



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

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO IMPACTO CAUSADO NA VIABILIDADE CELULAR
PELOS PRODUTOS DA PIRÓLISE DE CANNABIS SATIVA L.**

Trabalho submetido por
João Nuno Pimentel Martins dos Santos
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 CAUSADO NA VIABILIDADE CELULAR
PELOS PRODUTOS DA PIRÓLISE DE CANNABIS SATIVA L.**

Trabalho submetido por
João Nuno Pimentel Martins dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
PROF. DOUTOR ALEXANDRE QUINTAS

outubro de 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda a minha família que sempre me apoiou durante estes cinco anos de curso e que sempre estiveram disponíveis para me ajudar no que fosse preciso.

Agradecimentos

Um especial obrigado ao meu orientador Prof. Doutor Alexandre Quintas que se mostrou sempre disponível para me ajudar.

Obrigado à Joana Couceiro e à Carla Ferreira por toda a paciência e tempo dispendido para me explicar os procedimentos experimentais e me ajudar na realização dos mesmos.

Obrigado à Rita Soeiro pela sua disponibilidade e ajuda na realização do HPLC-UV e do GC-MS (EI+).

Obrigado ao meu amigo e colega Mário Moreira que me acompanhou nesta jornada desde o primeiro ano e que fez em paralelo o trabalho experimental comigo. A sua participação neste estudo foi determinante em termos de motivação.

Quero igualmente agradecer todo o apoio e ajuda aos meus colegas e amigos Pedro Quintas, Henrique Martins, Margarida Esteves, Telma Mangerico, Sofia Silva e Zahra Kará e que estiveram ao meu lado ao longo destes cinco anos de curso (espero que por muitos mais!).

Quero igualmente agradecer todo o apoio e ajuda que os meus amigos (Gordos & Elite Beige) me deram durante a realização deste trabalho, não seria a mesma coisa sem vocês.

Obrigado à minha família, em especial aos meus avós, que sempre apoiou, motivou e zelou pelo meu sucesso.

Por fim, mas não por isso menos importante, quero agradecer do fundo do meu coração aos meus pais que, para além de todo o amor e apoio moral incondicional que mostraram, investiram na minha educação e começam a ver agora os frutos do seu investimento.

Resumo

A *Cannabis sativa* L., mais conhecida como marijuana, é uma planta com propriedades psicoativas. É a substância ilícita mais consumida do mundo e os compostos causadores dos efeitos psicoativos associados ao seu consumo são os canabinóides. Estes compostos são lipossolúveis e a sua ação a nível celular não está bem definida.

Este trabalho experimental teve como objetivo o estudo do impacto causado pelos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L., na viabilidade celular de neuroblastomas (células do sistema nervoso) da linha SH-SY5Y. Para mimetizar o modo como a planta é consumida, foi utilizado um sistema que reteve os compostos provenientes do fumo de *Cannabis sativa* L. em duas soluções distintas, uma aquosa (DMEM), e outra orgânica (metanol). Na segunda solução, identificaram-se por GC-MS (EI+), os canabinóides, e quantificou-se o THC total (THC+THCA) por HPLC-UV. A solução aquosa foi utilizada para perfazer as soluções finais do ensaio de viabilidade celular, que consistiu em expor as células (previamente cultivadas e tratadas) a oito concentrações diferentes de canabinóides provenientes da pirólise da *Cannabis sativa* L., durante 24 horas. Posteriormente foi lida a viabilidade celular para cada concentração estudada, através do método colorimétrico com MTT.

Na solução metanólica dos produtos de pirólise de *Cannabis sativa* L. identificou-se, por GC-MS (EI+), o Δ^1 -THC sililado, o Δ^8 -THC, o Δ^9 -THC, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol, o canabinol, o canabidiol e o canabidiol. Quantificaram-se, por HPLC-UV, na mesma amostra, cerca de 15,5mg de THC total.

Os neuroblastomas expostos às sete soluções-amostra menos concentradas, apresentaram 80% de viabilidade celular. Quando expostas à solução-amostra mais concentrada, todas as células morreram.

Concluiu-se que os 20% de morte celular verificados nas concentrações mais baixas deveram-se aos compostos do fumo de *Cannabis sativa* L. presentes na solução aquosa, constituinte das soluções-amostra. Os canabinóides só parecem induzir morte celular a partir de concentrações superiores a 0,1mg/mL.

Palavras-chave: *Cannabis sativa* L.; produtos de pirólise; canabinóides; viabilidade celular.

Abstract

Cannabis sativa L., more commonly known as "weed" is a plant with psychoactive properties. It is the most consumed illicit substance in the world and the compounds responsible for its psychoactive effects are called cannabinoids. These compounds are hydrophobic and its action at the cellular level is not well understood.

This experimental work was designed to study the impact of the pyrolysis products of *Cannabis sativa* L. on cell viability, more particularly in the neuroblast (nervous system cells) line SH- SY5Y. To mimic the way in which the plant is consumed, a smoking system was used. This system retained the compounds present in *Cannabis sativa* L.'s smoke onto two separate solutions, an aqueous one (DMEM), and an organic one (methanol). In the latter, cannabinoids were identified using GC-MS (EI+) and the amount of total THC (THC+THCA) was estimated by HPLC-UV. The aqueous solution was used as the solvent for the final solutions in the cell viability test. This test consisted on exposing neuroblasts (previously grown and treated) to eight different cannabinoid concentrations for a 24 hour period. Subsequently, cell viability was tested for each concentration through a colorimetric method using MTT.

In the methanolic solution containing the pyrolysis products of *Cannabis sativa* L., silylated Δ^1 -THC, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol, cannabicyclol and cannabichromene were identified by GC-MS (EI+). The total THC in the methanolic solution, quantified by HPLC-UV, was 15.5mg.

The neuroblasts exposed to the seven lowest concentrations showed 80% of cell viability. When exposed to the most concentrated solution studied, all cells died.

In conclusion, it can be assumed that the 20% cell death that was observed at the lowest concentrations was due to the hydrosoluble compounds of *Cannabis sativa* L.'s smoke that were present in the aqueous solution. Cannabinoids appear to induce cell death at concentrations above 0.1mg/mL.

Keywords: *Cannabis sativa* L.; pyrolysis products; cannabinoids; cell viability.

Índice Geral

| | |
|--|----|
| Dedicatória..... | 5 |
| Agradecimentos | 7 |
| Resumo | 9 |
| Abstract..... | 11 |
| Índice de Figuras e Tabelas | 15 |
| Lista de Abreviaturas..... | 17 |
| 1. Introdução..... | 19 |
| 1.1 – Consumo Humano de <i>Cannabis sativa</i> L. | 25 |
| 1.1.1 – Farmacocinética:..... | 25 |
| 1.1.2 – Farmacodinâmica: | 27 |
| 1.1.3 – Efeitos do consumo humano de <i>Cannabis sativa</i> L.: | 28 |
| 1.1.4 – Citotoxicidade: | 32 |
| 1.2 – O Uso Medicinal de Marijuana..... | 33 |
| 1.2.1 – A canábis e a lei:..... | 37 |
| 1.3 – Enquadramento do Estudo | 38 |
| 2. Material e Métodos..... | 39 |
| 2.1 – Reagentes:..... | 39 |
| 2.2 – Amostra para análise:..... | 39 |
| 2.3 – Extração: | 40 |
| 2.4 – Pirólise: | 40 |
| 2.5 – Identificação dos canabinóides presentes na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de <i>Cannabis sativa</i> L. por <i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> de ionização por impacto eletrónico (GC-MS (EI+): | 41 |
| 2.6 – Quantificação do THC presente na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de <i>Cannabis sativa</i> L. por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> com detecção ultravioleta (HPLC-UV): | 42 |

| | |
|---|----|
| 2.7 – Cultura celular: | 42 |
| 2.8 – Estudo de viabilidade celular com MTT: | 43 |
| 2.9 – Validação do método: | 44 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 47 |
| 3.1 – Identificação dos canabinóides presentes na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de <i>Cannabis sativa</i> L. por <i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> de ionização por impacto eletrónico (GC-MS (EI+)): | 47 |
| 3.2 – Quantificação do THC total a partir de <i>High Performance Liquid Chromatography</i> com deteção ultravioleta (HPLC-UV): | 50 |
| 3.2.1 – Reta de calibração: | 50 |
| 3.2.2 – Amostra: | 51 |
| 3.3 – Cultura celular: | 53 |
| 3.4 – Estudo de viabilidade celular com MTT: | 53 |
| 4. Conclusão | 55 |
| 5. Bibliografia..... | 57 |
| 6. Anexos..... | 67 |

Índice de Figuras e Tabelas

| | |
|--|----|
| Figura 1. Folha de <i>Cannabis sativa</i> L. (adaptado de Rfidroundup.blogspot.pt, 2013). | 19 |
| Figura 2. Resumo das características químicas e farmacológicas dos principais canabinóides encontrados na marijuana (Adaptado de UNODC, 2009). | 21 |
| Figura 3. Distribuição do THC no organismo após uma única administração por via intravenosa (Adaptado de Ashton, 2001). | 26 |
| Figura 4. Sativex® - 2,7 mg de Δ^9 -THC + 2,5 mg de canabidiol (adaptado de Fox, 2014). | 34 |
| Figura 5. Estrutura química do dronabinol (adaptado de Commons.wikimedia.org, 2010). | 34 |
| Figura 6. Marinol® - 5mg de dronabinol em cápsulas (adaptado de Leaf Science, 2014). | 35 |
| Figura 7. Estrutura química do nabilone (adaptado de Commons.wikimedia.org, 2009). | 35 |
| Figura 8. Cesamet® - 1mg de nabilone em cápsulas (adaptado de Cesamet.com, 2014). | 36 |
| Figura 9. Sistema de “fumo” da amostra: as folhas de cânabis pesadas (160mg) são colocadas na extremidade do cachimbo (A) e incineradas com um isqueiro. O fumo produzido é puxado por uma bomba de vácuo (B). Durante o trajeto de A para B o fumo atravessa uma válvula de segurança (1), entra na primeira armadilha - fase aquosa (2) passa pela segunda armadilha – fase orgânica (3). Finalmente o fumo atravessa outra válvula de segurança (4) antes de ser descartado. | 40 |
| Figura 10. Parte do cromatograma obtido para a amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de <i>Cannabis sativa</i> L por GC-MC (EI+), evidenciando os sete picos principais que representam, respetivamente: o (1) Δ^9 -tetrahydrocannabivarin, o (2) canabicromeno, o (3) Δ^1 -THC sililado, o (4) canabiciolol, o (5) Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), o (6) Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e o (7) canabinol (CBN). | 48 |
| Figura 11. Espetro de massa, obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 6 (figura10), o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Reta de calibração do THC com respetiva equação; obtida através das médias das áreas lidas, conjuntamente com o desvio padrão e fator de correlação (R ²) calculados. | 50 |
| Figura 13. Cromatograma, obtido por HPLC-UV, da primeira corrida da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de <i>Cannabis sativa</i> L. (A) THC total (THC+THCA). | 52 |
| Figura 14. Gráfico da viabilidade celular (média das percentagens de MTT reduzido em dois ensaios independentes com seis replicados internos) para cada uma das soluções-amostra. | 53 |
| | |
| Tabela 1. Áreas, médias e desvios-padrão obtidos através da leitura dos cromatogramas, obtidos por HPLC-UV, correspondentes aos padrões de THC utilizados..... | 50 |
| Tabela 2. Áreas lidas para o pico A nos três cromatogramas, obtidos por HPLC-UV, da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de <i>Cannabis sativa</i> L. e respetiva média. | 52 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|----------------------------------|--|
| Δ^8-THC | Δ^8 -tetrahydrocannabinol |
| Δ^9-THC | Δ^9 -tetrahydrocannabinol |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| CB₁ | Recetor canabinóide 1 |
| CB₂ | Recetor canabinóide 2 |
| CBD | Canabidiol |
| CBDA | Ácido canabinólico |
| CBN | Canabinol |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| GC-MS (EI+) | Cromatografia gasosa associada a um espectrómetro de massa de ionização por impacto eletrônico (<i>gas chromatography – mass spectrometry, electron impact ionization</i>) |
| HPLC-UV | Cromatografia líquida de elevada eficiência com detecção ultravioleta (<i>high performance liquid chromatography – ultraviolet detection</i>) |
| LD | Limite de detecção |
| LQ | Limite de quantificação |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| SIDA | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| SNC | Sistema nervoso central |

THC

Δ^9 -tetrahydrocannabinol

1. Introdução

A marijuana, *Cannabis sativa* L., é uma planta herbácea da família das *Cannabaceae* originária da Ásia central (figura 1). A *Cannabis sativa* L. apresenta várias subespécies cuja diferenciação está bem definida, uma vez que a química e a morfologia destas plantas são fortemente influenciadas pelas condições ambientais e técnicas de cultivo. A canábica cresce facilmente na maioria dos climas, não requerendo qualquer atenção especial no seu cultivo. É uma espécie dioica, o que quer dizer que apresenta os dois géneros. A planta macho pode chegar a medir seis metros e as suas flores produzem o pólen que as plantas fêmea, usualmente mais pequenas, recolhem para produzir as sementes. Estas sementes são depois envoltas numa resina produzida exclusivamente pela planta fêmea que as protege de agressões exteriores (Earleywine, 2005; United Nations Office on Drugs and Crime, 2009; World Health Organization, Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997).



Figura 1. Folha de *Cannabis sativa* L. (adaptado de Rfidroundup.blogspot.pt, 2013).

