinóides endógenos que ocorrem naturalmente *in vivo* (Sun & Bennett, 2007) e os seus análogos sintéticos. Estes atuam como modeladores do sistema endocanabinóide que ajuda a regular o sono, a termorregulação e a resposta ao stress (Ulugol, 2014). Os principais endocannabinóides

são a anandamida, primeiro a ser identificado, e o 2-araquidoilglicerol (2-AG) (figura 4) (Mechoulam & Parker, 2013).

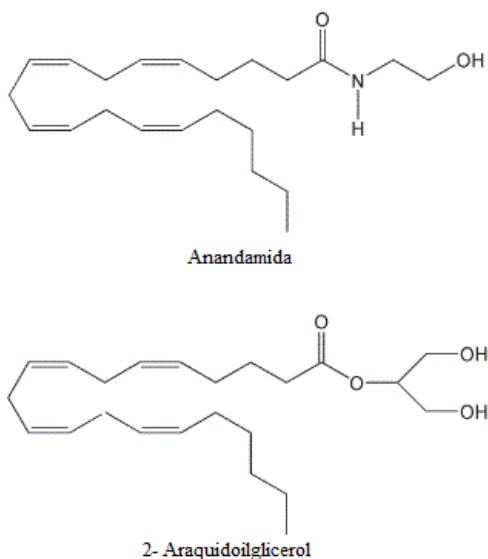


Figura 4 - Estrutura química da anandamida e do 2-Araquidoilglicerol (2-AG) (Honório *et al.*, 2006)

Os canabinóides sintéticos são substâncias com propriedades estruturais que permitem mimetizar os efeitos da canábis nos recetores canabinóides. Este é um grupo de compostos químicos estruturalmente diferentes, mas funcionalmente semelhantes. Alguns destes são mais potentes que o THC pois comportam-se como agonistas completos, com maior afinidade e maior tempo de retenção (Wiley *et al.*, 2014)

Os canabinóides sintéticos apareceram após o isolamento do THC em 1960 (Pertwee, 2005), desde então foram sintetizados análogos e metabolitos, inicialmente com o interesse de estudar as interações destas substâncias a nível neurológico e avaliar o potencial destas substâncias no fabrico de novos produtos farmacêuticos (Wiley *et al.*, 2014).

O HU-210 (1,1-dimetil-heptil-11-hidroxitetra-hidrocanabinol) (figura 5) foi considerado o primeiro análogo sintético do THC, tendo sido desenvolvido por Raphael Mechoulam na Universidade Hebraica de Israel em 1960 (Vardakou *et al.*, 2010). Esta molécula é classificada como canabinóide “clássico” dada a sua semelhança estrutural com o THC (figura 5) (Pacher, 2006). Os canabinóides “não-clássicos” foram desenvolvidos como potenciais analgésicos pela Pfizer na década de 70, designados por “CP” ou ciclohexilfenol (figura 5).

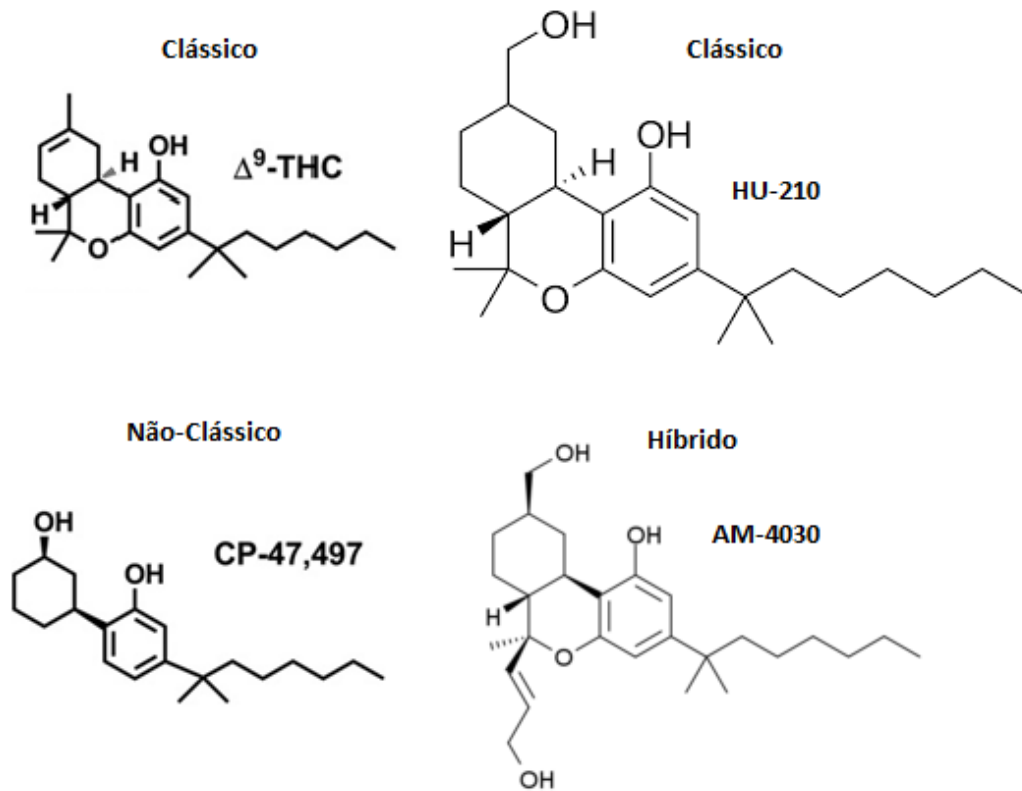


Figura 5 – Molécula de Δ^9 -THC, fitocanabinóide pertencente ao grupo de canabinóides clássicos; molécula de HU-210, canabinóide sintético pertencente ao grupo dos canabinóides clássicos; molécula de ciclohexilfenol (CP-47,497), canabinóide sintético pertencente ao grupo de canabinóides não-clássicos e molécula de AM-4030, canabinóide sintético pertencente ao grupo de canabinóides híbridos (Moosmann *et al.*, 2013)

Alexandros Makriannis sintetizou canabinóides indólicos designados “AM”. Compostos como o AM-4030 (figura 5), partilham as características dos canabinóides “clássicos” e dos “não-clássicos”, sendo assim designados por canabinóides híbridos (Vardakou *et al.*, 2010). O JWH-018 (figura 6), desenvolvido por J.W Huffman em 1994, é o canabinóide sintético mais estudado sendo três vezes mais potente do que o THC (Wiley *et al.*, 2014). É uma das substâncias mais encontrada nos produtos “spice”(Marshall, Kearney-Ramos, *et al.*, 2014), pertencendo à família de canabinóides aminoalquiloindólica. Esta família divide-se em sete grupos segundo a sua estrutura: a) naftoindoles (ex. JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-200, JWH-210, WIN-55,212-2), b) fenilacetilindoles (ex. JWH-250, JWH-251), c) naftilmetilindoles (ex. JWH-175) e d) benzoindoles (ex. AM-694, RCS-4) (UNODC, 2014a.).

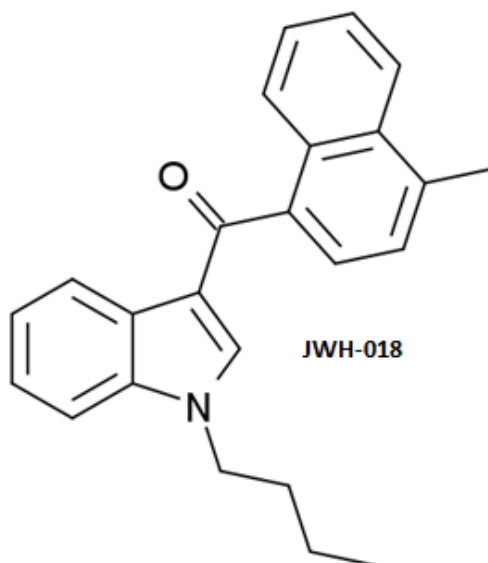


Figura 6 - Canabinóide sintético JWH-018 (aminoalquiloindólico) (Moosmann *et al.*, 2013)

1.2. Recetores

Os efeitos dos canabinóides são gerados através da sua interação com recetores específicos localizados na membrana celular e que fazem parte do sistema endocanabinóide (Vardakou *et al.*, 2010). Estes recetores foram identificados na década de oitenta do século passado e designam-se por CB1 e CB2 (Wiley *et al.*, 2014).

O CB1 é um recetor pré-sináptico que se encontra principalmente nas células do sistema nervoso central. Este recetor está relacionado com os efeitos fisiológicos e psicotrópicos da canábis. Diversos estudos revelaram que alguns canabinóides sintéticos possuem maior afinidade do que o Δ^9 - *THC* para o recetor CB1 assim como maior eficácia neste recetor (Lindigkeit *et al.*, 2009).

O recetor CB2 tem uma homologia de sequência de 44% com o recetor CB1 localizando-se nas células do baço e do sistema imunitário, podendo modelar este sistema (Mechoulam & Parker, 2013).

Ambos são recetores acoplados a proteínas G (RAPG) e são considerados agonistas principais na inibição da atividade da adenilato ciclase através das subunidades Gi/Go α e consequente redução da síntese do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (Demuth & Molleman, 2006).