Apesar das suas características farmacológicas não estarem completamente definidas, a planta de canábica contém quatrocentos compostos conhecidos, entre os quais sessenta tipos de canabinóides. O mais estudado, e aquele que apresenta uma maior potência psicoativa, é o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, a partir de agora simplesmente referido como THC) e está presente em maiores concentrações nas flores da planta fêmea. Para além deste, outros canabinóides presentes na canábica tais como o Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), o canabinol (CBN) e o canabidiol (CBD) (figura 2), mostraram possuir efeitos sinérgicos, agonistas e mesmo antagonistas aos do Δ^9 -THC,

estando relacionados com o grau de dependência associado ao consumo da substância (Ashton, 2001). Os canabinóides são constituintes da resina produzida pela planta fêmea. No entanto, também se encontram nas folhas, nas flores, nas sementes e nos caules de ambos os gêneros da planta, embora estejam em menor quantidade. Os restantes compostos encontrados na planta de *Cannabis sativa* L. são, à exceção da nicotina, em tudo semelhantes aos presentes na planta do tabaco (Solowij, N., Broyd, S., van Hell, H. & Hazekamp, A., 2014).

O THC é resultante da descarboxilação do ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), que ocorre naturalmente ou pode ser induzida por secagem da planta (UNODC, 2009). O ácido canabinólico (CBDA) transforma-se em canabidiol (CBD) também através de uma descarboxilação. O canabinol (CBN) é um produto da degradação do THC (Ashton, 2001).

1. Introdução

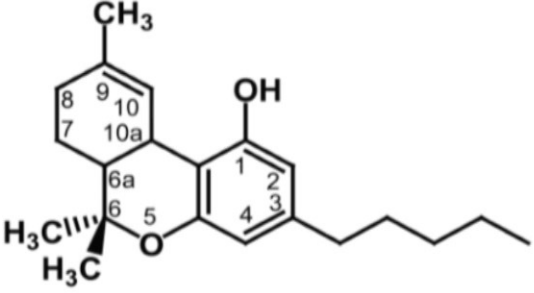
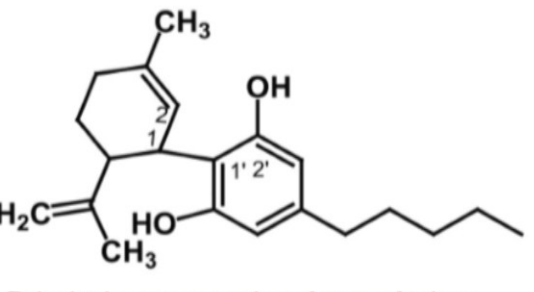
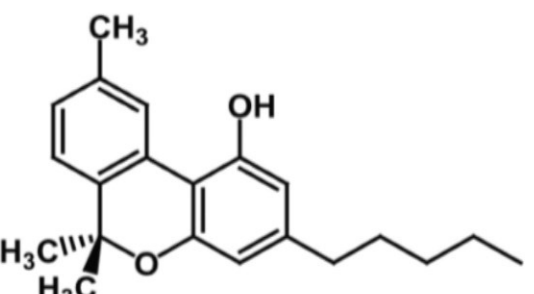
| | |
|---|--|
| <p>Δ^9-tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC)</p>  <p>Principais características farmacológicas: Euforizante Analgésico Anti-inflamatório Anti-emético</p> | <p>Fórmula empírica: C₂₁H₃₀O₂</p> <p>Peso molecular: 314,46g/mol</p> <p>Ponto de fusão: óleo viscoso</p> <p>pKa: 10,6</p> <p>log P: 6,99 (octanol/água)</p> <p>Solubilidade:</p> <p>Água - insolúvel (2,8mg/l 23°C)</p> <p>Etanol - solúvel</p> <p>Clorofórmio- solúvel</p> <p>Hexano - solúvel</p> |
| <p>Canabidiol (CBD)</p>  <p>Principais características farmacológicas: Ansiolítico Anti psicótico Analgésico Anti-inflamatório Anti-espasmódico</p> | <p>Fórmula empírica: C₂₁H₃₀O₂</p> <p>Peso molecular: 314,46g/mol</p> <p>Ponto de fusão: 66-67 °C</p> <p>log P: 5,79 (octanol/água)</p> <p>Solubilidade:</p> <p>Água - insolúvel</p> <p>Etanol - solúvel</p> <p>Clorofórmio- solúvel</p> <p>Hexano - solúvel</p> |
| <p>Canabinol (CBN)</p>  <p>Principais características farmacológicas: Sedativo Anti-convulsão Anti-inflamatório</p> | <p>Fórmula empírica: C₂₁H₂₈O₂</p> <p>Peso molecular: 310,43g/mol</p> <p>Ponto de fusão: 76-77 °C</p> <p>log P: 6,23 (octanol/água)</p> <p>Solubilidade:</p> <p>Água - insolúvel</p> <p>Etanol - solúvel</p> <p>Clorofórmio- solúvel</p> <p>Hexano - solúvel</p> |

Figura 2. Resumo das características químicas e farmacológicas dos principais canabinóides encontrados na marijuana (Adaptado de UNODC, 2009).

Existe evidência científica de que tanto o THC, sendo o agente psicoativo mais forte da canábis, como os restantes canabinóides atuam de uma forma dose-dependente no organismo (Athanasίου *et al.*, 2007).

No que diz respeito à sua via de administração, a marijuana pode ser ingerida, habitualmente incorporada num bolo ou numa bolacha, pode ser bebida sob a forma de um extrato feitos à base das suas folhas ou pode ainda ser administrada por inalação dos produtos da combustão das suas folhas ou da sua resina que libertam os compostos da planta, entre eles os canabinóides. Tanto as folhas da planta como o haxixe (a sua resina) podem ser enroladas e fumadas num cigarro. Este cigarro pode ser feito com ou sem a adição de folhas de tabaco, usualmente sem qualquer filtro, e comumente chamado de "charro". A marijuana também pode ser inalada com recurso a um cachimbo, de água ou não. A administração de extratos da planta por via intravenosa é pouco usada uma vez que os canabinóides são moléculas dificilmente solúveis em água; tendo sido reportada apenas para efeitos de pesquisa (Ashton, 2001).

Os primeiros relatos da utilização da canábis vêm do império chinês e remontam ao ano de 2727 A.C.. Desde o caule às suas folhas e sementes, quase toda a planta de canábis tem interesse comercial. Ao longo da história tem sido cultivada para diversos fins: medicinais, recreativos, industriais e alimentares, entre outros (Mechoulam & Burstein, 1973).

Devido aos canabinóides presentes na planta, as suas propriedades psicoativas são capazes de produzir diversos efeitos a nível do sistema nervoso central (SNC) dos quais a euforia, o aumento da percepção sensorial e o relaxamento são exemplos. Talvez por isso, por volta de 2000 A.C. em algumas partes da Ásia a planta era considerada como 'fonte de felicidade e de vida' sendo venerada em cultos religiosos (Sca-centremedic.com, 2014). Na Europa celta a fibra proveniente de uma das subespécies da canábis, o cânhamo (*Cannabis sativa ruderalis* L.), era essencial para a produção de sapatos, bolsas, cordas e tecidos; bem como o óleo extraído das suas sementes era utilizado na produção de sabões e tintas. A multiplicidade dos seus usos fazia com que a maioria do cultivo de canábis se destinasse a fins industriais. Apesar das suas características psicoativas já serem conhecidas anteriormente foi apenas durante a civilização greco-romana que a marijuana se tornou mais utilizada para fins recreativos, como substância de abuso. Por ser um produto caro, uma vez que era importado do Egipto, era usualmente consumido pelas classes mais ricas. Nem Hipócrates nem Galeno deram

especial relevância à utilização da planta para fins medicinais, limitando-se assim a ser utilizada em unguentos e em práticas de bruxaria. Em 1545 o cultivo de canábis foi do Chile para a Europa ocidental através da importação das suas sementes, a pedido de Espanha, com o intuito de utilizar a sua fibra na produção de corda. Em princípios do século XIX as tropas de Napoleão, regressadas do Egipto, introduziram o uso terapêutico da canábis na Europa ocidental. A planta aparece pela primeira vez na Farmacopeia em 1850 e pela última vez em 1942, período durante o qual várias empresas farmacêuticas comercializaram produtos contendo a planta. Durante a lei seca nos Estados Unidos, na década de vinte do século XX, houve um aumento do consumo de canábis enquanto substância de abuso. Na década de sessenta do mesmo século, com o movimento “hippie”, o consumo recreativo de marijuana estendeu-se à camada mais jovem da sociedade. Tanto na Europa como nos Estados Unidos era vista como uma droga de “rebelião”, associada a movimentos alternativos (Sca-centremedic.com, 2014).

Apesar do uso recreativo da canábis remontar à antiguidade histórica, as capacidades psicoativas desta planta sempre foram popularmente vistas como tendo potencial terapêutico para o tratamento de doenças do foro psiquiátrico. Devido ao efeito analgésico e anti-inflamatório dos canabinóides, também apresentavam potencial terapêutico no alívio da dor (Martin & Dewey, 2000).

Hoje em dia o consumo de canábis (folha da marijuana e haxixe) para fins recreativos tem vindo a aumentar, e encontra-se generalizado tanto na Europa como no resto do planeta, sendo a substância ilícita mais consumida no mundo, é plantada, tanto ao ar livre como em estufas interiores, em quase todos os países. No ano de 2012 estima-se que cerca de 2,7%-4,9% da população com idades compreendidas entre os 15 e os 64 anos tenham consumido canábis (UNODC, 2014). Hoje em dia, o produto derivado da canábis mais consumido na Europa é o haxixe, que provém da resina produzida pela planta fêmea (UNODC, 2014). As sementes de cânhamo são utilizadas na indústria alimentar para o fabrico de barritas energéticas e são também trituradas para fazer farinha, uma vez que são uma fonte saudável de proteína e óleos essenciais. A fibra proveniente do seu caule é utilizada para o fabrico de papel (Earleywine, 2005).

Alguns estudos, que comparam a evolução do teor em THC encontrado nas plantas ao longo do tempo, concluíram que este valor aumentou acentuadamente desde os anos sessenta do século passado até aos dias de hoje. Existem hoje em dia plantas com cerca de 20% de THC, que excedem em muito os valores descritos previamente, cerca de

0,5%-4% (Cascini, Aiello & Di Tanna, 2012). Os autores justificam este facto através dos avanços que foram feitos nas técnicas de hibridação entre espécies com diferentes teores de THC, aliados à evolução das técnicas de cultivo em interior (W.H.O., Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997).

1.1 – Consumo Humano de *Cannabis sativa* L.

1.1.1 – Farmacocinética:

Quando ingeridos, os canabinóides ficam sujeitos à chamada “primeira passagem hepática”, o que faz com que a biodisponibilidade do THC no sangue seja mais reduzida que quando a mesma massa de marijuana é fumada (Ashton, 2001). Sendo os efeitos do THC dose-dependentes e tendo em conta as diferenças de biodisponibilidade entre estas duas vias, pode afirmar-se que é necessário ingerir uma maior dose de canábis para que se verifiquem os mesmos efeitos em relação à mesma dose de planta quando fumada. Da passagem dos canabinóides pelo fígado resultam diversos metabolitos dos quais o mais relevante é o 11-hidróxi-THC, o qual é mais psicoativo que o THC (Howard, Twycross, Shuster, Mihalyo, & Wilcock, 2013).

Durante a digestão, o THC é lentamente absorvido ao longo de todo o intestino delgado, o que prolonga a duração dos efeitos agudos (intoxicação) provocados pelos canabinóides e que pode estender-se até seis horas (Barnett, Licko & Thompson, 1985). Este facto atrasa também o aparecimento dos efeitos que demoram entre trinta minutos a duas horas a serem notados; ao passo que quando a marijuana é fumada os seus efeitos agudos são notados poucos segundos após o consumo. Devido ao pico da concentração de THC no sangue se dar antes do aparecimento dos seus efeitos, pode-se afirmar que esta concentração não parece estar relacionada com os efeitos farmacológicos do THC (Barnett, Chiang, Perez-Reyes & Owens, 1982).

A rapidez do efeito induzido na administração de canabinóides por via inalatória deve-se à sua elevada hidrofobicidade que facilita a passagem destes compostos através dos alvéolos pulmonares para a corrente sanguínea. Uma vez aí, os canabinóides distribuem-se pelo resto do organismo, passando a barreira hemato-encefálica e chegando rapidamente ao sistema nervoso central. No cérebro, os canabinóides concentram-se mais nas regiões neo-cortical, límbica, motora e sensorial; este facto evidencia alguns dos efeitos verificados após o consumo de marijuana, que posteriormente serão referidos (Huestis, Sampson, Holicky, Henningfield, & Cone, 1992)

Os canabinóides são retidos com facilidade no tecido adiposo, uma vez que são moléculas fortemente lipossolúveis. Apesar dos seus efeitos psicoativos e fisiológicos passarem, usualmente, ao final de quatro a seis horas após o consumo, os canabinóides podem permanecer no organismo até trinta dias depois da última ingestão/inalação (figura

3), tempo durante o qual se vão libertando lentamente do tecido adiposo e passando para outros compartimentos. Este elevado tempo de semivida de eliminação dos canabinóides faz com que os efeitos do seu síndrome de abstinência sejam suavizados mas também com que sejam mais longos (Zhang, Yuan, Song, Zhou & Wang; 2014). Entre os efeitos referentes à abstinência de marijuana são de destacar a irritabilidade, a insónia e a perda de peso (Hasin *et al.*, 2005; Martin & Dewey, 2000).

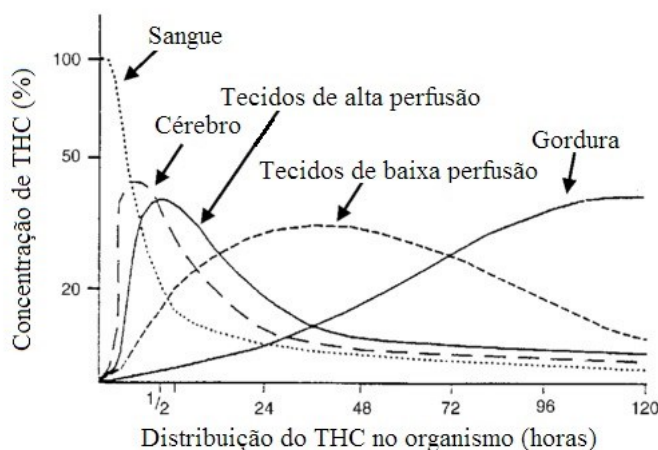


Figura 3. Distribuição do THC no organismo após uma única administração por via intravenosa (Adaptado de Ashton, 2001).

A metabolização dos canabinóides ocorre no fígado pela ação do sistema Citocromo P450, nomeadamente pela enzima CYP2C9, que produz vários metabolitos, alguns deles com efeitos psicoativos, outros responsáveis por outros efeitos, mas todos eles com a mesma solubilidade em tecidos gordos (Howard *et al.*, 2013). A eliminação dos compostos presentes na canábis e dos seus metabolitos é feita parcialmente pela urina (25%-30%), o remanescente permanece no intestino onde acaba por ser reabsorvido (Heuberger *et al.*, 2014).

Tendo em conta que o pico de concentração de THC no sangue, na urina e na saliva não está relacionado com o aparecimento dos seus efeitos agudos (Ginsburg, Hrubá, Zaki, Javors & McMahon, 2014) e sabendo que tanto os canabinóides como os seus metabolitos permanecem no organismo muito tempo depois do consumo, torna-se evidente a necessidade de serem estudadas formas de quantificar o THC e os seus metabolitos noutros tecidos e fluidos corporais, com o intuito de estabelecer uma relação direta entre a

intoxicação aguda por THC e a sua concentração no organismo (Cook, 1986; King, Martel & O'Donnell, 1987; Gjerde, 1991).

1.1.2 – Farmacodinâmica:

Quando em circulação nos diversos compartimentos do organismo, os canabinóides expressam os seus efeitos através da ligação a recetores específicos, que fazem parte do nosso sistema endocanabinóide. Estes recetores têm ação no sistema imunitário, no SNC e em outros locais. Os endocanabinóides mais relevantes são a anandamida (N-araquidonoil-etanolamina), o primeiro a ser descoberto, e a 2-araquidonil glicerina. Os recetores deste sistema endocanabinóide são o CB₁, encontrado maioritariamente nos neurónios periféricos e centrais e o CB₂, presente sobretudo em células do sistema imunitário. O THC comporta-se como um agonista parcial para estes dois recetores, já o CBD comporta-se como um antagonista CB₁/CB₂ contrariando alguns dos efeitos do THC (Ashton, 2001).

Os recetores CB₁ funcionam nos neurónios centrais inibindo a libertação de neurotransmissores fechando o canal de cálcio pré-sináptico e atuando como parte de um sistema de feedback negativo. Esta redução na libertação de neurotransmissores clarifica alguns dos efeitos do consumo de marijuana, como por exemplo a sua ação inibitória da memória, de funções cognitivas e coordenação motora (Fischer, Whitfield-Gabrieli, Roth, Brunette & Green, 2014). A nível periférico, os recetores CB₁, quando ativos, favorecem a acumulação de gorduras e aumentam a resistência à insulina. Estes recetores são também responsáveis por regular o metabolismo de energia. Os recetores CB₁ encontram-se amplamente distribuídos na maioria dos tecidos dos mamíferos, especialmente no SNC, onde estão em maior concentração no hipocampo, nos gânglios da base, no bulbo olfativo e no cerebelo (Martin & Dewey, 2002). Ainda no cérebro, estes recetores estão presentes no hipotálamo, no tronco encefálico, no tálamo e no sistema límbico, apesar de em menor concentração, facto que se pode relacionar com os efeitos do THC no apetite, perceção sensorial e na disposição ou espírito de recompensa (Fischer *et al.*, 2014). Os recetores CB₁ existem também nos adipócitos, nas células musculares esqueléticas, no fígado, no coração e nos órgãos sexuais de ambos os sexos (Martin & Dewey, 2002).

Os recetores CB₂ encontram-se fundamentalmente a nível periférico, especialmente em macrófagos presentes no baço (W.H.O., Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997). São estruturalmente diferentes dos recetores CB₁ e possuem especial relevância no sistema imunitário enquanto imunomoduladores. A ativação destes recetores altera o perfil das citocinas dos macrófagos, facto que poderá estar na origem do efeito anti-inflamatório e anti hiperalgésico da sua expressão (Atwood & Mackie, 2010).

1.1.3 – Efeitos do consumo humano de *Cannabis sativa* L.:

O consumo de canábis afeta quase todos os sistemas do organismo. A sua inalação ou ingestão tem um efeito ansiolítico, sedativo, analgésico, antiemético e psicadélico, entre outras respostas sistémicas (W.H.O., Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997).

A marijuana, enquanto droga de abuso, causa dependência, tolerância e síndrome de abstinência. É sabido que estes efeitos não estão só relacionados com as propriedades intrínsecas dos canabinóides mas também com uma multiplicidade de outros fatores. Entre estes, as influências sociais, a idade de início de consumo, as diferenças individuais e a frequência do consumo têm especial importância. O risco de desenvolver dependência de canábis, nos consumidores, é de 10%. Está estimado que, para os consumidores que iniciaram o uso da droga durante a adolescência, um em cada seis desenvolve dependência. Entre consumidores regulares de canábis (consumo diário) a probabilidade de desenvolver dependência sobe para os 50% (Hall, 2014).

Antes de descrever alguns dos efeitos produzidos pelo fumo de marijuana é importante que tenhamos em conta que estes são dependentes de uma multiplicidade de fatores. Entre estes fatores, o teor de THC presente na planta, o número de inalações, o tempo de retenção dessas mesmas inalações e a capacidade pulmonar são exemplos de variáveis a ter em consideração bem como as diferenças entre os indivíduos: o sexo, a idade e o número de consumos prévios. Existem algumas diferenças entre fumadores inexperientes e fumadores regulares, sobretudo a nível comportamental (Martin, Hodge, Royal & Jones, 1987).

É também importante saber que um “charro” normal contém entre 0,5g–1g de marijuana, ou seja, 5mg-150mg de THC. Depois da combustão estima-se que entre 20%-60%

do THC consiga entrar no organismo através do fumo, sendo o resto perdido durante a queima, quer em produtos de pirólise quer em fumo que não é inalado. A quantidade de THC que é absorvido através do consumo de um “charro” pode variar entre 5%-24% (W.H.O., Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997).

Estudos feitos em ratos analisaram a dose letal de THC. Os seus resultados foram extrapolados para os humanos e os valores obtidos indicam uma dose que varia entre 15g a 70g, quantidade de THC que excede em muito a dose passível de ser consumida num dia, até mesmo pelos consumidores mais experientes. É portanto virtualmente impossível ocorrer uma overdose fatal proveniente do consumo de canábis (Reveley *et al.*, 2000; Gable, 2004; Calabria, Degenhardt, Hall & Lynskey, 2010).

Alguns dos efeitos agudos do consumo de *Cannabis sativa* L. no comportamento passam por euforia, relaxamento, aumento da sociabilidade, perda de memória de curto prazo, aumento da percepção sensorial, aumento do apetite, perda da noção do tempo, sentimentos de despersonalização, ansiedade, tensão, confusão, paranoia e psicose. Durante a fase de intoxicação aguda as cores podem parecer mais nítidas, a música mais intensa e as emoções mais fortes. A percepção espacial pode também ficar comprometida (Martin & Dewey, 2000). Estes efeitos, que nem sempre aparecem em todos os indivíduos, revelam-se dose-dependentes no que toca à sua intensidade (Athanasiou *et al.*, 2007). Com doses elevadas de marijuana podem também ocorrer alucinações (Hermanns-Clausen, Kneisel, Szabo & Auwarter, 2013). Os seus diversos efeitos comportamentais parecem estar relacionados com o contexto social, espacial e ambiental em que a canábis é consumida. Os efeitos negativos parecem surgir com mais frequência em consumidores inexperientes e em indivíduos ansiosos ou com fragilidades psicológicas, tais como psicose ou síndrome obsessivo-compulsivo (Freeman *et al.*, 2014).

A intoxicação aguda pela canábis exerce um efeito simpaticomimético, que resulta em taquicardia e num aumento no débito cardíaco sem que haja aumento da pressão arterial (Kollins *et al.*, 2014). Apesar de ser raro uma intoxicação aguda por canabinóides despoletar um enfarte do miocárdio, o consumo de marijuana apresenta-se como um fator de risco para a ocorrência de eventos cardiovasculares em pessoas mais velhas ou com doenças coronárias ou cerebrovasculares subjacentes (Jones, 2002).

Ao longo da duração dos efeitos agudos da intoxicação por marijuana, foi verificado que esta causa uma vasodilatação da conjuntiva. Outro dos seus efeitos a nível oftálmico

é a redução da pressão intraocular, sendo o THC, hoje em dia, recomendado em alguns países para o tratamento do glaucoma (Yazulla, 2008).

Estudos que analisaram a interferência do consumo de canábis com a condução de veículos chegaram à conclusão que sob os efeitos agudos da droga, os condutores apresentam um risco de acidente duas a três vezes superior comparativamente a condutores que não estejam sob o efeito de nenhuma substância (Ramaekers, Berghaus, van Laar & Drummer, 2004).

A longo prazo, os consumidores regulares (consumo diário ou quase diário) de canábis mostraram, devido à sucessiva irritação das vias respiratórias causada pelo fumo, uma maior propensão a desenvolverem reações inflamatórias crônicas, tais como: tosse, bronquite, dispneia, faringite, exacerbação de sintomas de asma e fibrose cística (Tetrault *et al.*, 2007). Durante a combustão da planta, tal como referido anteriormente, formam-se produtos de pirólise. Estes, tal como os canabinóides, entram no nosso organismo pelas vias respiratórias através do fumo inalado. Os produtos desta pirólise (queima) são semelhantes aos produzidos durante a combustão do tabaco, com a agravante dos ‘charros’ serem normalmente fumados sem filtro e as inalações serem mais prolongadas e profundas do que quando se fuma tabaco. Por estas razões, a longo prazo, o consumo regular de canábis está relacionado com a maioria das doenças associadas ao consumo de tabaco, entre elas a doença pulmonar obstrutiva crónica, o cancro da boca e da laringe, o cancro do pulmão e o cancro da bexiga (Chacko, Heiner, Siu, Macy & Teris, 2006; Berthiller *et al.*, 2009; Hashibe *et al.*, 2005).

A nível neurofisiológico parecem haver algumas discordâncias no que toca às repercussões a longo prazo do uso regular de canábis (Hall, 2014). Apesar de alguns estudos terem revelado não haver qualquer ligação entre o uso regular de marijuana e quaisquer efeitos relevantes em processos neuro cognitivos, outros mostraram que, a longo prazo, o consumo intensivo de canábis provoca uma redução significativa nos volumes das áreas do cérebro onde os recetores CB1 estão em maior concentração, nomeadamente no hipotálamo e na amígdala (Yücel *et al.*, 2008). Esta redução de volume mostrou ser mais acentuada quanto maior for o historial de consumo da substância e subsequente exposição cumulativa (Lyketsos, Garrett, Liang & Anthony, 1999; Grant, Gonzalez, Carey, Natarajan & Wolfson, 2003; Fergusson, Poulton, Smith & Boden, 2006).

Estudos sugerem que as repercussões do consumo de canábis a longo prazo poderão estar relacionadas com a idade de início do consumo da droga (Demers, Bogdan & Agrawal, 2014). Foram encontradas dificuldades de aprendizagem, concentração e de realização de tarefas complexas por parte de consumidores que iniciaram o uso de canábis durante a adolescência (Solowij *et al.*, 2002; Solowij & Pesa, 2012).

O consumo de marijuana, a longo prazo, agrava ou despoleta episódios de esquizofrenia em sujeitos com predisposição genética para a doença (Rathbone, Variend & Mehta, 2008). Existe também evidência do consumo de marijuana causar outro tipo de psicoses mais graves do que as que por vezes surgem no momento da intoxicação aguda (Hermanns-Clausen *et al.*, 2013). Esta propensão para desencadear episódios de psicose surge pelo impacto da substância no sistema de libertação da dopamina (Spiga, Lintas & Diana, 2011). Estes episódios são tanto mais frequentes quanto maior for o consumo de marijuana. Vários estudos sugerem que não existe qualquer tipo de relação causa-efeito entre o consumo de canábis e a depressão (Fergusson *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2007; Lynskey *et al.*, 2004).

No que diz respeito à sua influência no sistema imunitário, o consumo de marijuana parece estar relacionado com a sua supressão. No entanto, não estão bem esclarecidas as consequências desta supressão para o organismo (Adams & Martin, 1996).

Apesar de não se conhecer explicação para este facto, o consumo crónico e intensivo de marijuana causa por vezes um síndrome conhecido como o síndrome da hiperémese dos canabinóides que, tal como o nome indica, é caracterizado por episódios recorrentes de náuseas e vómitos incontrolláveis acompanhados de dor abdominal. Estes episódios parecem desaparecer assim que o consumo da droga cessa (Sullivan, 2010).

Como referido anteriormente, também os órgãos sexuais masculinos e femininos apresentam concentrações consideráveis de recetores CB1. Este facto explica que também estes órgãos se vejam afetados pelo consumo de canábis (Braude & Ludford, 1984). Nos homens consumidores da droga foi verificada uma descida considerável dos níveis de testosterona produzidos, bem como uma menor mobilidade e contagem de espermatozoides. A infertilidade pode estar associada a um consumo intensivo da droga uma vez que se verificam alterações na constituição do sémen em consumidores crónicos (Hembree III, Nahas, Zeidenberg & Huang, 1999). Nas mulheres o consumo crónico de marijuana mostrou aumentar os níveis séricos de prolactina (Kolodny, Masters, Kolo-

ner & Toro, 1974). Em grávidas o consumo de canábis compromete o desenvolvimento fetal e está associado a um menor peso à nascença (Behnke & Eyler, 1993).