Estudos sugerem que a estimulação do recetor CB1 inicia a sinalização de mitógenos ativados por proteínas quinase, afetando o movimento, crescimento e diversificação celular (Bosier, Lambert, & Hermans, 2008). A estimulação deste recetor ajuda ainda a mediar o sono, a dor, o apetite e o metabolismo (Mechoulam & Parker, 2013). Na presença de um estímulo contínuo, este recetor é regulado por dessensibilização e internalização (Hsieh, Brown, Derleth, & Mackie, 1999). É sugerido que a dessensibilização é mediada por quinases de RAPG (GRK2 e GRK3) e pela β -arrestina (Bakshi, Mercier, & Pavlopoulos, 2007). O recetor CB1 foi descrito primeiramente nas células neuronais, estando a sua ação ligada à inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem e à ativação dos canais de potássio (Twitchell, Brown & Mackie, 1997). Estudos realizados com recetores gabaérgicos e glutaminérgicos em terminais sinápticos, sugerem que o estímulo do recetor CB1 reduz a excitabilidade celular e a libertação de neurotransmissores (Shen, Piser, Seybold, & Thayer, 1996), assim como também impede as sinapses excitatórias e inibitórias (Mechoulam & Parker, 2013).

1.3. Administração

A administração dos canabinóides sintéticos é feita através da inalação do fumo (Marshall, Brents, *et al.*, 2014). Esta via evita o efeito de primeira passagem, obtendo-se uma absorção rápida e, conseqüentemente, o despoletar rápido dos efeitos psicoativos (Marshall, Kearney-Ramos, *et al.*, 2014). A administração por via oral leva a uma iniciação mais lenta dos efeitos induzidos por estas substâncias devido ao metabolismo que os canabinóides sofrem antes de atingir a corrente sanguínea e através do efeito de primeira passagem (Musselman & Hampton, 2014).

A administração por injeção sistémica faz com que a substância sofra também este efeito (Demuth & Molleman, 2006). A utilização dos canabinóides sintéticos em infusões não é comum dada a baixa solubilidade destas substâncias em água.

1.4. Farmacocinética

1.4.1. Biodisponibilidade

Como referido anteriormente, a biodisponibilidade depende da via de administração. Devido ao carácter lipofílico destes compostos, as soluções aquosas (infusões, chás) provavelmente conterão quantidades muito pequenas da substância. A toma oral irá resultar

numa perda grande de droga por sofrer metabolismo de primeira passagem. (Fantegrossi, Moran, Radominska-pandya, & Prather, 2014).

1.4.2. Absorção

Após a inalação do fumo, o despoletar dos efeitos ocorre em poucos minutos (fenômeno semelhante utilizando canábis). A absorção é instantânea ao nível dos pulmões, ocorrendo distribuição pelo cérebro e restantes órgãos (Mechoulam & Parker, 2013). A nível gástrico, este processo ocorre mais lentamente devido à toma de alimentos e da digestão (Strano-Rossi *et al.*, 2014).

1.4.3. Distribuição

É esperada elevada distribuição destes compostos lipofílicos e a sua possível acumulação no tecido adiposo (com o consumo crónico), contudo, até à data, não existem dados que fomentem esta hipótese (UNODC, 2014a).

1.4.4. Metabolismo

O JWH-018 e outros canabinóides sintéticos sofrem oxidação mediada por enzimas do sistema citocromo P450, nomeadamente pela CYP2C9 e 1A2. Após a oxidação sofrem conjugação com o ácido glucurónico através de enzimas UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), formando compostos que podem ser excretados dado o aumento de solubilidade dos seus metabolitos em meio aquoso (Chimalakonda *et al.*, 2012; Fantegrossi *et al.*, 2014).

Para o JWH-018, os metabolitos formados são na sua maioria compostos mono-hidroxilados e carboxilados. Estudos indicam que vários metabolitos mono-hidroxilados retêm a sua afinidade e efeitos *in vivo* para o recetor CB1 (Fantegrossi *et al.*, 2014). Foram ainda observados para os aminoalquiloindoles a desalquilação da porção azotada, hidroxilação, combinações de hidroxilação e desalquilação ou oxidação da porção terminal N-alquilo com formação do ácido carboxílico correspondente. Adicionalmente, verificou-se a oxidação do hidrocarboneto aromático, resultando na formação de dihidrodiol (Chimalakonda *et al.*, 2012).

1.4.5. Eliminação

Os metabolitos dos canabinóides sintéticos são excretados majoritariamente pela urina, sob a forma de conjugados com o ácido glucurónico ou outros com maior número de grupos polar (Chimalakonda *et al.*, 2012). Uma quantidade desconhecida é excretada nas fezes. No caso do CP-47,497-C8, as concentrações de metabolitos presentes na urina são muito baixas, resultando em dificuldade na deteção do seu consumo, mesmo recorrendo a um equipamento LC-MS (Vardakou *et al.*, 2010)

1.5. Efeitos

O THC exhibe atividade farmacológica diversa *in vivo* e *in vitro* (Wiley *et al.*, 2014). Os efeitos fisiológicos proeminentes do THC e de outros canabinóides incluem a capacidade de induzir a curto prazo um estado de euforia, acompanhado por uma disfunção psicomotora e cognitiva, assim como um aumento da frequência cardíaca, diminuição da pressão arterial e xerostomia (Sun & Bennett, 2007). Os mesmos efeitos são verificados também após intoxicação com canabinóides sintéticos (Schneir, Cullen, & Ly, 2011). Existe evidência de que os canabinóides podem aliviar a espasticidade, diminuir a pressão intraocular associada ao glaucoma, controlar o vômito e náusea derivados da quimioterapia e reduzir a dor (Ben Amar, 2006; Hall, Christie, & Currow, 2005).

1.5.1. Efeitos relacionados com o abuso de canabinóides sintéticos

Os efeitos derivados do abuso de canabinóides sintéticos têm sido reportados como semelhantes aos da canábis (Winstock & Barratt, 2013). Foram observadas alterações na percepção, no humor e psicológicos, como ataques de pânico (Hermanns-Clausen, Kneisel, Szabo, & Auwärter, 2013). Vários utilizadores foram hospitalizados dado o elevado grau de intoxicação. Estes sintomas foram referidos quando os utilizadores eram inexperientes no consumo ou quando eram utilizadas doses elevadas das substâncias (Schneir *et al.*, 2011). Foi também observado o despoletar de episódios psicóticos e o desenvolvimento de esquizofrenia paranóide em sujeitos com fatores de risco (Every-Palmer, 2011). Foram detetados efeitos mais severos do que aqueles observados com o consumo prolongado de canábis. Estes incluem hipotermia, convulsões, taquiarritmias e ansiedade e depressão extremas que podem levar ao suicídio (Ashton & Moore, 2011).

Considerando o rápido desenvolvimento de tolerância, é sugerido que alguns destes compostos possuam elevada capacidade de provocar adição quando comparados com a canábis. Foram reportados sintomas de abstinência e dependência após o consumo repetido de doses elevadas de “spice” (3g/dia) (Seely, Lapoint, Moran, & Fattore, 2012)

1.6.Toxicidade

Especulou-se que alguns dos metabolitos dos aminoquiloindoles (contendo porção naftil) possuem potencial carcinogénico (UNODC, 2014a).

Ainda que o consumo de canábis apresente um nível baixo de toxicidade, não se pode ignorar que alguns canabinóides sintéticos apresentam um risco grave para a saúde quando consumidas em doses elevadas (Koller *et al.*, 2014). Este cenário será mais provável quando a substância se trata de um agonista completo para o recetor CB1, considerando que o THC se comporta como agonista parcial do mesmo recetor (Wiley *et al.*, 2014). Como referido anteriormente, nalguns casos de consumo excessivo destas substâncias, foi indispensável a assistência hospitalar, uma vez que estes indivíduos sofreram espasmos musculares e necessitaram de ventilação artificial (Hermanns-Clausen *et al.*, 2013; Schneir *et al.*, 2011).

1.7.Canabinóides sintéticos na indústria farmacêutica e na medicina

Os canabinóides sintéticos têm sido objeto de estudos sobre as relações estrutura-atividade (SAR) (Wiley *et al.*, 2014), estudos sobre afinidade para os receptores e seus mecanismos de ação. O CP-55,940 (canabinóide não-clássico), WIN-55,212-2 (aminoalquiloindólico) e a anandamida (eicosanoide) são exemplos de substâncias incluídas nos mesmos (Kneisel *et al.*, 2013; Koller *et al.*, 2014; Pertwee, 2005).

Foram desenvolvidos produtos com função terapêutica que incluem THC e CBD natural (Sativex®) (figura 7, A), indicado para o tratamento dos sintomas de espasticidade em doentes com esclerose múltipla, para o tratamento da dor neuropática (Sastre-Garriga, Vila, Clissold & Montalban, 2011) e como adjuvante na diminuição da dor em doentes oncológicos (Johnson, Lossignol, Burnell-Nugent & Fallon, 2013). Também existem produtos com funcionalidades terapêuticas contendo canabinóides sintéticos. O Rimonabant (Acomplia®) (Figura 7, B), antagonista selectivo do receptor CB1, que

tem como efeito a redução do apetite, foi usado no tratamento da obesidade e mais tarde retirado do mercado por desencadear efeitos secundários graves como náuseas, infecções do trato respiratório superior e distúrbios psiquiátricos (Cheung, Cheung & Samaranayake, 2013). Já o Nabilone (Cesamet®) (figura 7, C), canabinóide sintético com atividade anti-hemética, usado no tratamento da náusea e vômito induzidos por quimioterapia (Davis, 2008). Por fim, o Dronabinol (Marinol®) (figura 7, D) que consiste em THC puro sintetizado e é aplicado no tratamento da dor e no tratamento da espasticidade em doentes com esclerose múltipla (Vardakou *et al.*, 2010).