Um estudo revela que o consumo de canábis pode estar associado a um maior risco de aparecimento de periodontites (Thomson *et al.*, 2008).

1.1.4 – Citotoxicidade:

Os canabinóides podem perturbar o normal funcionamento do ciclo celular e podem diminuir a produção de ADN, ARN e de proteínas. Entre outros efeitos, o THC interrompe a formação intracelular de microtúbulos e microfilamentos, afetando a divisão celular e a diferenciação neuronal (Zimmerman, Padilla & Cameron, 1973; Blevins & Regan, 1976; Tahir & Zimmerman, 1992).

A capacidade dos canabinóides provocarem alterações cromossômicas, como deleções ou erros na separação das cadeias de ADN, não está bem caracterizada e existem alguns resultados inconclusivos na literatura (Zimmerman & Zimmerman, 1990; Chiesara, Cutrufello & Rizzi, 1983; Kaiser, Westbrook & Pitz, 2006). No entanto, a comunidade científica concorda que tanto o consumo de marijuana como a exposição aos seus produtos de pirólise pode ter efeitos mutagénicos no teste de Ames (Wehner, Van Rensburg & Thiel, 1980). É importante ter em conta que os efeitos de cada canabinóide individualmente são certamente diferentes dos efeitos combinados de todos os compostos presentes no fumo da canábis. O THC puro, por si só, não mostrou ter capacidade mutagénica (Zimmerman, Stich & San, 1978; Berryman, Anderson Jr, Weis & Bartke, 1992).

1.2 – O Uso Medicinal de Marijuana

Com o aumento do conhecimento das propriedades farmacológicas da *Cannabis sativa* L., a partir dos anos setenta do século XX, foram propostos alguns usos terapêuticos para a planta. Entre estes usos destacavam-se a sua utilização no tratamento da náusea e do vômito (induzidos pela quimioterapia), na prevenção da perda de peso associada à SIDA, no tratamento do glaucoma e na diminuição da dor neuropática (Watson, Benson & Joy, 2000).

Desde a descoberta do sistema endocanabinóide e dos seus recetores, levada a cabo por volta dos anos noventa do século passado, vários foram os esforços da indústria farmacêutica para sintetizar, em laboratório, o principal composto psicoativo e o maior responsável pelos efeitos da marijuana, o THC. O composto sintetizado mais estudado é um trans-isómero da molécula, o dronabinol. Outro canabinóide sintético bem estudado é o seu análogo, o nabilone (Chakravarti, Ravi & Ganju, 2014). No entanto, os efeitos da marijuana no organismo não se resumem aos efeitos do THC, é sabido que os outros canabinóides presentes na planta também influenciam os seus efeitos (Solowij *et al.*, 2014). O canabidiol, por exemplo, é responsável por um alívio da ansiedade provocada pelo THC e tem efeito anti psicótico sem ser sedativo (Reveley *et al.*, 2000).

Uma combinação destes dois canabinóides (canabidiol + THC) em extratos da planta, sob forma de spray oral, é hoje comercializada em países como: Canadá, Espanha, Reino Unido e Israel. Este produto, designado por SATIVEX® (figura 4) está indicado para o tratamento adjuvante no alívio sintomático da dor neuropática em adultos com esclerose múltipla. Está também indicado, enquanto analgésico, em doentes oncológicos adultos com cancro em estadio avançado, de forma a aliviar a dor que resiste à terapia com a maior dose tolerada dos opiáceos mais fortes (Russo & Guy, 2006; Fusar-Poli *et al.*, 2009; Wade, Robson, House, Makela & Aram, 2003; Notcutt *et al.*, 2004).



Figura 4. Sativex® - 2,7 mg de Δ^9 -THC + 2,5 mg de canabidiol (adaptado de Fox, 2014).

O trans-isómero da molécula de THC sintetizado em laboratório, o dronabinol (figura 5), é comercializado em cápsulas para toma oral sob o nome de MARINOL® (figura 6). Está indicado para o tratamento da náusea e vômitos severos resultantes da quimioterapia, em doentes que não responderam à terapia antiemética *standard*, bem como tem indicação para o tratamento de segunda linha na perda de peso, causada pela anorexia, em doentes com SIDA. O MARINOL® está à venda em países como a Alemanha, os Estados Unidos da América e o Canadá (Mack & Joy, 2001).

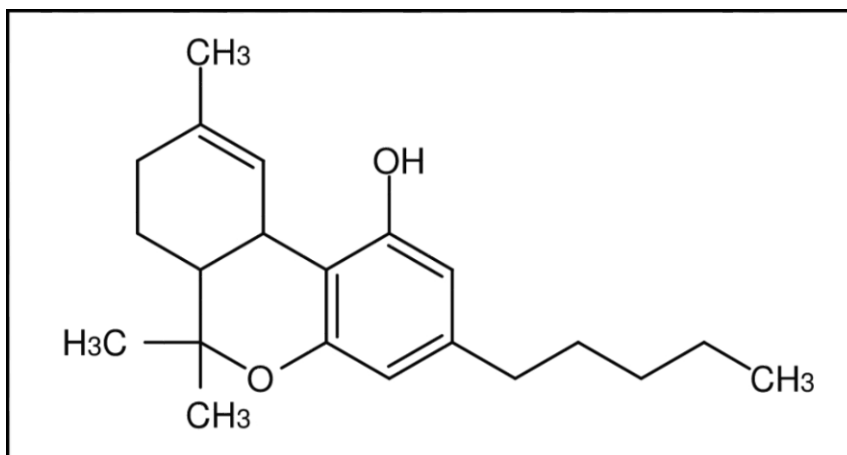


Figura 5. Estrutura química do dronabinol (adaptado de Commons.wikimedia.org, 2010).

1. Introdução



Figura 6. Marinol® - 5mg de dronabinol em cápsulas (adaptado de Leaf Science, 2014).

Uma molécula desenhada tendo por base o dronabinol, o nabilone (figura 7), é também comercializada para o alívio da náusea e dos vômitos severos subsequentes à quimioterapia. Tem o nome comercial de CESAMET® (figura 8) no México, nos Estados Unidos da América, no Canadá e no Reino Unido. Na Áustria é comercializado como CANEMES®.

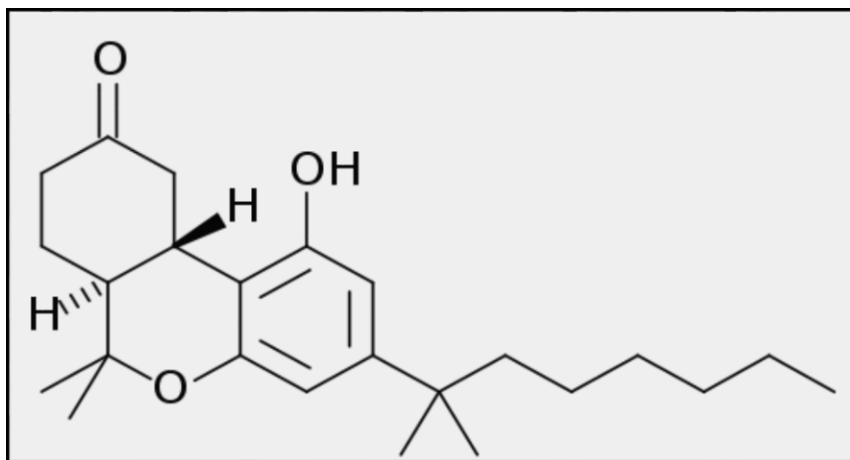


Figura 7. Estrutura química do nabilone (adaptado de Commons.wikimedia.org, 2009).



Figura 8. Cesamet® - 1mg de nabilone em cápsulas (adaptado de Cesamet.com, 2014).

Todos estes fármacos estão sujeitos a receita médica nos países onde são vendidos (*Workers Compensation Board of Nova Scotia*, 2012; Mack & Joy, 2000).

Os canabinóides sintéticos estão desaconselhados em doentes com historial de distúrbios psiquiátricos, pois podem ocorrer alterações no comportamento ou no humor. Devido ao risco de causarem hipotensão postural ou taquicardia reflexa, os doentes com isquémia cardíaca severa, insuficiência cardíaca ou arritmias estão também desaconselhados de tomar estes fármacos (Howard *et al.*, 2013). Devido ao mecanismo de metabolização e eliminação destas substâncias, deve ser dada especial atenção a doentes com insuficiência renal ou hepática, quando lhes é prescrito qualquer um destes compostos. Os canabinóides tanto podem baixar como aumentar o limiar dos ataques epiléticos, como tal, não é recomendado o seu uso em doentes com epilepsia (Howard *et al.*, 2013). No entanto existem ainda defensores de que as propriedades medicinais da canábida só são completamente aproveitadas quando a planta é fumada (Martin & Dewey, 2002). Contudo, esta perspetiva sobre o consumo medicinal da canábida revela várias fraquezas, entre as quais: (i) variabilidade de efeitos que se verificam entre indivíduos; (ii) diferentes plantas de canábida podem variar entre si no que toca ao seu teor em THC; (iii) absorção dos compostos está relacionada com o número de inalações e com o tempo de retenção do fumo nos pulmões, o que faz com a dose de THC administrada em cada “charro” seja difícil de prever. Os principais defensores do uso medicinal de canábida fumada são também defensores da legalização do seu uso enquanto droga recreativa, o que deixa transparecer alguma parcialidade na sua argumentação. Mais estudos, de preferência bem controlados, e feitos de modo a excluir todos os fatores capazes de envie-

sar as conclusões, são necessários para que a comunidade científica possa dar o seu veredicto sobre o assunto (Martin & Dewey, 2002).

1.2.1 – A canábis e a lei:

A legalização da canábis sempre foi um assunto polémico, com fortes apoiantes dos dois lados da questão. Hoje em dia, a maior parte dos países considera ilegal a posse, a venda, o transporte e o cultivo de *Cannabis sativa* L.. Contudo, existem algumas exceções em países como a Suíça, a Espanha, o México, a Itália e a Alemanha, onde apenas a posse de canábis não é criminalizada; na Holanda e na República Checa todas estas modalidades são liberalizadas; na Bélgica e na Austrália tanto o cultivo (desde que para uso pessoal) como a posse de canábis estão descriminalizados. A Rússia, o Canadá e o Peru são exemplos de países onde existe a liberalização da posse, do cultivo (para uso pessoal) e do transporte de canábis, sendo ilegal a sua venda. O Uruguai é o único país do mundo onde é legal plantar, possuir, vender e transportar *Cannabis sativa* L.. Já na Jamaica, apenas o seu transporte é ilegal, sendo as outras modalidades liberalizadas, ou seja, não constituintes de crime. Nos Estados Unidos a posse, o cultivo, a venda e o transporte da canábis são ilegais do ponto de vista federal, no entanto estas quatro modalidades são legais no estado do Colorado e de Washington. A sua posse é liberalizada em mais 14 estados e o cultivo, transporte, venda e posse de marijuana para fins medicinais é legal. É de salientar que Portugal, em 2001, foi o primeiro país do mundo a descriminalizar o consumo de todas as drogas, e a olhar para os consumidores como doentes necessitando reabilitação, em vez de criminosos. No nosso país, apenas a posse e o transporte de canábis estão descriminalizadas. Sendo a quantidade (massa) o fator que separa o consumo do tráfico (*Legislação de Combate à Droga*, 1993; *Ncpic.org.au*, 2014; *Erowid.org*, 2014; *The Economist*, 2013; *The Economist*, 2014; *Jamaicagleaner.com*, 2014; *Reuters*, 2014).

1.3 – Enquadramento do Estudo

Os vários pontos supracitados nos capítulos anteriores, nomeadamente o aumento do consumo de marijuana, que se tem vindo a verificar a nível mundial e os seus efeitos negativos a curto e longo prazo, permitem afirmar que o consumo de canábis se trata de um problema de saúde pública. O facto dos teores em THC encontrados nas plantas estarem a aumentar, aliado ao facto do funcionamento do sistema endocanabinóide a nível neuronal estar ainda pouco compreendido, enquadram o presente estudo como um passo na direção de um melhor conhecimento dos efeitos celulares do consumo de *Cannabis sativa* L.. Este estudo tem como objetivo averiguar a capacidade dos compostos constituintes do fumo da marijuana em provocar a morte de células do sistema nervoso, afetando a sua viabilidade.

2. Material e Métodos

2.1 – Reagentes:

O metanol utilizado durante toda a experiência foi comprado à *VWR*®. O ácido fórmico e o acetonitrilo usados na identificação dos compostos por HPLC-UV; o dimetilsulfóxido (DMSO), o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e o trypan blue a 0,4%, para a cultura e contagem celular; o Triton X-100 a 1% utilizado para o controle positivo e a solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) usada no ensaio de citotoxicidade, foram todos adquiridos à *SigmaAldrich*®. O *Penstrap* (penicilina a 100U/mL + estreptomicina a 0,1mg/mL + L-glutamida a 2mM) e o *Tryple Express*® usados na cultura celular foram adquiridos à *Gibco – Live Technology*®. O soro fetal bovino a 10% foi comprado à *PAA Laboratories*® GmbH. O PBS (*Phosphate Buffered Saline*) utilizado veio da *Oxoid*®. A água utilizada foi filtrada através de uma Millipore UV Simplicity, da Merck® Millipore. A solução padrão de THC deuterado a 1mg/mL foi gentilmente cedida para este estudo pela Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal.