Figura 7 - Medicamentos que contêm canabinóides na sua composição. A- Pulverizador de Sativex® e embalagem respetiva; B- Blister de Acomplia® e embalagem respetiva; C- Cápsulas de Cesamet® e embalagem respetiva; D – Cápsulas de Marinol® e embalagem respetiva. (Cohrs, 2012; Indiamart.com, 2014; Meda Pharmaceuticals Inc, 2009; Reynolds, 2011)

1.8. Regulação

Os canabinóides sintéticos tornaram-se num produto bastante popular dada a capacidade de mimetizar os efeitos da substância de abuso original (canábis) e por ser difícil a sua deteção pelos métodos convencionais. A proibição destas substâncias não impediu a circulação ou a demanda destes produtos após serem banidos pelas autoridades locais, uma vez que novas substâncias emergem escapando à regulação (Ashton & Moore, 2009; Vandrey, Dunn, Fry, & Girling, 2012). A canábis e as substâncias derivadas são controladas internacionalmente através de convenções internacionais (convenção de

1961 e 1971) ao contrário do que sucede nos canabinóides sintéticos (Ashton & Moore, 2009). O carácter legal destas substâncias é definido por cada país. Em Portugal estas substâncias encontram-se proibidas desde 2013 (*Regime jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio das novas substâncias psicoativas*, 2013), mas noutros países começaram a implementar medidas de controlo desde 2009 (Vardakou *et al.*, 2010).

Os governos têm realizado esforços no controlo das drogas sintéticas, na sua importação, comercialização e consumo. No entanto, o problema fundamental reside na química destas substâncias pois pequenas alterações na molécula permitem contornar a lei. Deste modo uma substância ilícita pode tornar-se legal.

1.9. Estudos relevantes

Ao longo dos anos, vários estudos têm sido realizados no âmbito da identificação, caracterização e quantificação de canabinóides sintéticos e derivados presentes em misturas de ervas (Kneisel *et al.*, 2013; Lesiak *et al.*, 2014; Moosmann, Kneisel, Wohlfarth, Brecht, & Auwärter, 2013; Uchiyama, Kikura-Hanajiri, Ogata, & Goda, 2010) e no estudo dos metabolitos (Chimalakonda *et al.*, 2012; Strano-Rossi *et al.*, 2014). Porém, os efeitos secundários e tóxicos destas substâncias mantêm-se ainda incertos. Ainda que estas substâncias tenham sido alvo de investigação desde a década passada (Hadcock *et al.*, 2010; Koller *et al.*, 2014; Marshall, Kearney-Ramos, *et al.*, 2014; Tomiyama & Funada, 2014) , e que algumas destas substâncias se encontrem proibidas, não existem estudos que testem a toxicidade de misturas de canabinóides sintéticos ou de produtos do tipo “spice” ou “incenso”. Em contrapartida, vários estudos analíticos têm revelado a existência de combinações de canabinóides sintéticos e derivados (UNODC, 2014a), o que se poderá traduzir num problema grave de saúde pública, uma vez que não se conhecem todos os efeitos tóxicos e farmacológicos destas substâncias, assim como as implicações das próprias misturas (Musselman & Hampton, 2014).

Num estudo realizado por J. Wiley *et al.* (2014) foi demonstrado que algumas destas substâncias possuem maior ou idêntica afinidade para os recetores CB1 e CB2 quando comparadas com o $\Delta^9 - THC$. Embora tenham sido desenvolvidos com o objectivo de mimetizar os efeitos do $\Delta^9 - THC$, as afinidades e potências detectadas podem resultar

em toxicidades maiores daquelas que são conhecidas para o canábis puro (Wiley *et al.*, 2014).

Em 2013, Koller *et al.* implementaram um estudo sobre os perfis toxicológicos de vários canabinóides sintéticos, onde foram testadas as propriedades citotóxicas, genotóxicas, imunomodulatórias e hormonais em linhas celulares humanas (TR146, MCF-7, HepG2, U2OS). Assim, revelou-se que todos os canabinóides produziram dano membranar nas concentrações $\geq 75-100\mu\text{M}$ para as linhas TR146 e MCF-7. Adicionalmente, o JWH-073 e o JWH-122, induziram migração de DNA na linha HepG2. Não foi presenciada qualquer atividade estrogénica na medula óssea (U2-OS), mas todos os compostos produziram efeitos anti-estrogénicos nas concentrações 2.1 e 23.0 μM . Ainda com os compostos JWH-210 e o JWH-122, foi verificada uma diminuição na libertação das citocinas TNF α e IL-12/23p40 (Koller, Zlabinger, Auwärter, Fuchs, & Knasmueller, 2013).

Em 2014, Tomiyama e Funada estudaram a citotoxicidade de vários canabinóides sintéticos (incluindo o JWH-018) em células neuronais de rato. As substâncias produziram toxicidade num modo dependente da concentração. Ainda foi revelado que estes compostos induziam apoptose celular através de um mecanismo caspase-3-dependente e que este mecanismo era mediado pelo recetor CB1 e não pelo CB2. Deste modo é sugerido que a cascata das caspases pode desempenhar um papel importante na apoptose induzida por canabinóides sintéticos e que o consumo excessivo poderá apresentar problemas graves para a saúde, considerando o dano neuronal e consequentes défices no cérebro que poderão ocorrer (Tomiyama & Funada, 2014).

1.10. Métodos de análise

A análise de produtos à base ervas, que são suspeitas de incluir canabinóides sintéticos, requerem uma técnica capaz de extrair os compostos lipofílicos da matriz, usando solventes orgânicos. As técnicas mais utilizadas para a identificação das substâncias ativas presentes nos compostos incluem a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Quando são encontradas substâncias sem um padrão de fragmentação conhecido, existe a necessidade de as identificar e isolar, normalmente através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) onde se recolhe a fracção

referente ao pico desconhecido e se utiliza a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para identificar a estrutura molecular de uma substância. Esta metodologia é recomendada pelo UNODC (2013), tendo sido aplicada em vários estudos e confirmada a sua eficiência (Grigoryev *et al.*, 2011; Kneisel *et al.*, 2013; Moosmann *et al.*, 2012, 2013; Simolka *et al.*, 2012; Tomiyama & Funada, 2014; Uchiyama *et al.*, 2010; Vardakou *et al.*, 2010).

1.11. Estudos de viabilidade celular

A linha celular de neuroblastomas humanos SH-SY5Y tem sido utilizada em ensaios de viabilidade celular e de citotoxicidade, uma vez que possuem as propriedades funcionais e bioquímicas importantes dos neurónios. Estas células possuem receptores CB1 o que as torna particularmente interessantes para o estudo dos efeitos de canabinóides na viabilidade celular (Carriba *et al.*, 2007; Schönhofen *et al.*, 2014). O método MTT consiste num teste colorimétrico simples e de curta duração na obtenção dos resultados que mede a capacidade intrínseca das desidrogenases mitocondriais na redução do MTT (de cor amarelada) em cristais de formazan (cor roxa). O formazan é um produto cromogénico artificial que pode ser detetado colorimetricamente e estimado por espectrofotometria (Berridge, Herst & Tan, 2005). A percentagem de MTT reduzido (ou produção de formazan) é directamente proporcional à viabilidade celular (Koller *et al.*, 2014).

1.12. Pirólise

A determinação da composição química de alguns dos constituintes do fumo foi realizada por Daw *et al.* (2014). Foi utilizada uma máquina de fumo Borgwaldt KC para analisar os produtos de pirólise JWH-018, JWH-250 e o AM-2201. Foi revelado que o processo de pirólise forma vários produtos ativos nomeadamente o JWH-018. Estes produtos além de serem ativos, possuem, também, uma certa toxicidade associada ainda não esclarecida. Estes produtos de pirólise podem ter diferentes afinidades para os receptores CB1 e CB2 e ainda aumentar ou alterar os efeitos nocivos.

1.13. Objetivos

O crescente ritmo a que as NSP emergem, a incompreensão dos seus efeitos no organismo aliados ao aumento do consumo destas substâncias são problemas de saúde pública atuais. É importante que se desenvolvam métodos que permitam detetar o impacto destas substâncias na saúde.

O presente estudo pretende avaliar o impacto causado pelos produtos de pirólise e canabinóide sintético JWH-018 (obtidos da queima da amostra de spice), na viabilidade da linha celular humana SH-SY5Y através do ensaio com MTT (dano mitocondrial).

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

O metanol utilizado no estudo foi adquirido à VWR®. O ácido fórmico e o acetonitrilo utilizados na identificação dos compostos por HPLC; o dimetilsulfóxido (*DMSO*) e o *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* utilizados na cultura celular, o Triton X-100 a 1% utilizado no controlo positivo para o ensaio de viabilidade celular e o *trypan blue* utilizado na contagem celular foram todos adquiridos à *SigmaAldrich*®. O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) utilizado no ensaio de viabilidade celular foi adquirido à *SigmaAldrich*®. O *Penstrap* (penicilina a 100U/mL + estreptomicina a 0,1mg/mL + L-glutamina a 2mM) e o *Triple Express* utilizados na cultura celular foram adquiridos à *Gibco-Live Technology*®. O soro fetal bovino a 10% foi adquirido à *PAA Laboratories*® GmbH. O PBS (phosphate Buffered Saline) utilizado foi adquirido à *Oxoid*®. A água utilizada foi filtrada através de uma Milipore UV Simplicity da Merck® Milipore. O padrão de JWH-018 utilizado para a realização da reta de calibração foi adquirido à *Lipomed*® da Suíça.

2.1.2 Amostra para análise

A amostra de *spice* (figura 8) foi adquirida antes da proibição destas substâncias em Portugal, numa *smartshop* localizada em Lisboa, em março de 2013.

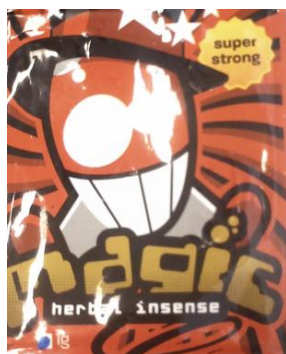


Figura 8 - Embalagem de *Spice* utilizado como amostra

2.2. Pirólise

Considerando o fumo como a principal via de administração de canabinóides sintéticos, foi desenvolvido um sistema (figura 9) para obter os produtos de pirólise da amostra de

spice. Foi utilizada uma solução aquosa de DMEM (30mL na primeira armadilha) para reter as substâncias hidrossolúveis, e clorofórmio (30mL na segunda armadilha) para reter as substâncias lipossolúveis (canabinóides). Foram utilizados 160 mg de amostra, colocados na porção A do dispositivo e incinerados com isqueiro.

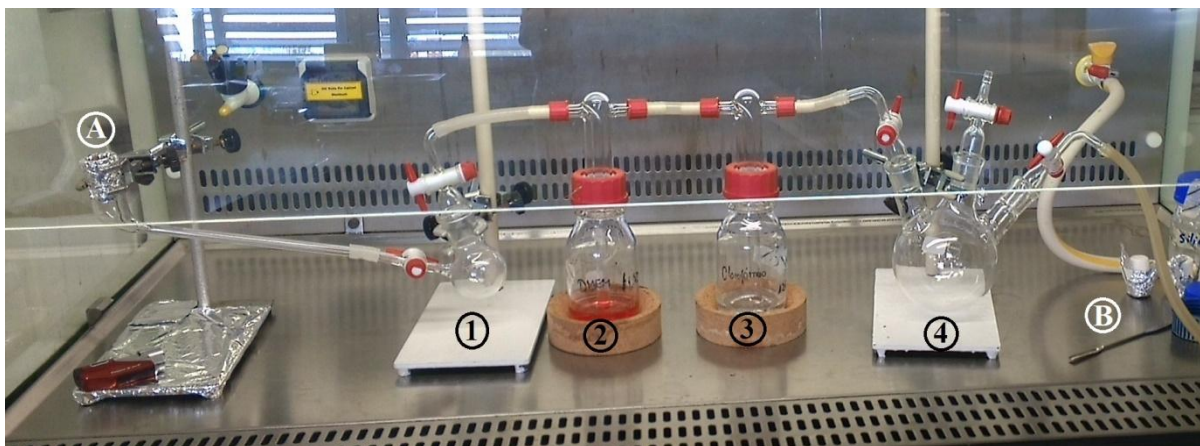


Figura 9 - Sistema para obtenção dos produtos de pirólise da amostra de *spice*. A – Cachimbo (amostra); B – saída para bomba de vácuo; 1,4 – armadilhas de segurança; 2 – armadilha com DMEM; 4 – armadilha com clorofórmio. O fluxo faz-se no sentido de A para B

A solução orgânica da segunda armadilha foi evaporada num rotavapor *Rotary evaporator* modelo N-1000 da *Eyela*® com um banho *Oil bath* GSB-2000, o extrato resultante foi dissolvido em 1mL de DMSO a 100% e depois filtrado com microfiltros de 0,2µm da *VWR*®. A solução resultante foi utilizada para a identificação em GC-MS, quantificação de JWH-018 por HPLC-UV e para a elaboração das soluções-amostra a aplicar nas células SH-SY5Y nos ensaios de viabilidade celular.

A solução aquosa da primeira armadilha foi conservada em frigorífico (6°C) e utilizada posteriormente para perfazer o volume das soluções-amostra acima referidas. Não foi possível a quantificação dos produtos de pirólise nesta solução, uma vez que o equipamento de LC-MS não estava disponível.

2.3. Identificação das substâncias na solução orgânica por GC-MS

O Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crime (2013), recomenda a utilização de GC-MS como um dos métodos de identificação de canabinóides sintéticos. A identificação dos componentes presentes na solução orgânica foi realizada utilizando um equipamento de GC-MS *Agilent Technologies*® 6850 network, acoplado a um

espectrómetro de massa de impacto electrónico (IE+) modelo 5975 VL MSD (Agilent Technologies®). A separação dos analitos foi obtida com uma coluna HP5-MS (30m x 250µm x 0,25µm) (Agilent-J&W Scientific®, Espanha). O hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0mL/min. O programa de temperatura de forno aplicado para a análise da amostra seguiu um perfil 60°C durante 3min, seguindo-se uma rampa de 15°C/min até aos 180°C, e depois uma rampa de 25°C/min até aos 315°C durante 13,6min. O tempo resultante foi de 26 minutos. O GC foi operado sem repartição (modo splitless), com uma purga de 5 min e um injetor a 250°C. Os espectros de massa foram obtidos por impacto electrónico (EI+) a 70 eV, com varrimentos de m/z 30 a 450. A temperatura da interface foi de 280°C. A leitura dos dados obtidos foi efetuada usando o software MassLab 3.2®.

2.4. Quantificação do JWH-018 na solução orgânica por HPLC-UV

A análise por HPLC, para a quantificação de canabinóides sintéticos em misturas herbais, é recomendada pelo Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crime (2013). Foi utilizado um HPLC (Hitachi LaChrom da Merck®) de injeção manual, com um detetor UV L-7400 a um comprimento de onda de 315nm, com uma interface D-7000, um forno de coluna L-7350, uma bomba L-7100 e uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) adquiridos à Merck Milipore. A análise foi realizada com uma fase móvel binária, constituída por um solvente A (solução aquosa de ácido fórmico a 0,1 %) e um solvente B (acetonitrilo). Foi utilizado na análise das substâncias um programa de eluição com um gradiente linear, definido por um gradiente inicial de 70% A (2 min) a 0% A (1 min), a um fluxo de 1mL/min num total de 17 minutos de corrida. A integração das áreas dos picos foi realizada recorrendo ao software D-7000 HSM da Merck®.

2.4.1. Reta de calibração

Elaborou-se uma reta de calibração recorrendo a um padrão de JWH-018. Foram preparadas soluções deste padrão em acetonitrilo nas concentrações de 19; 25,5; 36 e 51µg/mL. Cada solução foi injetada no HPLC em triplicado.

2.4.2. Validação do método

Para cada ponto da reta de calibração foram feitos três replicados. Determinou-se o desvio-padrão das áreas dos picos e respectivas barras de erro para cada concentração. Foram calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de modo a validar o método analítico. O limite de detecção corresponde à mais pequena quantidade de analito que é possível detetar numa amostra. No caso do método utilizado, o LD foi determinado considerando a equação:

$$LOD = \frac{K \times s_{y/x}}{b}, \quad s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_r - y_t)^2}{n - 2}}$$

sendo $s_{y/x}$ o desvio padrão residual, y_r a ordenada real, y_t a ordenada teórica, b o declive da reta e K uma constante que toma o valor de 3,3 para um nível de confiança de 99,7%, assumindo que a distribuição de erros toma a forma de uma gaussiana (Miller e Miller 2005). De forma semelhante é possível determinar o limite de quantificação (LQ) que diz respeito ao mínimo valor quantificável pelo método utilizado, considerando que a constante K toma o valor 10. Para cada concentração foi determinado o desvio-padrão das áreas dos picos.

2.5. Cultura celular

As células humanas de neuroblastoma (linha celular SH-SY5Y), cedidas gentilmente pelo Dr. Tiago Outeiro do Instituto de Medicina Molecular, foram cultivadas em ambiente estéril (em câmara de fluxo laminar vertical) utilizando frascos de cultura de 25cm² (VWR®). Foi utilizado o meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, com L-glutamina a 2mM, Penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 0,1mg/mL. Foi utilizado PBS x1 (phosphate buffered saline) estéril entre as passagens celulares, para remover qualquer resíduo. As células foram cultivadas e semeadas para o ensaio celular quando possuíam uma confluência acima dos 80%. No ensaio de viabilidade celular foi utilizada a oitava passagem de células. As células foram desagregadas do frasco de cultura utilizando *Triple express* (1 min.) e depois homogeneizadas. As células foram contadas utilizando uma célula de *Neubauer* e o corante *Trypan blue* numa diluição 1:5. As células foram semeadas por poço em 200µL de meio de cultura completo a uma concentração

de 1.5×10^5 células/mL para permitir um crescimento celular ótimo. Esta concentração foi determinada previamente pela equipa do laboratório de patologia molecular do Instituto de Ciências da Saúde Egas Moniz, na qual fui inserido para a realização deste estudo. As células foram incubadas por 24 horas em atmosfera humidificada a 37°C e a 5% CO₂.

2.6. Estudo de viabilidade celular

2.6.1. Amostra

As concentrações das soluções-amostra foram de 0,0026; 0,1; 0,2; 1; 2; 10 e 20µg/mL, em produtos de pirólise hidrófobos da mistura herbal contendo JWH-018. Estes valores foram determinados com base na quantificação obtida por HPLC-UV da solução do extrato proveniente da solução orgânica (em DMSO a 100%). Como supramencionado, esta solução foi diluída na solução aquosa (proveniente da primeira armadilha) para perfazer as concentrações calculadas, tendo em conta que as soluções-amostra têm de estar a 0,2% de DMSO pois valores mais elevados são considerados tóxicos para as células (Yuan *et al.*, 2014). Foram colocados por poço 200µL destas soluções e cada solução replicada seis vezes na microplaca. As células foram incubadas por 24h nas condições acima descritas.