2.2 – Amostra para análise:

As folhas de *Cannabis sativa* L. utilizadas como amostra neste estudo são provenientes de uma apreensão policial e gentilmente cedidas pela Polícia Judiciária, após a solicitação ao Instituto da Droga e da Toxicodependência.

Como referido na primeira parte deste trabalho, hoje em dia, os teores em THC total nas plantas de cânabis chegam até aos 20% (Cascini *et al.*, 2012; W.H.O., Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997). Como tal, foi admitido para a planta utilizada como amostra, um teor em THC total de 15%, ou seja, em cada 160mg de *Cannabis sativa* L. pesados para este estudo, estão presentes, em teoria, 24mg de THC+THCA.

2.3 – Extração:

O procedimento na extração metanólica dos compostos da marijuana foi adaptado de UNODC (2009). Foram pesados 320mg de *Cannabis sativa L.*, 160mg foram extraídos em metanol e posteriormente sujeitos a um banho de sonicação de 10 minutos. A solução resultante foi depois filtrada utilizando um filtro de 0,2µm da VWR®.

Os outros 160mg foram queimados usando um sistema que mimetiza o processo de pirólise a que a planta é sujeita durante o seu consumo por via inalatória. O sistema induz a passagem dos compostos resultantes da queima por um solvente aquoso e outro orgânico.

2.4 – Pirólise:

Tendo em conta que o consumo de marijuana é feito maioritariamente através da inalação do fumo produzido pela combustão da planta, foi criado em laboratório um sistema capaz de reproduzir o fenómeno bem como armazenar os produtos dessa combustão em dois solventes diferentes (figura 9). O solvente aquoso (30mL de DMEM), presente na primeira armadilha, retém os produtos hidrofílicos da pirólise. O metanol (60mL), enquanto solvente orgânico e presente na segunda armadilha, retém os canabinóides e outras substâncias hidrófobas.

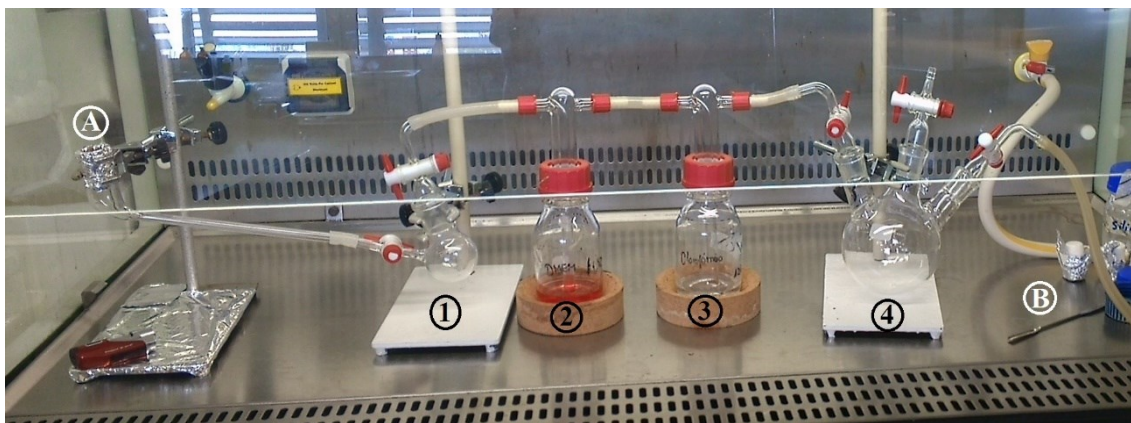


Figura 9. Sistema de “fumo” da amostra: as folhas de canábis pesadas (160mg) são colocadas na extremidade do cachimbo (A) e incineradas com um isqueiro. O fumo produzido é puxado por uma bomba de vácuo (B). Durante o trajeto de A para B o fumo atravessa uma válvula de segurança (1), entra na primeira armadilha - fase aquosa (2) passa pela segunda armadilha – fase orgânica (3). Finalmente o fumo atravessa outra válvula de segurança (4) antes de ser descartado.

A solução aquosa da primeira armadilha foi armazenada em frigorífico a 6°C e posteriormente utilizada para perfazer os volumes das soluções finais dos meios de cultura celular em DMSO a 0,2% (percentagens maiores de DMSO são potencialmente tóxicas a nível celular) (Yuan *et al.*, 2014). Esta solução aquosa não foi quantificada por HPLC-UV, devido à falta da existência de padrões para os produtos hidrossolúveis da pirólise. Uma parte da solução orgânica retirada da segunda armadilha (62µl), após a queima, foi usada para a identificação e quantificação dos canabinóides por cromatografia gasosa (GC-MS (EI+)) e por cromatografia líquida (HPLC-UV), respetivamente. A restante parte do extrato foi evaporada com recurso a um rotavapor (*rotary evaporator N-1000 + oil bath OSB-2000*, ambos da EYELA®); o resíduo resultante foi depois dissolvido em DMSO a 100% para a preparação das soluções-amostra usadas no ensaio de viabilidade celular. Esta solução-mãe com DMSO a 100% foi depois filtrada utilizando um filtro de 0,2µm da VWR®. As concentrações finais de substâncias lipossolúveis provenientes da queima de *Cannabis sativa* L. nas soluções-amostra foram de 0,0002mg/mL, 0,001mg/mL, 0,002mg/mL, 0,01mg/mL, 0,02mg/mL, 0,034mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL; todas elas com DMSO a 0,2%.

2.5 – Identificação dos canabinóides presentes na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L. por Gas Chromatography–Mass Spectrometry de ionização por impacto eletrónico (GC-MS (EI+)):

Uma alíquota (2µl) da solução orgânica recolhida na segunda armadilha do sistema de fumo foi analisada por um sistema de GC-MS (EI+) *Agilent Technologies*® modelo 6850 Network GC, acoplado a um espectrómetro de massa de ionização por impacto eletrónico (EI+) modelo 5975 VL MSD (*Agilent Technologies*®). A separação dos diferentes compostos presentes na amostra foi obtida utilizando uma coluna HP5-MS (30m x 250µm x 0,25µm) (*Agilent-J&W Scientific*®, Espanha). O gás de arraste utilizado foi o hélio (fluxo constante a 1,0mL/min). O programa de temperatura do forno aplicado na análise da amostra seguiu um perfil de 60°C durante 3 min, seguindo-se uma rampa a 15°C/min até aos 180°C, finalmente chega aos 315°C, numa rampa a 25°C/min, onde se mantém durante 13,6 min, resultando num tempo total de 26 minutos. O GC foi operado sem repartição (modo *splitless*), com uma purga de 5 min e um injetor a 250°C. Os espetros de massa foram obtidos por impacto eletrónico (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*®.

2.6 – Quantificação do THC presente na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de Cannabis sativa L. por High Performance Liquid Chromatography com detecção ultravioleta (HPLC-UV):

O equipamento de HPLC-UV utilizado foi um *Hitachi Lachrom* da *Merck*®, de injeção manual, constituído por bombas L-7100, um forno de coluna L-7350, um detetor UV L-7400 (a 228nm) e um interface D-7000. A coluna utilizada foi uma *LiChrospher* 100 RP-18 (5µ) da *Merck*® *Millipore* com 12,5cm de comprimento e 4mm de diâmetro. As fases móveis foram (1) uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e (2) acetonitrilo. O ensaio foi realizado usando um método isocrático, ou seja, sem diferenças de gradiente. O tempo de cada corrida era de 10 minutos à velocidade de 1mL/min. Todas as injeções (amostras e padrões) foram de 20µl e feitas em três replicados. Os dados obtidos foram analisados pelo software D7000 HSM da *Merck*®.

Os padrões utilizados para fazer a reta de calibração do THC foram feitos utilizando uma solução *standard* de THC deuterado a 1mg/mL com acetonitrilo como solvente. As concentrações das soluções-padrão utilizadas para a realização da reta foram: 50µg/mL; 100µg/mL, 150µg/mL, 200µg/mL, 250µg/mL e 300µg/mL.

2.7 – Cultura celular:

As células utilizadas neste estudo foram neuroblastomas da linha celular SH-SY5Y (*America Type Culture Collection*®) gentilmente cedidas pelo Dr. Tiago Outeiro do Instituto de Medicina Molecular. Todos os processos envolvendo a cultura celular foram feitos em câmara de fluxo laminar vertical, que foi exaustivamente esterilizada ao longo do ensaio utilizando álcool a 70%. Adicionalmente, 10 minutos antes da utilização, a câmara foi sempre submetida a esterilização por luz ultravioleta.

A cultura foi feita utilizando DMEM + soro fetal bovino a 10% + *Penstrap* (penicilina a 100U/mL + estreptomicina a 0,1mg/mL + L-glutamida a 2mM).

Foram utilizados frascos de cultura de 25cm². À oitava passagem, quando se verificou uma confluência maior ou igual a 80%, as células foram limpas com PBS e desagregadas da parede do frasco com auxílio do *Tryple Express*®, que atuou durante um minuto. Após a inativação da tripsina através da adição de DMEM, procedeu-se à contagem celular numa câmara de Neubauer usando trypan blue a 0,4%, como corante numa diluição de 1:5. Com base nos resultados da contagem, resuspenderam-se as células em meio de cultura até se obter a concentração desejada para o ensaio de viabilidade celular (1,5x10⁶ células/mL). 200µl desta suspensão celular foram colocados em 60 poços numa microplaca de 96 poços (12x8), que posteriormente foi a incubar durante 24 horas em atmosfera húmida numa estufa a 37°C com 5% de CO₂.

2.8 – Estudo de viabilidade celular com MTT:

Para a realização deste estudo usámos o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) no ensaio de viabilidade celular após uma exposição de 24 horas aos compostos resultantes da queima da *Cannabis sativa* L.. Este ensaio foi escolhido pela sua simplicidade e rapidez de leitura de resultados. O ensaio com MTT deteta a atividade mitocondrial através de um método colorimétrico. Quando as células estão vivas, as mitocôndrias, através das suas desidrogenases, reduzem o MTT que tem uma cor amarela, num corante artificial que precipita, formando os chamados cristais de formazan, que apresentam uma cor arroxeadada. A concentração destes cristais é estimada por espectrofotometria e a percentagem de MTT reduzido (ou cristais de formazan produzidos) é diretamente proporcional à viabilidade celular. (Marshall, Goodwin & Holt, 1995)

Como referido anteriormente, as concentrações dos compostos lipossolúveis resultantes da queima de *Cannabis sativa* L. (entre eles os canabinóides) escolhidas para as soluções-amostra do ensaio de viabilidade celular foram 0,0002mg/mL, 0,001mg/mL, 0,002mg/mL, 0,01mg/mL, 0,02mg/mL, 0,034mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL. Estes valores foram calculados com base no pressuposto da obtenção de um rendimento de 50% da queima (W.H.O., Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, 1997), isto é, dos 24mg de THC (admitindo que existem 15% de THC em 160mg da *Cannabis sativa* L. pesada) da amostra inicial, obtivemos, teoricamente, cerca de 12mg de THC como resultado da pirólise. Estes 12mg de THC total (em DMSO a 100%) foram diluídos na solução aquosa retirada da primeira armadilha para fazer as

concentrações calculadas, tendo em conta que as soluções-amostra teriam todas de estar a 0,2% de DMSO.

No controlo positivo foi utilizado o detergente Triton X-100 a 1% para matar todas as células.

Depois da última incubação, e estando as células aderentes ao fundo de cada poço, o meio excedente foi descartado e foram posteriormente adicionadas aos diferentes poços 200µl das soluções-amostra; 200µl da solução de Triton X-100 a 1% para o controlo positivo e 200µl da solução de DMEM com DMSO a 0,2%, para o controlo negativo e para o branco (poço sem células). Cada adição foi feita em seis replicados. A microplaca foi novamente incubada durante 24 horas nas condições anteriormente referidas. Passado este tempo em contacto com as células, as soluções resultantes foram descartadas da placa, os poços limpos com 100µl de DMEM a 37°C (para retirar qualquer vestígio dos compostos das amostras). Foram adicionados a cada um destes poços 200µl de uma solução aquecida (37°C) de MTT a 0,5mg/mL em DMEM, previamente preparada na câmara de fluxo laminar vertical. A placa foi deixada a incubar em estufa, nas condições referidas anteriormente, durante 2 horas e meia. A solução excedente de MTT nos poços foi retirada, os cristais de formazan depositados no fundo de cada poço foram resuspen-didos em DMSO a 100%, e a placa foi levada ao espectrofotómetro para serem lidas as absorvâncias das soluções. Os resultados do ensaio com MTT foram lidos num espectro-fotómetro da *Bio-Rad® Laboratories, model 650 Microplate Reader S/N 00000* a uma absorvância de 595nm.

2.9 – Validação do método:

Para averiguar a linearidade do ensaio de quantificação por HPLC-UV foi elaborada uma reta de calibração (figura 10), que exprime a relação entre a concentração do analito e a sua área correspondente no cromatograma. No cálculo da reta de calibração foram feitas seis soluções padrão de THC a concentrações diferentes (50µg/mL; 100µg/mL, 150µg/mL, 200µg/mL, 250µg/mL e 400µg/mL), cada uma foi analisada em três repli-cados e para todas foi determinado o desvio-padrão e as médias das áreas dos picos. Contudo, devido a um erro significativo de preparação da solução-padrão a 200µg/mL, as áreas obtidas nos cromatogramas desta solução foram muito diferentes daquilo que seria espectável de acordo com a linearidade do ensaio. Como tal, os valores relativos às

áreas dos picos observados por HPLC-UV da solução padrão a 200µg/mL foram desprezados na construção da reta. O teste de Dixon identificou o valor da área da primeira corrida com a solução padrão de THC a 400µg/mL (tabela 1, figura 10) como um “outlier”, por isso, este valor foi igualmente desprezado na construção da reta.

Foi calculado o limite de detecção e de quantificação do THC do equipamento de HPLC-UV. O limite de detecção (LD) corresponde à mais pequena quantidade de analito que é possível detetar numa amostra. O limite de quantificação (LQ) diz respeito ao valor mínimo quantificável pelo equipamento. No caso do HPLC-UV, o LD foi determinado através da seguinte equação:

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

Sendo: $s_{y/x}$ o desvio padrão residual; y_r a ordenada real, y_t a ordenada teórica, b o declive da reta de calibração 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 tem a forma de uma curva de Gauss (Miller & Miller, 2000). De modo semelhante é possível determinar o LQ, considerando agora a constante K como 10. Os limites de detecção e quantificação do HPLC-UV utilizado, calculados para o THC, foram respetivamente cerca de 18,94µg/mL e de 57,40µg/mL.

Durante a cultura celular, tanto o método das passagens, como o valor final de concentração celular na solução a aplicar nos poços das microplacas ($1,5 \times 10^5$ células/mL) já estavam otimizados pela equipa do laboratório de patologia molecular do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, onde fui inserido. Os ftalatos são compostos presentes no plástico e nas borrachas que são potencialmente tóxicos a nível celular (Wu *et al.*, 2014). Estes compostos poderiam ter sido libertados para o fumo durante a sua passagem pelas mangueiras que uniam as diferentes partes do sistema de fumo utilizado. Como tal, para evitar um possível enviesamento dos resultados obtidos, confirmou-se a ausência de ftalatos (numa amostra de solução extraída de uma das armadilhas do sistema de fumo utilizado, numa experiência feita em paralelo sem amostra para queima) por CG-MS. No ensaio de viabilidade celular (MTT), como o método já estava otimizado pela equipa referida anteriormente, apenas foi feito um controlo do utilizador, usando o teste de Dixon para remover possíveis “outliers” nas absorvâncias lidas. Este

teste, bem como o tratamento dos resultados foi feito recorrendo ao *software Microsoft Excel® 2013* (versão 8.1.1030.1550). Não foi realizado nenhum tratamento estatístico uma vez que o número de ensaios independentes não foi suficiente.

3. Resultados e Discussão

Como referido anteriormente, o objetivo deste trabalho experimental é o estudo do impacto causado na viabilidade celular dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L., em neuroblastomas da linha celular SH-SY5Y. Como tal, para o cumprimento deste propósito, foi necessário recorrer a técnicas de identificação e quantificação dos compostos presentes na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise da planta, através de GC-MS (EI+) e HPLC-UV, respetivamente. Os resultados destas duas técnicas vão ser apresentados e discutidos neste capítulo bem como os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular feito com MTT.

3.1 – Identificação dos canabinóides presentes na amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L. por *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* de ionização por impacto eletrónico (GC-MS (EI+)):

Como se verifica da leitura do cromatograma obtido para a amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L. (segunda armadilha) por GC-MS (EI+) (figura 10) existem sete picos proeminentes, excluindo o primeiro que se trata de um pico de solvente. Estes picos representam sete compostos diferentes identificados na amostra em estudo. Os picos 5, 6 e 7 correspondem aos compostos que se encontram em maior abundância. Através da leitura dos seus espetros de massa (anexo 1 – gráficos 6, 7 e 8), podemos concluir que os picos 5, 6 e 7 correspondem, respetivamente, ao Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), ao Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (figura 11) e ao canabinol (CBN) (com 94%, 97% e 87% de certeza, respetivamente). Outros canabinóides foram igualmente identificados na amostra extraída, nomeadamente o Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (com 87% de certeza), o canabicromeno (com 78% de certeza), o Δ^1 -THC sililado (com 72% de certeza) e o canabicitolol (com 87% de certeza), respetivamente nos picos 1, 2, 3 e 4 (anexo 1 – gráficos 2, 3, 4 e 5).

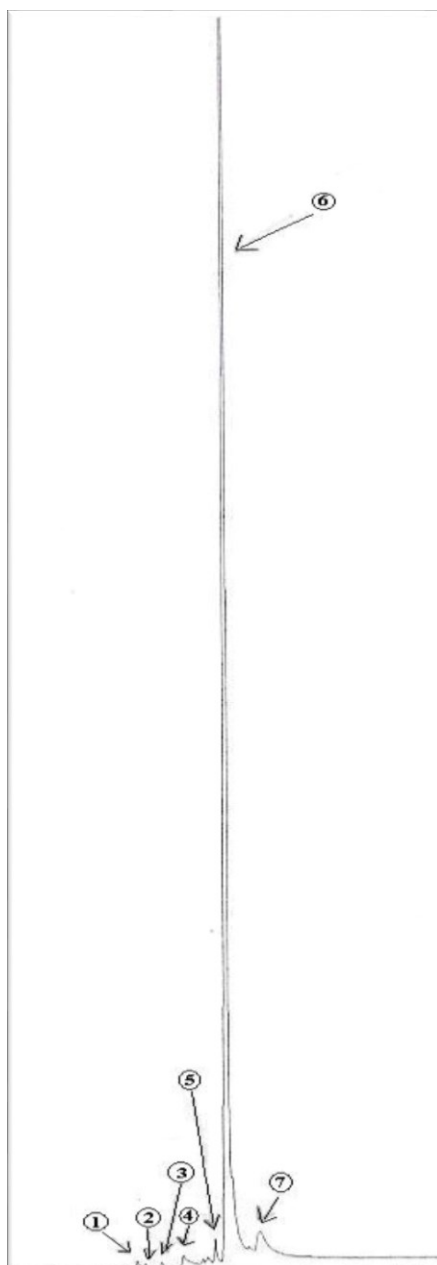


Figura 10. Parte do cromatograma obtido para a amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L por GC-MC (EI+), evidenciando os sete picos principais que representam, respetivamente: o (1) Δ^9 -tetrahydrocannabinol, o (2) canabidiol, o (3) Δ^1 -THC sililado, o (4) canabicitrol, o (5) Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), o (6) Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e o (7) canabinol (CBN).

3. Resultados e Discussão

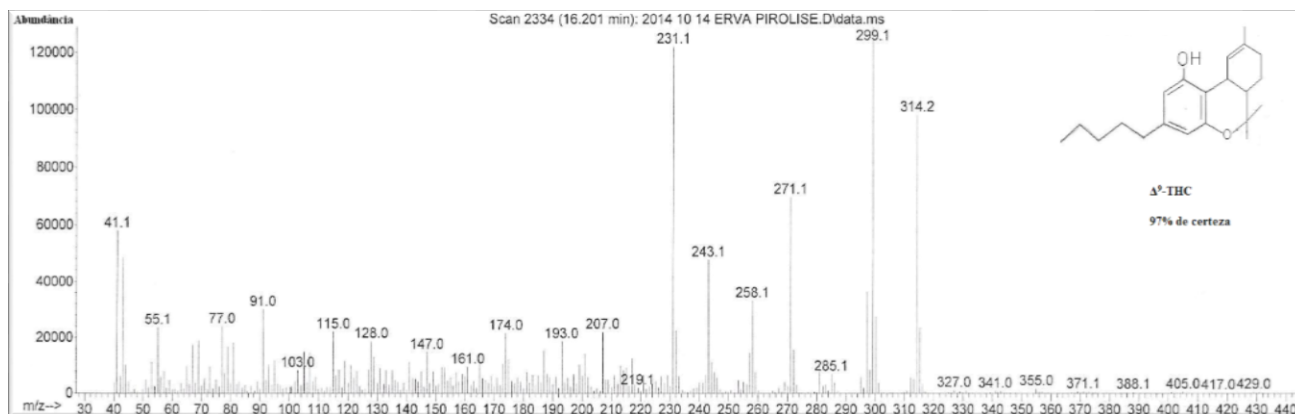


Figura 11. Espectro de massa, obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 6 (figura 10), o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC).

Conclui-se assim que na amostra em estudo (solução orgânica extraída da segunda armadilha do sistema de fumo), existem pelo menos sete canabinóides diferentes, entre os quais o Δ^8 -THC, o Δ^9 -THC e o CBN, que se encontram em maior quantidade. O Δ^9 -THC é indiscutivelmente o composto mais abundante, sendo cerca de trinta vezes mais abundante do que os restantes canabinóides identificados na amostra (anexo 1 – gráfico 1).

3.2 – Quantificação do THC total a partir de *High Performance Liquid Chromatography* com detecção ultravioleta (HPLC-UV):

3.2.1 – Reta de calibração:

Tabela 1. Áreas, médias e desvios-padrão obtidos através da leitura dos cromatogramas, obtidos por HPLC-UV, correspondentes aos padrões de THC utilizados.

| Padrões de THC ($\mu\text{g/mL}$) | | 50 | 100 | 150 | “outlier” 200 | 250 | 400 |
|--|-----------|----------|----------|----------|------------------|----------|----------|
| Área | Corrida 1 | 68810 | 650954 | 990577 | 1399390 | 1616543 | 3037480 |
| | Corrida 2 | 56493 | 619229 | 908124 | 1360445 | 1511683 | 2675736 |
| | Corrida 3 | 41250 | 593162 | 929673 | 1426087 | 1551159 | 2755994 |
| Média | | 55030 | 621115 | 942791,3 | 1395307 | 1559795 | 2715865 |
| Desvio p. | | 19487,86 | 28942,12 | 42763,21 | 33010,89 | 52960,74 | 56750,98 |

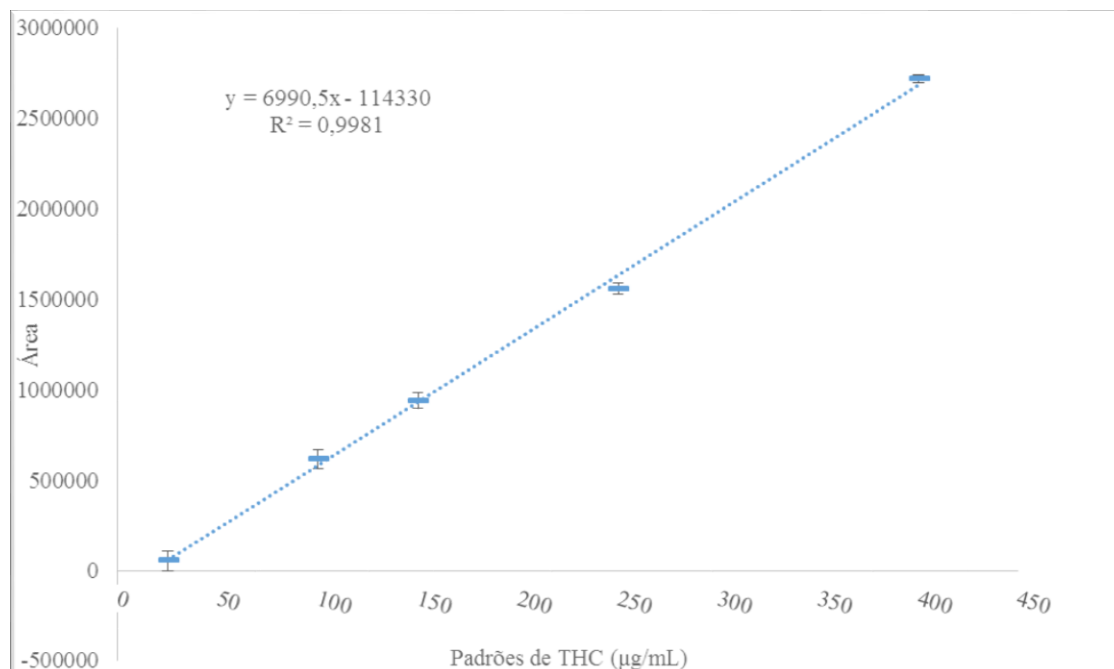


Figura 12. Reta de calibração do THC com respectiva equação; obtida através das médias das áreas lidas, conjuntamente com o desvio padrão e fator de correlação (R2) calculados.

Como acima referido, o teste de Dixon determinou o valor da primeira corrida da solução padrão a 400µg/mL como sendo um “outlier” sendo por isso desprezado no cálculo da reta; da mesma forma os valores de todas as corridas com a solução padrão a 200µg/mL foram igualmente desprezados.

Os resultados da reta de calibração evidenciam uma linearidade satisfatória no ensaio de quantificação do THC por HPLC-UV, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9981 (figura 12).

3.2.2 – Amostra:

O HPLC-UV é um dos métodos descritos em *Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products* (UNODC, 2009) como válidos para a quantificação do teor de THC total (THC+THCA) presente num extrato de cannabis feito em metanol. Como tal, foi este o método escolhido neste estudo para a quantificação do THC total presente na amostra da solução metanólica retirada da segunda armadilha do sistema de fumo.

Os cromatogramas resultantes das três corridas efetuadas com alíquotas da amostra em estudo (anexo 2 – gráficos 1, 2 e 3) mostram vários picos, evidenciando a presença de diversos compostos presentes na extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L.. O primeiro pico (negativo) é o pico do solvente. Numa cromatografia líquida com coluna de fase reversa, quanto maior o tempo de retenção de um composto, maior a sua hidrofobicidade. Sabe-se que o tempo de retenção do THC, nas condições da corrida efetuada, é de $5,0 \pm 0,1$ minutos. Este valor foi calculado através da média dos tempos de retenção dos padrões de THC utilizados para construir a reta de calibração. Pode-se desta forma concluir que nos três cromatogramas obtidos (anexo 2 – gráficos 1, 2 e 3), o pico correspondente ao THC total presente na amostra é o pico A (figura 13).