2.6.2. Ensaio MTT

Após o período de 24 horas de exposição à amostra, foi removido o meio dos poços da microplaca. Cada poço foi lavado com DMEM aquecido a 37°C para remover qualquer resíduo da amostra. A solução de MTT foi preparada a 0,5mg/mL com meio de cultura. Foram adicionados 200µL desta solução a cada poço. As células foram a incubar por 2,5 horas sob as mesmas condições. Após a incubação, foi retirado o meio de cada poço, e adicionado 200µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan. Foram elaborados um controlo negativo e um positivo. O controlo negativo foi constituído por células com o meio (sem amostra) e a mesma quantidade de solvente (0,2% DMSO), o controlo positivo foi constituído por 0,1% de Triton X-100. Após se observar um aspeto homogéneo, foi lida a absorvância de cada poço a 595nm num leitor de microplacas (modelo

680 da Bio-rad®). A percentagem de MTT reduzido pode ser calculada dividindo a média da absorvância da amostra pelo controlo negativo, e depois multiplicar por 100.

2.6.3 Validação do método

As condições do método utilizado no ensaio foram previamente otimizadas pela equipa referida anteriormente, tendo sido realizado um controlo para detetar a presença de ftalatos nas soluções-amostra. Estes compostos são tóxicos para o crescimento celular (Mankidy, Wiseman, Ma & Giesy, 2013), e podiam ter sido libertadas do plástico das mangueiras utilizadas no sistema de pirólise, enviesando os resultados do ensaio. Como tal, para garantir que a morte celular não foi influenciada por estes compostos, o controlo foi realizado recorrendo ao mesmo sistema de pirólise, não utilizando qualquer amostra na queima. Foi utilizada uma alíquota das soluções extraídas das armadilhas para identificação em GC-MS. Foi verificada a ausência destes compostos nas soluções. Adicionalmente foi utilizado o teste de Dixon para remover possíveis outliers dos resultados obtidos na leitura das absorvâncias do ensaio com MTT. Foi realizado um ensaio independente, não sendo assim possível o tratamento estatístico dos resultados obtidos.

3. Resultados e Discussão

Como referido anteriormente, o presente estudo tem como objectivo avaliar o impacto causado pelos produtos de pirólise e pelo canabinóide sintético JWH-018 (obtidos da queima da amostra de spice), na viabilidade da linha celular humana SH-SY5Y através do ensaio com MTT (dano mitocondrial). Deste modo, foi necessário recorrer a técnicas de identificação e quantificação dos compostos presentes na solução clorofórmica utilizando GC-MS (EI+) e HPLC-UV, respetivamente. São apresentados neste capítulo, os resultados obtidos através dos métodos e a sua discussão, assim como os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular realizado com MTT.

3.1. Identificação da amostra por GC-MS

Com a leitura do cromatograma (figura 10) obtido na análise da amostra por GC-MS, verifica-se a presença de dois picos proeminentes. Estes picos representam dois compostos diferentes presentes na amostra. O pico 2 representa o composto que se encontra em maior abundância na amostra. Pelo espectro de massas correspondente, ao pico com tempo de retenção 19,216min (figura 10), observa-se um fragmento a m/z 341,1 (pico base) correspondente a um ião molecular protonado $[M+H]^+$, um pico correspondente ao ião fragmento naftaleno ($C_{10}H_8$) e um pico a m/z 214,1 correspondente ao ião fragmento $[M-C_{10}H_8]^+$ (figura 11), permitindo a identificação do canabinóide sintético JWH-018, segundo as quebras moleculares apresentadas por (ElSohly e colaboradores, em 2011). Quanto ao pico 1, apenas podemos supor tratar-se de um composto de pirólise ou constituinte da mistura herbal, uma vez que não foi possível a análise do espectro de massa e identificação recorrendo às bibliotecas utilizadas, pelo que seria necessário uma análise extensa para se compreender a estrutura deste composto. O JWH-018 é o composto mais abundante na solução-amostra, estando 4,5 vezes mais concentrado que o composto desconhecido.

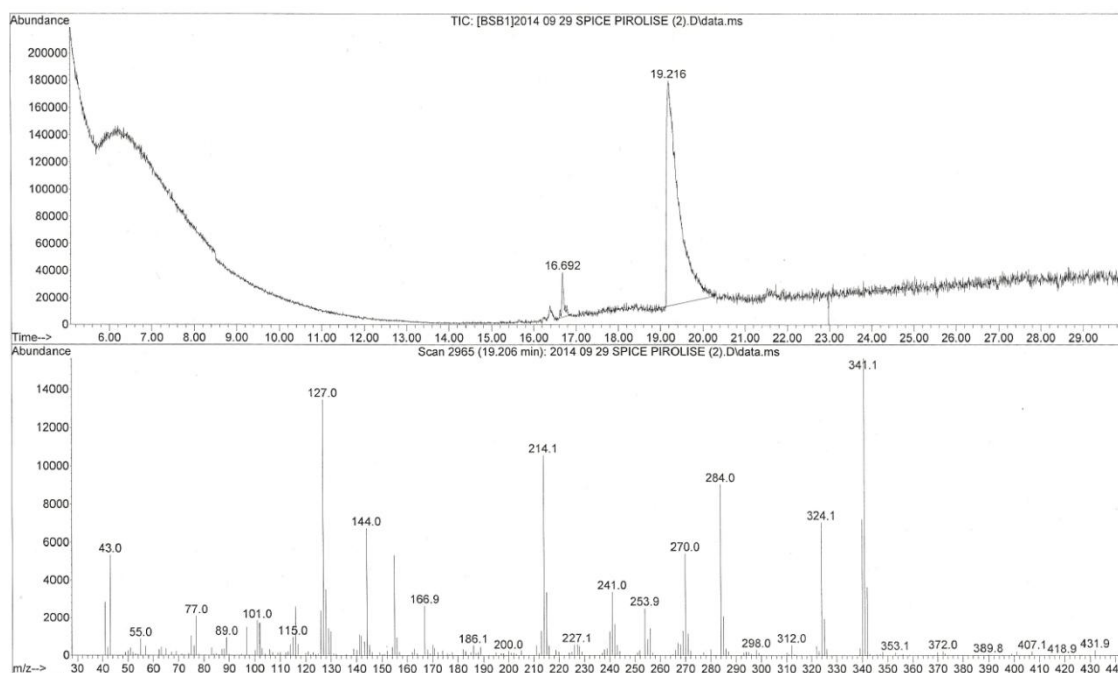


Figura 10 - Cromatograma e espectro de massa correspondente ao pico com tempo de retenção 19,216 min obtidos por GC-MS na análise da amostra (solução em DMSO a 100% do extrato resultante da armadilha com clorofórmio).

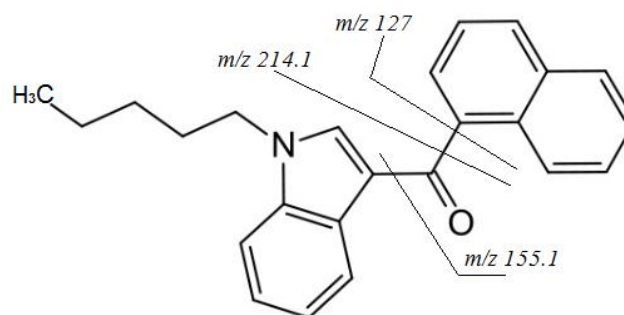


Figura 11 – Fragmentação do ião molecular a m/z 341.1 (JWH-018) (ElSohly *et al.*, 2011)

3.2. Quantificação do JWH-018 na amostra por HPLC-UV

3.2.1 Reta de Calibração

A quantificação de JWH-018 da solução orgânica foi realizada recorrendo à reta de calibração (figura 12), determinada com os padrões de JWH-018 em acetonitrilo, nas diluições 19; 25,5; 36 e 51 $\mu\text{g/mL}$. Os dados apresentados evidenciam linearidade satisfatória no intervalo selecionado, com um coeficiente de correlação de 0,9929. Os limites de deteção e quantificação determinados foram respetivamente 5,86 e 17,76 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1 - Áreas, médias e desvios padrão correspondentes aos padrões de JWH-018 obtidos por HPL

<i>JWH- 018</i> <i>(µg/mL)</i>	<i>19</i>	<i>25,5</i>	<i>36</i>	<i>51</i>
<i>Área</i>	265671	444099	552376	895413
	263830	425549	537928	836007
	270692	367861	556024	803355
<i>Média</i>	266731	412503	548776	844925
<i>Desvio padrão</i>	3551,7	39758,1	9570,073	46672,44

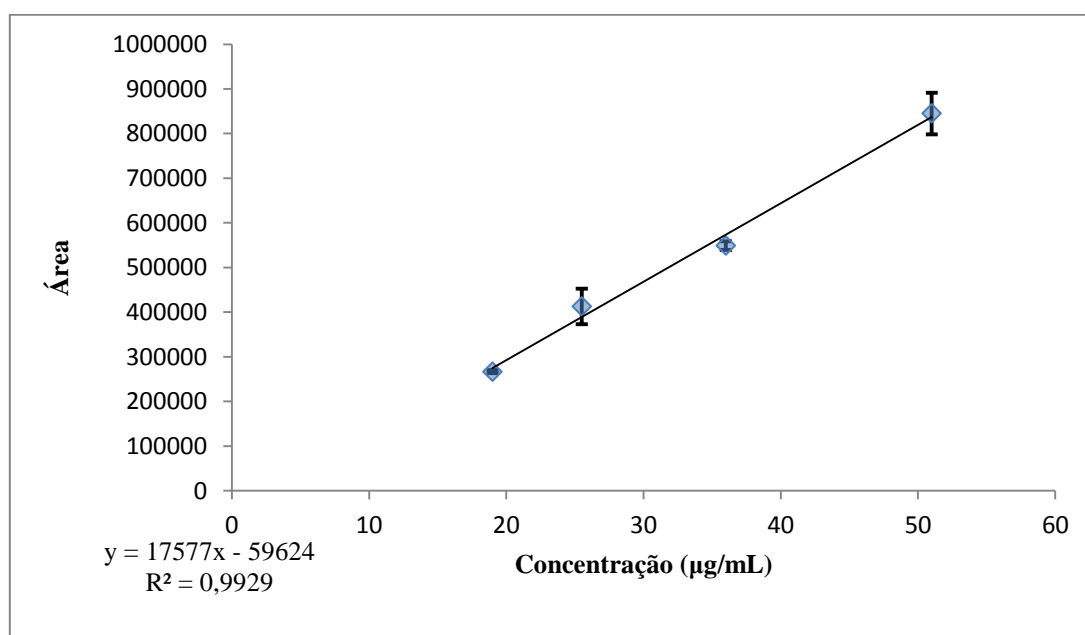


Figura 12 - Reta de calibração do JWH-018 com respectiva equação; obtida através das médias das áreas determinadas por HPLC-UV.