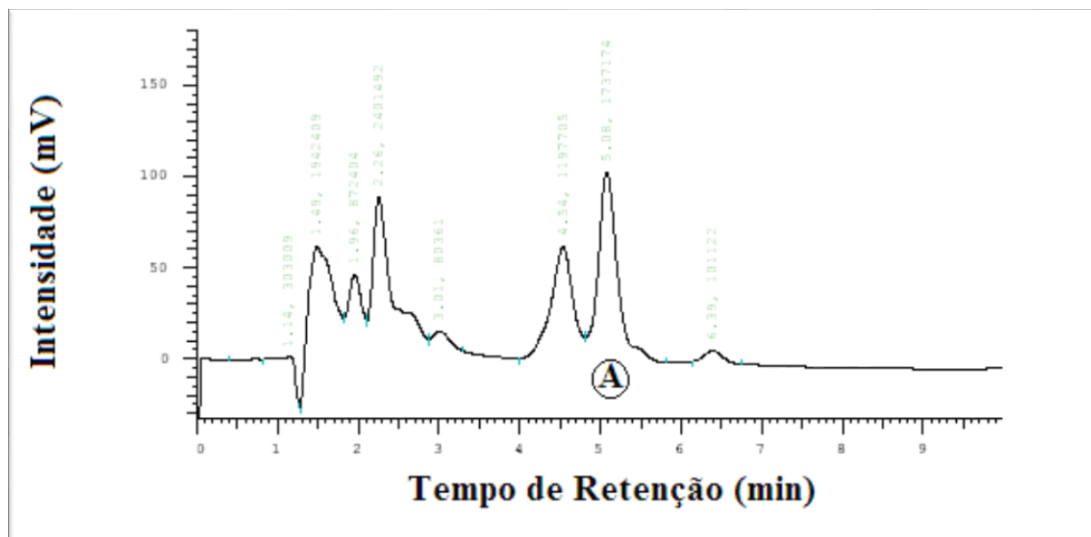


Figura 13. Cromatograma, obtido por HPLC-UV, da primeira corrida da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L. (A) THC total (THC+THCA).

Tabela 2. Áreas lidas para o pico A nos três cromatogramas, obtidos por HPLC-UV, da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L. e respetiva média.

| | Área |
|-----------|---------|
| Corrida 1 | 1737174 |
| Corrida 2 | 1682126 |
| Corrida 3 | 1661281 |
| Média | 1693527 |

Da média das áreas obtidas para esse pico (A) nos diferentes cromatogramas (tabela 2), estimou-se, a partir da reta de calibração feita previamente (figura 12), a quantidade de THC total (THC+THCA) presente na amostra. Assim, determinou-se que a amostra estudada tem uma concentração total de THC de 258,62 μ g/mL, portanto, em 60mL de solução metanólica extraída da segunda armadilha do sistema de fumo, obtiveram-se cerca de 15,5mg de THC+THCA, valor muito próximo do pressuposto no início do estudo. Foi admitido que existia inicialmente 15% de THC total nos 160mg de *Cannabis sativa* L. pesados (24mg de THC total pré-pirólise) e que se obteve um rendimento de 50% na queima (12mg de THC total pós-pirólise).

3.3 – Cultura celular:

Como referido anteriormente, as células usadas no presente estudo foram neuroblastomas da linha celular SH-SY5Y. Estas células são comumente utilizadas em estudos de citotoxicidade a nível neuronal uma vez que possuem as propriedades bioquímicas e funcionais dos neurónios (Janefjord, Mååg, Harvey & Smid, 2014). Além disso, a presença do recetor canabinoide CB₁ nos neuroblastomas, faz com que estas células sejam de especial interesse no âmbito deste estudo (Börner, Martella, Höllt & Kraus, 2012). Como podemos verificar pelos resultados obtidos no controlo positivo e negativo (figura 11) as células utilizadas para este estudo estavam a funcionar corretamente.

3.4 – Estudo de viabilidade celular com MTT:

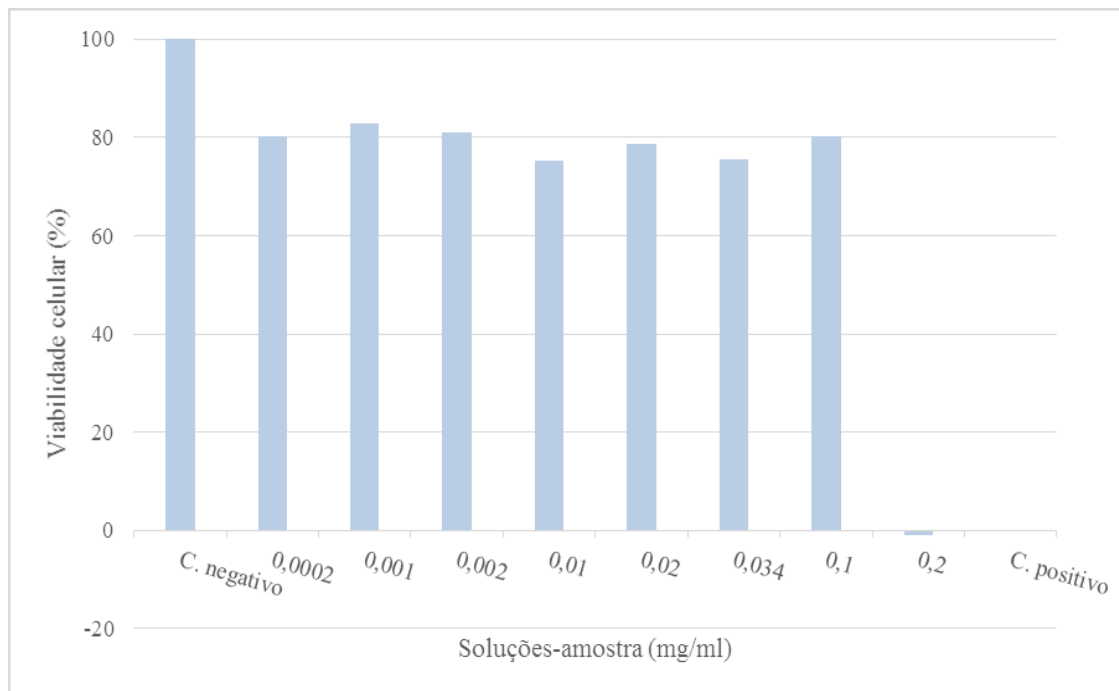


Figura 14. Gráfico da viabilidade celular (média das percentagens de MTT reduzido em dois ensaios independentes com seis replicados internos) para cada uma das soluções-amostra.

Na figura 14 encontram-se os resultados dos ensaios realizados em neuroblastomas linha celular SH-SY5Y na ausência e na presença dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L.. Como podemos verificar da leitura do gráfico obtido (figura 14), das oito concentrações estudadas, os poços submetidos às primeiras sete apresentaram uma viabili-

dade celular estimada perto de 80%, ou seja, houve cerca de 20% de morte celular. Os poços com a oitava e última concentração, a mais alta (0,2mg/mL), revelaram resultados próximos de 0%, inclusive abaixo, que evidencia o erro instrumental associado ao espectrofotómetro utilizado na leitura das microplacas. No entanto, para efeitos práticos, verificou-se 100% de morte celular nesses poços.

Os valores lidos nos poços com as sete concentrações mais baixas estudadas (0,0002mg/mL, 0,001mg/mL, 0,02mg/mL, 0,034mg/mL e 0,1mg/mL) sugerem que a morte celular não foi induzida pelos compostos lipossolúveis extraídos da queima da canábida, uma vez que o aumento das concentrações das soluções-amostra, contendo os canabinóides, não resultou em nenhum aumento significativo dos valores de morte celular calculados para estes poços, até se atingir a concentração máxima estudada onde se verificou 100% de morte celular. Este resultado sugere que a morte celular que ocorreu nos poços com as concentrações mais baixas de canabinóides (cerca de 20%), deveu-se aos produtos da pirólise que ficaram retidos na solução aquosa, ou seja, os compostos hidrossolúveis do fumo de *Cannabis sativa L.*

Como referido anteriormente, quando submetidas à solução-amostra de maior concentração (0,2mg/mL), todas as células morreram. Os resultados sugerem que a dose de produtos lipossolúveis provenientes do fumo da marijuana (entre eles, os canabinóides identificados na amostra), capaz de provocar morte celular está entre os 0,1mg/mL e os 0,2mg/mL.

4. Conclusão

O trabalho de investigação aqui apresentado, insere-se numa estratégia para determinar o impacto toxicológico de substâncias de abuso, que são normalmente queimadas e o seu fumo é inalado pelos consumidores. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o estudo do impacto dos produtos de pirólise da *Cannabis sativa* L. na viabilidade celular de neuroblastomas da linha celular SH-SY5Y, em condições semelhantes às do seu consumo na rua. Estas células do sistema nervoso central têm o recetor CB1, sendo por isso ideais para o estudo dos canabinóides. A análise dos resultados obtidos aponta para os produtos hidrófilos da pirólise de *Cannabis sativa* L., como sendo os responsáveis por cerca de 20% da morte celular verificada. Por outro lado, os produtos lipossolúveis da pirólise, onde se inclui o THC e os restantes canabinóides, só começam a induzir morte celular a concentrações superiores a 0,1 mg/mL. Mais ensaios de desenho igual, utilizando soluções-amostra com os produtos lipossolúveis da pirólise de *Cannabis sativa* L., a concentrações entre 0,1mg/mL e 0,2mg/mL, poderão ajudar a definir melhor o impacto toxicológico destes compostos na viabilidade celular. Estes não foram efetuados dado o tempo disponível para a realização deste estudo experimental. Contudo, sendo este trabalho a primeira abordagem ao problema, pretendeu-se percorrer uma ampla gama de concentrações, ficando a afinação destas para estudos posteriores.

Outro contributo deste estudo, foi o de caracterizar as substâncias lipossolúveis provenientes da pirólise de *Cannabis sativa* L. através de GC-MS. A análise realizada permitiu identificar o Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e o canabinol (CBN), como sendo os compostos mais abundantes no fumo da marijuana. No futuro, será fundamental realizar uma análise que identifique os produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L., retidos na solução aquosa (hidrossolúveis) bem como o estudo do impacto destes na viabilidade celular, de modo a averiguar se este impacto é dose-dependente.

5. Bibliografia

Adams, I. & Martin, B. (1996). Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, 91(11), 1585-1614.

Ashton, C. H. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *The British Journal of Psychiatry*, 178(2), 101-106.

Athanasίου, A., Clarke, A. B., Turner, A. E., Kumaran, N. M., Vakilpour, S., Smith, P. A., ... Bates, T. E. (2007). Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(1), 131-137.

Atwood, B. and Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 467-479.

Barnett, G., Chiang, C., Perez-Reyes, M. & Owens, S. (1982). Kinetic study of smoking marijuana. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 10(5), 495-506.

Barnett, G., Licko, V. & Thompson, T. (1985). Behavioral pharmacokinetics of marijuana. *Psychopharmacology*, 85(1), 51-56.

Behnke, M. & Eyler, F. (1993). The consequences of prenatal substance use for the developing fetus, newborn, and young child. *Substance Use & Misuse*, 28(13), 1341-1391.

Berryman, S., Anderson Jr, R., Weis, J. & Bartke, A. (1992). Evaluation of the comutagenicity of ethanol and delta-9-tetrahydrocannabinol with trenimon. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 278(1), 47-60.

Berthiller, J., Lee, Y., Boffetta, P., Wei, Q., Sturgis, E., Greenland, ... Muscat, J. (2009). Marijuana smoking and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(5), 1544-1551.

Blevins, R. D., Regan, J. D. (1976). Δ^9 -tetrahydrocannabinol: effect on macromolecular synthesis in human and other mammalian cells. *Archives of Toxicology*, 34, 127-135.

Börner, C., Martella, E., Höllt, V. & Kraus, J. (2012). Regulation of Opioid and Cannabinoid Receptor Genes in Human Neuroblastoma and T Cells by the Epigenetic Modifi-

ers Trichostatin A and 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Neuroimmunomodulation*, 19(3), 180-186.

Braude, M. & Ludford, J. (1984). Marijuana effects on the endocrine and reproductive systems. *Public Health Service of Alcohol, Drug Abuse and Mental Health Administration, National Institute on Drug Abuse*.

Calabria, B., Degenhardt, L., Hall, W. & Lynskey, M. (2010). Does cannabis use increase the risk of death? Systematic review of epidemiological evidence on adverse effects of cannabis use. *Drug and Alcohol Review*, 29(3), 318-330.

Cascini, F., Aiello, C. & Di Tanna, G. (2012). Increasing delta-9-tetrahydrocannabinol (delta9-THC) content in herbal cannabis over time: systematic review and meta-analysis. *Current Drug Abuse Reviews*, 5(1), 32-40.

Cesamet.com, (2014). Cesamet (nabilone): CINV Treatment. [online] Disponível em: <http://www.cesamet.com/patient-about-cesamet.asp> [Consultado a 5 de setembro, 2014].

Chacko, J., Heiner, J., Siu, W., Macy, M. & Terris, M. (2006). Association between marijuana use and transitional cell carcinoma. *Urology*, 67(1), 100-104.

Chakravarti, B., Ravi, J. & Ganju, R. K. (2014). Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget*, 5(15), 5852-5871.

Chiesara, E., Cutrufello, R. & Rizzi, R. (1983). Chromosome damage in heroin-marijuana and marijuana addicts. Springer, 128-130.

Commons.wikimedia.org, (2009). File:Nabilone.svg - Wikimedia Commons. [online] Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nabilone.svg> [Consultado a 5 de setembro, 2014].

Commons.wikimedia.org, (2010). File:Dronabinol.svg - Wikimedia Commons. [online] Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dronabinol.svg> [Consultado a 3 de setembro, 2014].

Cook E. (1986). Analytical methodology for delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites. *Advances on. Alcoholism and Substance Abuse*. 2, 79-85.

Demers, C., Bogdan, R. & Agrawal, A. (2014). The genetics, neurogenetics and pharmacogenetics of addiction. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, 1(1), 33-44.