3.2.1. Amostra

Foram efetuadas três corridas independentes com alíquotas da amostra da mistura herbal em estudo (solução do extrato da solução clorofórmica da segunda armadilha do sistema de fumo, em DMSO a 100%), indicam a presença de vários compostos, cada um deles representado por um pico, com diferentes tempos de retenção. Sabe-se que o tempo de retenção do JWH-018, nas condições da corrida efetuada, é de $12,90 \pm 0.041$ minutos.

Este valor foi calculado através da média dos tempos de retenção dos padrões de JWH-018 utilizados para calcular a reta de calibração. Deste modo, foi possível a identificação do JWH-018 na amostra, através dos picos com os tempos de retenção 12,92min

(figura 13), 12,91min (figura 14) e 12,89min (figura 15). Da média das áreas obtidas para esse pico nos diferentes cromatogramas, estimou-se, a partir da reta de calibração elaborada anteriormente, a quantidade de JWH-018 presente na amostra.

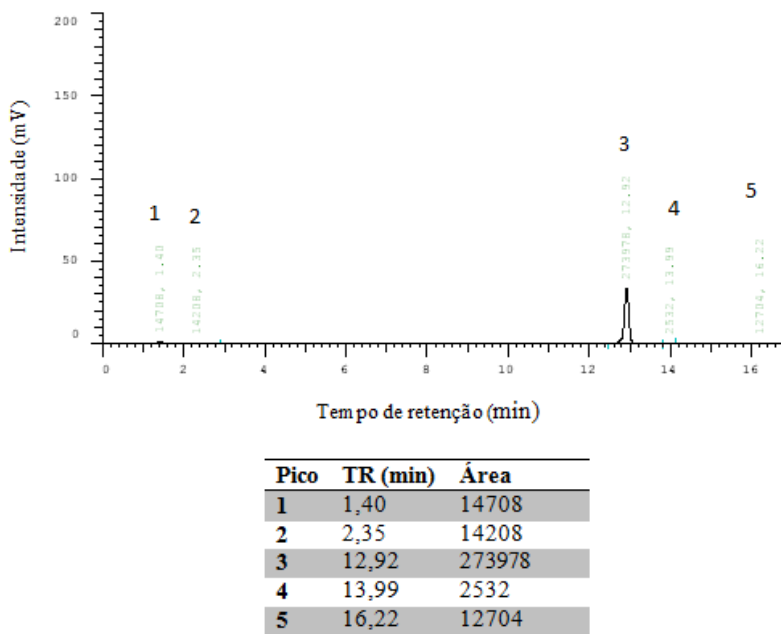


Figura 13 – Cromatograma (1^a corrida) obtido através da análise da amostra por HPLC-UV, tempos de retenção e áreas dos respectivos picos.

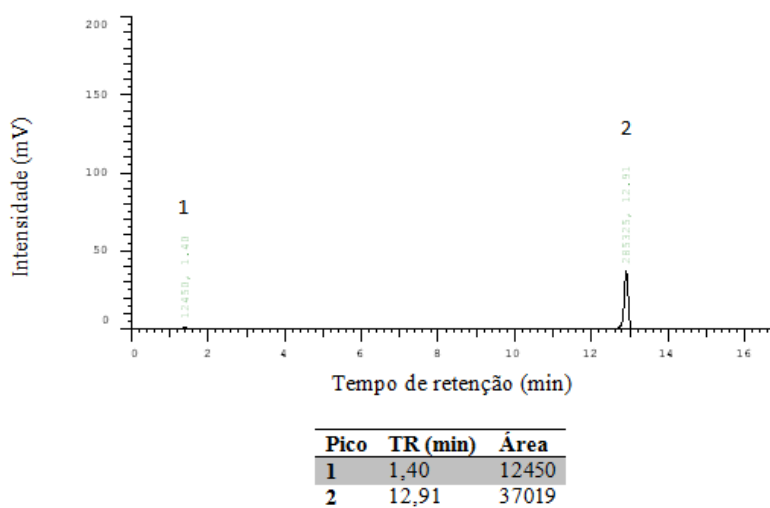


Figura 14 - Cromatograma (2^a corrida) obtido através da análise da amostra por HPLC-UV, tempos de retenção e áreas dos respectivos picos.

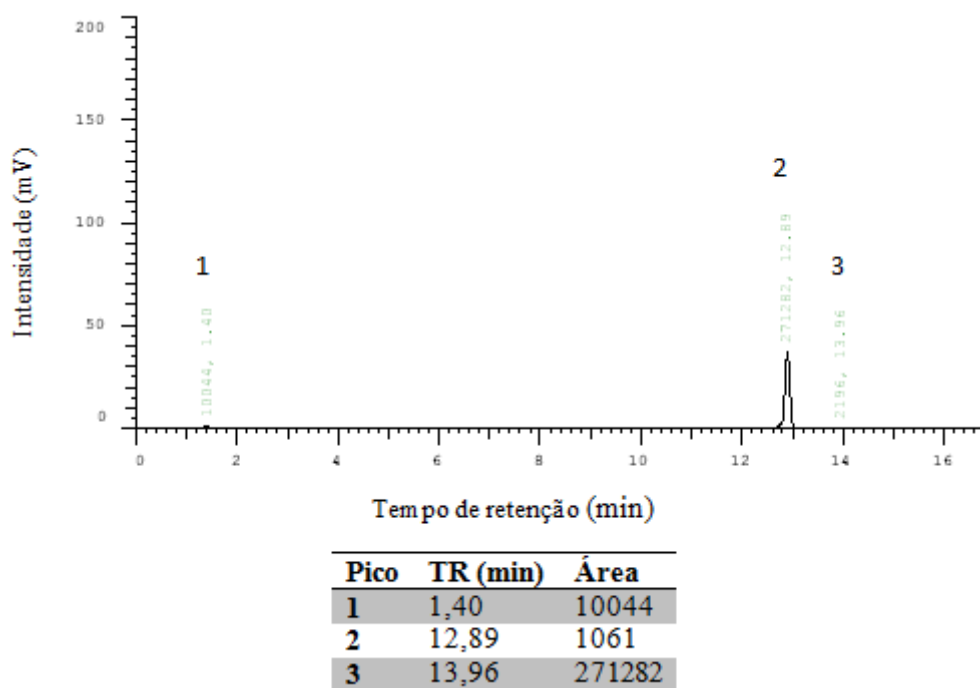


Figura 15 - Cromatograma (3ª corrida) obtido através da análise da amostra por HPLC-UV, tempos de retenção e áreas dos respectivos picos.

Conclui-se assim que o JWH-018 se encontra presente a uma concentração de 3,8 mg/mL na amostra em estudo, portanto, em 1mL do estrato resultante da segunda armadilha do sistema de fumo, foram obtidos 3,8mg de JWH-018. Foi realizada uma quantificação por HPLC-UV do JWH-018 antes da queima da mesma mistura herbal (determinada pela equipa do laboratório de patologia molecular), indicando um teor de 149,1mg de JWH-018 por grama de mistura herbal, tendo em conta a massa de JWH-018 determinada na armadilha hidrófoba do queimador e que a quantidade deste no solvente orgânico é predominante, o rendimento da substância retida na fase orgânica após a queima é de aproximadamente 15,9%.

Os três cromatogramas apresentam um pico com o mesmo tempo de retenção (TR=1,40) e áreas semelhantes podendo indicar a presença de um produto de pirólise, ou constituinte da mistura herbal não convertido pela queima. O mesmo se aplica aos picos 2, 4 e 5 da primeira corrida (figura 13) e ao pico 3 da terceira corrida (figura 15). Para esclarecer a estrutura destas substâncias, seria necessário recorrer a uma análise complementar da amostra por HPLC-MS, como tal não foi possível a sua identificação.

3.3. Ensaio com MTT

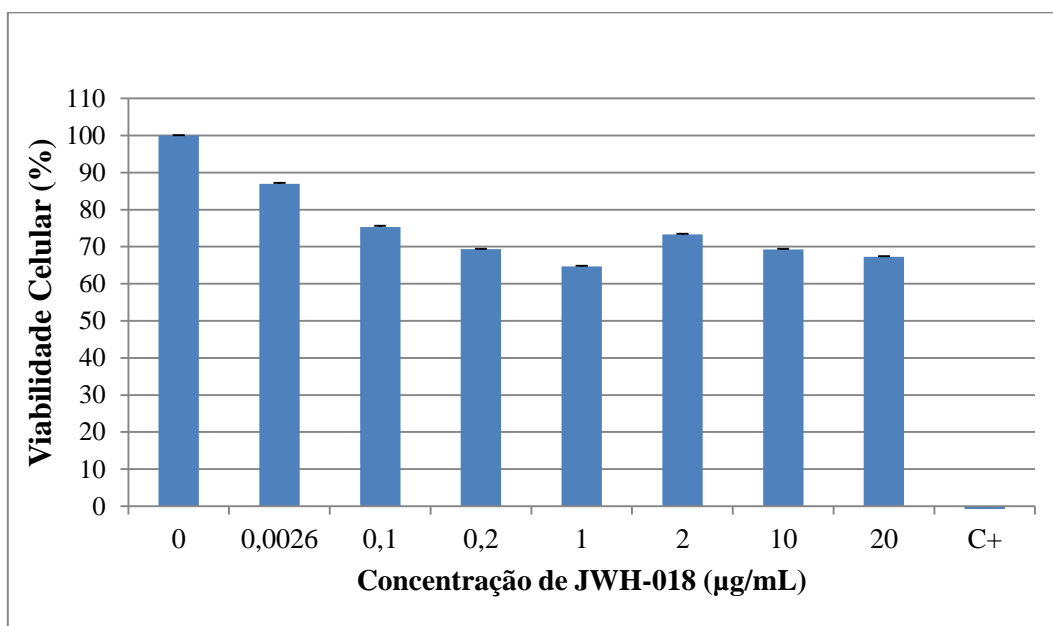


Figura 16 - Viabilidade celular (média das percentagens de MTT reduzido) para cada uma das soluções-amostra.

Analisando o gráfico obtido (figura 16), podemos verificar que para as primeiras quatro concentrações foi calculada respetivamente uma viabilidade celular de 86,9%; 75,3% ; 69,33% e de 64,6%, o que representa uma morte celular entre os 24,7% e os 35,4%. Para as últimas três concentrações determinou-se uma viabilidade celular na ordem dos 70%, o que representa uma morte celular na ordem dos 30%. Estes dados sugerem que a morte celular poderá não ser devida aos compostos lipossolúveis presentes na solução orgânica, uma vez que com o aumento da concentração de JWH-018 nas soluções-amostra não se verifica uma correspondente diminuição da viabilidade celular. Mesmo considerando que foi usado o mesmo volume da solução aquosa (da primeira armadilha) para a constituição das soluções amostra, não se consegue prever o impacto dos compostos hidrossolúveis sobre a viabilidade celular. Será necessária a realização de mais ensaios para se compreender o impacto causado pelos produtos de pirólise e pelos canabinóides sintéticos na viabilidade celular.

4. Conclusão

A análise por GC-MS dos compostos presentes na solução orgânica, proveniente da queima da mistura herbal com o dispositivo de pirólise, permitiu a identificação do canabinóide sintético JWH-018, demonstrando êxito na retenção deste composto na solução clorofórmica pelo método utilizado. No entanto, a mesma análise indicou a presença de um outro composto que não foi identificado. A informação necessária para a sua identificação não consta nas bibliotecas utilizadas para a análise, sendo assim necessária uma análise extensa do espectro de massa obtido para o reconhecimento da sua estrutura molecular. A análise da mesma solução por HPLC-UV, permitiu a identificação e a quantificação de JWH-018 na amostra. Com 160mg da mistura herbal, queimados pelo sistema de pirólise, foram obtidos 3,8mg de JWH-018 na solução, o que significa um rendimento de 15,9% na retenção deste composto pela solução clorofórmica. Os cromatogramas obtidos por HPLC-UV indicaram a presença de outros compostos. No entanto, não foi possível a identificação dos mesmos, pois seria necessária a análise por LC-MS e Ressonância Magnética Nuclear de modo a identificar as estruturas químicas. Com o objetivo de testar o impacto dos produtos de pirólise de misturas herbais, contendo JWH-018, submeteram-se as células da linha SH-SY5Y aos pirolisados obtidos da spice em estudo. Os resultados da morte celular verificada através dos ensaios com MTT, não parecem mostrar o impacto do JWH-018. Na verdade, não existe correlação entre a concentração do pirolisado e a morte celular. É necessária a realização de mais ensaios, para que se possa compreender o impacto dos produtos de pirólise e dos canabinóides sintéticos na viabilidade celular. Quer a longa duração destes ensaios com MTT, quer o curto intervalo de tempo para a realização deste trabalho experimental não permitiram a realização de mais ensaios. Contudo, parece urgente conhecer o impacto destas substâncias na saúde, assim como o desenvolvimento de métodos de identificação e de regulação, dado o ritmo extremamente elevado com que estas substâncias emergem na sociedade.

5. Bibliografia

- Ashton, C., & Moore, P. (2011). Endocannabinoid system dysfunction in mood and related disorders. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 124(4), 250-261. doi:10.1111/j.1600-0447.2011.01687.x
- Ashton, C. H., & Moore, P. B. (2009). Regulation of synthetic cannabinoids. *Lancet*, 374(9701), 1595. doi:10.1016/S0140-6736(09)61949-8
- Bakshi, K., Mercier, R., & Pavlopoulos, S. (2007). Interaction of a fragment of the cannabinoid CB1 receptor C-terminus with arrestin-2. *FEBS Letters*, 581, 5009–5016. doi:10.1016/j.febslet.2007.09.030
- Ben Amar, M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1-2), 1–25. doi:10.1016/j.jep.2006.02.001
- Berridge, M., Herst, P., & Tan, A. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 127-152. doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7
- Bosier, B., Lambert, D., & Hermans, E. (2008). Reciprocal influences of CB 1 cannabinoid receptor agonists on ERK and JNK signalling in N1E-115 cells. *FEBS Letters*, 582(28), 3861–3867. doi:10.1016/j.febslet.2008.10.022
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., ... Ferré, S. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249–59. doi:10.1038/sj.npp.1301375
- Cheung, B., Cheung, T., & Samaranayake, N. (2013). Safety of antiobesity drugs. *Therapeutic Advances In Drug Safety*, 4(4), 171-181. doi:10.1177/2042098613489721
- Chimalakonda, K. C., Seely, K. a, Bratton, S. M., Brents, L. K., Moran, C. L., Endres, G. W., ... Moran, J. H. (2012). Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 40(11), 2174-84. doi:10.1124/dmd.112.047530

Clark, S. (2013). Longmont store faces Spice charge. KRDO. Disponível em <http://www.krdo.com/news/longmont-store-faces-spice-charge/22201600>. [Acesso a 28 de setembro 2014]

Cohrs, L. (2012). Marinol. Bad Drug. Disponível em <http://www.bad-drug.net/bad-drug/marinol>. [Acesso a 14 de outubro 2014]

Davis, M. (2008). Oral nabilone capsules in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting and pain. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 17(1), 85-95. doi:10.1517/13543784.17.1.85

Daw, R., Grabenauer, M., Pande, P., Cox, A., Kovach, A., & Davis, K. *et al.* (2014). Pyrolysis studies of synthetic cannabinoids in herbal products. *Drug And Alcohol Dependence*, 140, e44. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.02.142

Demuth, D. G., & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling, 78, 549–563. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.055

ElSohly, M. A., Gul, W., ElSohly, K. M., Murphy, T. P., Madgula, V. L. M., & Khan, S. I. (2011). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Urine Specimens for K2 (JWH-018) Metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, 35(7), 487–495. doi:10.1093/anatox/35.7.487~

Every-Palmer, S. (2011). Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: An explorative study. *Drug And Alcohol Dependence*, 117(2-3), 152-157. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.01.012

Fantegrossi, W. E., Moran, J. H., Radominska-pandya, A., & Prather, P. L. (2014). Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ^9 -THC: Mechanism underlying greater toxicity? *Life Sciences*, 97(1), 45–54. doi:10.1016/j.lfs.2013.09.017

Grigoryev, A., Savchuk, S., Melnik, A., Dzhurko, J., Ershov, M., Nosyrev, A., ... Rozhanets, V. (2011). Chromatography – mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 , psychoactive components of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B*, 879(15-16), 1126–1136. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.034

Gunderson, E. W., Haughey, H. M., Ait-Daoud, N., Joshi, A. S., & Hart, C. L. (2014). A survey of synthetic cannabinoid consumption by current cannabis users. *Substance Abuse : Official Publication of the Association for Medical Education and Research in Substance Abuse*, 35(2), 184–9. doi:10.1080/08897077.2013.846288

Hadcock, J. R., Griffith, D. a, Iredale, P. a, Carpino, P. a, Dow, R. L., Black, S. C., ... Scott, D. O. (2010). In vitro and in vivo pharmacology of CP-945,598, a potent and selective cannabinoid CB(1) receptor antagonist for the management of obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), 366–71. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.015

Hall, W., Christie, M., & Currow, D. (2005). Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *The Lancet. Oncology*, 6(1), 35–42. doi:10.1016/S1470-2045(04)01711-5

Hermanns-Clausen, M., Kneisel, S., Szabo, B., & Auwärter, V. (2013). Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Addiction (Abingdon, England)*, 108(3), 534-44. doi:10.1111/j.1360-0443.2012.04078.x

Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 133(1), 79–97. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.09.002

Honório, K. M., Arroio, A., & Silva, A. B. F. da. (2006). Aspectos terapêuticos decompostos da planta *Cannabis sativa*. *Química Nova*, 29(2), 318–325. doi:10.1590/s0100-40422006000200024.

Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., & Mackie, K. (1999). Internalization and Recycling of the CB1 Cannabinoid Receptor, 493–501. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0730493.x

Indiamart.com,. (2014). Weight Loss Medicines - Acomplia Supplier & Manufacturer from Thane. Disponível em <http://www.indiamart.com/mkdrughouse/weight-loss-medicines.html>. [Acesso a 25 de outubro 2014]

Johnson, J. R., Lossignol, D., Burnell-Nugent, M., & Fallon, M. T. (2013). An Open-Label Extension Study to Investigate the Long-Term Safety and Tolerability of THC/CBD Oromucosal Spray and Oromucosal THC Spray in Patients With Terminal

Cancer-Related Pain Refractory to Strong Opioid Analgesics. *Journal of Pain and Symptom Management*, 46(2), 207–218. doi:10.1016/j.jpainsymman.2012.07.014

Kneisel, S., Speck, M., Moosmann, B., Corneillie, T. M., Butlin, N. G., & Auwärter, V. (2013). LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4691–706. doi:10.1007/s00216-013-6887-0

Koller, V. J., Auwärter, V., Grummt, T., Moosmann, B., Mišík, M., & Knasmüller, S. (2014). Investigation of the in vitro toxicological properties of the synthetic cannabinomimetic drug CP-47,497-C8. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 277(2), 164–71. doi:10.1016/j.taap.2014.03.014

Koller, V. J., Zlabinger, G. J., Auwärter, V., Fuchs, S., & Knasmueller, S. (2013). Toxicological profiles of selected synthetic cannabinoids showing high binding affinities to the cannabinoid receptor subtype CB₁. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1287–97. doi:10.1007/s00204-013-1029-1

Lesiak, A. D., Musah, R. a, Domin, M. a, & Shepard, J. R. E. (2014). DART-MS as a preliminary screening method for “herbal incense”: chemical analysis of synthetic cannabinoids. *Journal of Forensic Sciences*, 59(2), 337–43. doi:10.1111/1556-4029.12354

Lindigkeit, R., Boehme, A., Eiserloh, I., Luebbecke, M., Wiggermann, M., Ernst, L., & Beuerle, T. (2009). Spice: A never ending story?, 191, 58–63. doi:10.1016/j.forsciint.2009.06.008

Mackie, K., & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 89(9), 3825-3829. doi:10.1073/pnas.89.9.3825

Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., & Giesy, J. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*, 217(1), 50-58. doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.025

Marshall, R., Brents, L. K., Hyatt, W. S., Tai, S., Prather, P. L., & Fantegrossi, W. E. (2014). *Pharmacology , Biochemistry and Behavior* In vivo effects of synthetic canna

binoids JWH-018 and JWH-073 and phytocannabinoid Δ^9 -THC in mice: Inhalation versus intraperitoneal injection. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 124, 40–47. doi:10.1016/j.pbb.2014.05.010

Marshall, R., Kearney-Ramos, T., Brents, L. K., Hyatt, W. S., Tai, S., Prather, P. L., & Fantegrossi, W. E. (2014). In vivo effects of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 and phytocannabinoid $\Delta(9)$ -THC in mice: Inhalation versus intraperitoneal injection. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 124C, 40–47. doi:10.1016/j.pbb.2014.05.010

Mechoulam, R., & Parker, L. a. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*, 64, 21–47. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739

Miller, J. N. (2005). CHEMOMETRICS AND STATISTICS | Statistical Techniques. *Encyclopedia of Analytical Science*, 1–8. doi:10.1016/b0-12-369397-7/00579-3

Moosmann, B., Kneisel, S., Girreser, U., Brecht, V., Westphal, F., & Auwärter, V. (2012). Separation and structural characterization of the synthetic cannabinoids JWH-412 and 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3yl]-(4-methylnaphthalen-1-yl)methanone using GC-MS, NMR analysis and a flash chromatography system. *Forensic Science International*, 220(1-3), e17–22. doi:10.1016/j.forsciint.2011.12.010

Moosmann, B., Kneisel, S., Wohlfarth, A., Brecht, V., & Auwärter, V. (2013). A fast and inexpensive procedure for the isolation of synthetic cannabinoids from “Spice” products using a flash chromatography system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(12), 3929–35. doi:10.1007/s00216-012-6462-0

Musselman, M. E., & Hampton, J. P. (2014). “Not for human consumption”: a review of emerging designer drugs. *Pharmacotherapy*, 34(7), 745–57. doi:10.1002/phar.1424

Pacher, P. (2006). The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 389-462. doi:10.1124/pr.58.3.2

Pertwee, R. (2005). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *The AAPS Journal*, 7(3), E625-E654. doi:10.1208/aapsj070364

Pharmaceuticals Inc, M. (2009). Cesamet (nabilone): CINV Treatment. Cesamet.com., Disponível em <http://www.cesamet.com/patient-about-cesamet.asp>. [Acesso a 28 de setembro 2014]

Regime jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio das novas substâncias psicoativa, DL n.º 54/2013 de 17 de Abril (2013)

Reynolds, P. (2011). Legal Opportunities For Medicinal Cannabis Users. Peter Reynolds. Disponível em <http://peterreynolds.wordpress.com/2011/03/03/legal-opportunities-for-medicinal-cannabis-users/>. [Acesso a 27 de outubro 2014]

Rosenthaler, S., Pöhn, B., Kolmanz, C., Nguyen Huu, C., Krewenka, C., & Huber, A. *et al.* (2014). Differences in receptor binding affinity of several phytocannabinoids do not explain their effects on neural cell cultures. *Neurotoxicology And Teratology*, 46, 49-56. doi:10.1016/j.ntt.2014.09.003

Sastre-Garriga, J., Vila, C., Clissold, S., & Montalban, X. (2011). THC and CBD oromucosal spray (Sativex\textregistered) in the management of spasticity associated with multiple sclerosis. Informa Healthcare London. doi:<http://dx.doi.org/10.1586/ern.11.47>

Schneir, A. B., Cullen, J., & Ly, B. T. (2011). “Spice” girls: synthetic cannabinoid intoxication. *The Journal of Emergency Medicine*, 40(3), 296–9. doi:10.1016/j.jemermed.2010.10.014

Schönhofen, P., de Medeiros, L. M., Bristot, I. J., Lopes, F. M., De Bastiani, M. a, Kapczinski, F., ... Klamt, F. (2014). Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. *Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s12035-014-8843-1

Seely, K. A., Lapoint, J., Moran, J. H., & Fattore, L. (2012). Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry Spice drugs are more than harmless herbal blends : A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 39(2), 234–243. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.04.017

Shen, M., Piser, T., Seybold, V., & Thayer, S. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *The Journal Of Neuroscience*, 16(14), 4322--4334.

Simolka, K., Lindigkeit, R., Schiebel, H.-M., Papke, U., Ernst, L., & Beuerle, T. (2012). Analysis of synthetic cannabinoids in “spice-like” herbal highs: snapshot of the German market in summer 2011. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(1), 157–71. doi:10.1007/s00216-012-6122-4

Strano-Rossi, S., Anzillotti, L., Dragoni, S., Pellegrino, R. M., Goracci, L., Pascali, V. L., & Cruciani, G. (2014). Metabolism of JWH-015, JWH-098, JWH-251, and JWH-307 in silico and in vitro: a pilot study for the detection of unknown synthetic cannabinoids metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), 3621–36. doi:10.1007/s00216-014-7793-9

Sun, Y., & Bennett, A. (2007). Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Research*, 2007, 23513. doi:10.1155/2007/23513

Tomiyama, K., & Funada, M. (2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(1), 17–23. doi:10.1016/j.taap.2013.10.028

Twitchell, W., Brown, S., & Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal Of Neurophysiology*, 78(1), 43–50. Disponível em <http://jn.physiology.org/content/78/1/43.full-text.pdf+html>

Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., & Goda, Y. (2010). Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Science International*, 198(1-3), 31–8. doi:10.1016/j.forsciint.2010.01.004

Ulugol, A. (2014). The Endocannabinoid System as a Potential Therapeutic Target for Pain Modulation. *Balkan Med J*, 31(2), 115-120. doi:10.5152/balkanmedj.2014.13103

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2013). Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials. New York: United Nations. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/scientific/STNAR48_Synthetic_Cannabinoids_ENG.pdf. [Acesso a 25 de setembro 2014]

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2014a). Synthetic cannabinoids: in herbal products. New York: United Nations. Disponível em:

https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf. [Acesso a 20 de setembro 2014].

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2014b). World Drug Report 2014. New York: United Nations. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf. [Acesso a 20 de setembro 2014]

Vandrey, R., Dunn, K. E., Fry, J. a, & Girling, E. R. (2012). A survey study to characterize use of Spice products(synthetic cannabinoids). *Drug and Alcohol Dependence*, 120(1-3), 238–41. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.07.011

Vardakou, I., Pistos, C., & Spiliopoulou, C. (2010). Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. *Toxicology Letters*, 197(3), 157–62. doi:10.1016/j.toxlet.2010.06.002

Wiley, J. L., Marusich, J. a, & Huffman, J. W. (2014). Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Sciences*, 97(1), 55–63. doi:10.1016/j.lfs.2013.09.011

Winstock, A. R., & Barratt, M. J. (2013). Synthetic cannabis: a comparison of patterns of use and effect profile with natural cannabis in a large global sample. *Drug and Alcohol Dependence*, 131(1-2), 106–11. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.12.011

Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., ... Xiao, M. (2014). Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PloS One*, 9(9), e107447. doi:10.1371/journal.pone.0107447