Earleywine, M. (2005). *Entender la marihuana*. 1ª edição. Barcelona, Espanha: Masson. pp. 1-28.

Erowid.org, (2014). Erowid Cannabis Vault : Legal Status. [online] Disponível em: http://www.erowid.org/plants/cannabis/cannabis_law.shtml#belgium [Consultado a 3 de outubro, 2014].

Fergusson, D., Poulton, R., Smith, P. & Boden, J. (2006). Cannabis and psychosis. *BMJ*, 332(7534), 172-175.

Fischer, A., Whitfield-Gabrieli, S., Roth, R., Brunette, M. & Green, A. (2014). Impaired functional connectivity of brain reward circuitry in patients with schizophrenia and cannabis use disorder: effects of cannabis and THC. *Schizophrenia Research*, 158(1), 76-182.

Fox, M. (2014). Marijuana May Ease Some Symptoms of MS, New Guidelines Find - NBC News. [online] NBC News. Disponível em: <http://www.nbcnews.com/health/health-news/marijuana-may-ease-some-symptoms-ms-new-guidelines-find-n60626> [Consultado a 1 de setembro, 2014].

Freeman, D., Dunn, G., Murray, R., Evans, N., Lister, R., Antley, ... Williams, J. (2014). How cannabis causes paranoia: using the intravenous administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) to identify key cognitive mechanisms leading to paranoia. *Schizophrenia Bulletin*, 98, 1-9.

Fusar-Poli, P., Crippa, J., Bhattacharyya, S., Borgwardt, S., Allen, P., Martin-Santos, ... Atakan, Z. (2009). Distinct effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Archives of General Psychiatry*, 66(1), 95-105.

Gable, R. (2004). Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. *Addiction*, 99(6), 686-696.

Ginsburg, B., Hrubá, L., Zaki, A., Javors, M. & McMahon, L. (2014). Blood levels do not predict behavioral or physiological effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys with different patterns of exposure. *Drug and Alcohol Dependence*, 139, 1-8.

- Gjerde, H. (1991). Screening for cannabinoids in blood using EMIT: Concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in relation to EMIT results. *Forensic Science International*, 50(1), 121-124.
- Grant, I., Gonzalez, R., Carey, C., Natarajan, L. & Wolfson, T. (2003). Non-acute (residual) neurocognitive effects of cannabis use: a meta-analytic study. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 9(5), 679-689.
- Hall, W. (2014). What has research over the past two decades revealed about the adverse health effects of recreational cannabis use? *Addiction*, (agosto, 2014), 1-17.
- Hashibe, M., Straif, K., Tashkin, D., Morgenstern, H., Greenland, S. & Zhang, Z. (2005). Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol*, 35(3), 265-275.
- Hasin, D. S., Keyes, K. M., Alderson, D., Wang, S., Aharonovich, E. & Grant, B. F. (2005). Cannabis withdrawal in the United States: results from NESARC. *J Clin Psychiatry*, 69 (9), 1354-1363.
- Hembree III, W., Nahas, G., Zeidenberg, P. & Huang, H. (1999). Changes in human spermatozoa associated with high-dose marijuana smoking. *Springer*, 367-378.
- Hermanns-Clausen, M., Kneisel, S., Szabo, B. & Auwarter, V. (2013). Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Addiction*, 108(3), 534-544.
- Heuberger, J., Guan, Z., Oyetayo, O., Klumpers, L., Morrison, P., Beumer, T., ... Freijer, J. (2014). Population pharmacokinetic model of THC integrates oral, intravenous, and pulmonary dosing and characterizes short-and long-term pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, (outubro, 2014), 1-11.
- Howard, P., Twycross, R., Shuster, J., Mihalyo, M. & Wilcock, A. (2013). Cannabinoids. *Journal of Pain and Symptom Management*, 46(1), 245-259.
- Huestis, M., Sampson, A., Holicky, B., Henningfield, J. & Cone, E. (1992). Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 52 (1), 31-41.
- Jamaica-gleaner.com, (2014). Lawmakers give nod to decriminalisation of ganja - Lead Stories - Jamaica Gleaner - Wednesday | October 9, 2013. [online] Disponível em:

<http://jamaica-gleaner.com/gleaner/20131009/lead/lead7.htmL> [Consultado a 4 de outubro, 2014].

Janefjord, E., Mååg, J., Harvey, B. & Smid, S. (2014). Cannabinoid effects on beta-amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(1), 31-42.

Jones, R. (2002). Cardiovascular system effects of marijuana. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(S1), 58-63.

Kaiser, E., Westbrook, C. & Pitz, W. (2006). Mutagenicity, developmental toxicity and carcinogenicity of cannabis. *Addiction Biology*, 20(5), 5-12.

King, D., Martel, P. & O'Donnell, C. (1987). Laboratory detection of cannabinoids. *Clinics in Laboratory Medicine*, 7(3), 641-653.

Kollins, S., Schoenfelder, E., English, J., Holdaway, A., Van Voorhees, E., O'Brien, B., ... Chrisman, A. (2014). An exploratory study of the combined effects of orally administered methylphenidate and delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on cardiovascular function, subjective effects, and performance in healthy adults. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 14(6), 25-40.

Kolodny, R., Masters, W., Kolodner, R. & Toro, G. (1974). Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *New England Journal of Medicine*, 290(16), 872-874.

Leaf Science, (2014). Marinol (dronabinol) - Leaf Science. [online] Disponível em: <http://www.leafscience.com/pharmaceuticals/marinol/> [Consultado a 4 de setembro, 2014].

Legislação de Combate à Droga, decreto-lei n.º 15/93 de 22 de janeiro (1993) (na sua versão atualizada, tendo sido a sua última alteração feita pela lei nº 22/2014, de 28 de abril).

Lyketsos, C., Garrett, E., Liang, K. & Anthony, J. (1999). Cannabis use and cognitive decline in persons under 65 years of age. *American Journal of Epidemiology*, 149(9), 794-800.

Lynskey, M., Glowinski, A., Todorov, A., Bucholz, K., Madden, P., Nelson, E., ... Heath, A. (2004). Major depressive disorder, suicidal ideation, and suicide attempt in twins

discordant for cannabis dependence and early-onset cannabis use. *Arch Gen Psychiatry*, 61(10).

Mack, A. & Joy, J. (2001). *Marijuana as medicine?* Washington D.C., E.U.A.: National Academy Press.

Marshall, N., Goodwin, C. & Holt, S. (1995). A critical assessment of the use of micro-culture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation*, 5(2), 69-84.

Martin, B. R. & Dewey, W. L. (2000). Marijuana. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress* (pp. 1519-1529). Nova Iorque, E.U.A.: Lippincott Williams & Wilkins.

Martin, P., Hodge, W., Royal, M. & Jones, B. (1987). Behavioral effects of THC as a function of environment and prior drug experience. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 26(1), 141-144.

Mechoulam, R. & Burstein, S. (1973). Marijuana; chemistry, pharmacology, metabolism and clinical effects. *New York: Academic Press*, 25(2).

Miller, J. N. & J. C. Miller (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Harlow, Inglaterra: Prentice Hall.

Moore, T., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T., Jones, P., Burke, M. & Lewis, G. (2007). Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *The Lancet*, 370(9584), 319-328.

Ncpic.org.au, (2014). Cannabis and the law • Factsheets • NCPIC. [online] Disponível em: <https://ncpic.org.au/ncpic/publications/factsheets/article/cannabis-and-the-law/> [Consultado a 4 de outubro, 2014].

Notcutt, W., Price, M., Miller, R., Newport, S., Phillips, C., Simmons, S. & Sansom, C. (2004). Initial experiences with medicinal extracts of cannabis for chronic pain: results from 34 'N of 1' studies. *Anaesthesia*, 59(5), 440-452.

Ramaekers, J., Berghaus, G., van Laar, M. & Drummer, O. (2004). Dose related risk of motor vehicle crashes after cannabis use. *Drug and Alcohol Dependence*, 73(2), 109-119.

- Rathbone, J., Variend, H. & Mehta, H. (2008). Cannabis and schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev*, 3.
- Reuters, (2014). Uruguay becomes first country to legalize marijuana trade. [online] Disponível em: <http://www.reuters.com/article/2013/12/11/us-uruguay-marijuana-vote-idUSBRE9BA01520131211> [Consultado a 3 de outubro, 2014].
- Reveley, M., Deakin, J., Press, M., Press, K., Derksen, C., Groen, ... Basic, C. (2000). The science of marijuana. *Annals of Clinical Psychiatry*, 12(4), 221-239.
- Rfidroundup.blogspot.pt, (2013). RFID News: December 2013. [online] Disponível em: http://rfidroundup.blogspot.pt/2013_12_01_archive.html [Consultado a 1 de setembro, 2014].
- Russo, E. & Guy, G. (2006). A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, 66(2), 234-246.
- Sca-centremedic.com, (2014). Tratamiento y desintoxicacion del cannabis. [online] Disponível em: <http://www.sca-centremedic.com/cast/cannabis.html> [Consultado a 1 de outubro, 2014].
- Solowij, N. & Pesa, N. (2012). Cannabis and cognition: short and long-term effects. *Marijuana and Madness*, 12(2), 91-102.
- Solowij, N., Broyd, S., van Hell, H. & Hazekamp, A. (2014). A protocol for the delivery of cannabidiol (CBD) and combined CBD and [increment] Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) by vaporisation. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15(1), 57-58.
- Solowij, N., Stephens, R., Roffman, R., Babor, T., Kadden, R., Miller, ... Vendetti, J. (2002). Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *Jama*, 287(9), 1123-1131.
- Spiga, S., Lintas, A. & Diana, M. (2011). Altered mesolimbic dopamine system in THC dependence. *Current Neuropharmacology*, 9(1), 194-200.
- Sullivan, S. (2010). Cannabinoid hyperemesis. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 24(5), 284.

Tahir, S. K., Zimmerman, A. M. (1992). Cytoskeletal organization following cannabinoid treatment in undifferentiated and differentiated PC12 cells. *Biochemistry Cell Biology*, 70, 1159-1173.

Tetrault, J., Crothers, K., Moore, B., Mehra, R., Concato, J. & Fiellin, D. (2007). Effects of marijuana smoking on pulmonary function and respiratory complications: a systematic review. *Archives of Internal Medicine*, 167(3), 221-228.

The Economist, (2013). The experiment. [online] Disponível em: <http://www.economist.com/news/americas/21582579-another-blow-against-prohibition-experiment> [Consultado a 2 de outubro, 2014].

The Economist, (2014). A half-smoked joint. [online] Disponível em: <http://www.economist.com/news/leaders/21605908-decriminalising-drugs-leaves-crooks-cash-legalise-drugs-instead-half-smoked-joint> [Consultado a 4 de outubro, 2014].

Thomson, W., Poulton, R., Broadbent, J., Moffitt, T., Caspi, A., Beck, ... Hancox, R. (2008). Cannabis smoking and periodontal disease among young adults. *Jama*, 299(5), 525-531.

United Nations Office on Drugs and Crime (2009). *Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products*. Nova Iorque, E.U.A.: United Nations.

United Nations Office on Drugs and Crime (2014). *World Drug Report*. Viena, Áustria: United Nations.

Wade, D., Robson, P., House, H., Makela, P. & Aram, J. (2003). A preliminary controlled study to determine whether W.H.O.le-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clinical Rehabilitation*, 17(1), 21-29.

Watson, S., Benson, J. & Joy, J. (2000). Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Archives of General Psychiatry*, 57(6), 547-552.

Wehner, F., Van Rensburg, S. & Thiel, P. (1980). Mutagenicity of marijuana and trans-kei tobacco smoke condensates in the salmonella/microsome assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 77(2), 135-142.

Workers Compensation Board of Nova Scotia. (2012). *Clinical Efficacy of Medical Marijuana: Summary of Evidence-Based Research*. Nova Scotia, Canadá: WCBNS.

World Health Organization, Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse (1997) *Cannabis: A Health Perspective and Research Agenda*. Genebra, Suíça: World Health Organization.

Wu, Y., Li, K., Zuo, H., Yuan, Y., Sun, Y. and Yang, X. (2014). Primary neuronal-astrocytic co-culture platform for neurotoxicity assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Journal of Environmental Sciences*, 26(5), 1145-1153.

Yazulla, S. (2008). Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(5), 501-526.

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), 1-20.

Yücel, M., Solowij, N., Respondek, C., Whittle, S., Fornito, A., Pantelis, C. & Lubman, D. (2008). Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use. *Archives of General Psychiatry*, 65(6), 694-701.

Zhang, Y., Yuan, Z., Song, D., Zhou, X. & Wang, Y. (2014). Effects of cannabinoid receptor 1 (brain) on lipid accumulation by transcriptional control of CPT1A and CPT1B. *Animal Genetics*, 45(1), 38-47.

Zimmerman, A. M., Padilla, G. M. & Cameron I. L. (1973). Action of narcotic and hallucinogenic agents on the cell cycle. Em Zimmerman, A. M., Padilla, G. M. & Cameron I. L. (Eds.), *Drugs and the Cell Cycle* (pp. 67). Nova Iorque, E.U.A.: Academic Press.

Zimmerman, A., Stich, H. & San, R. (1978). Nonmutagenic action of cannabinoids in vitro. *Pharmacology*, 16(6), 333-343.

Zimmerman, S. & Zimmerman, A. (1990). Genetic effects of marijuana. *Substance Use & Misuse*, 25(S1), 9-33.

Zimmerman, S. (1991). Genetic effects of marijuana. *International Journal of Addictions*, 25, 19-33.

6. Anexos

Anexo 1

GC-MS (EI+)

File : D:\RITAS\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
 Operator : jpn
 Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: 2014 10 14 Erva pirolise
 Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
 Vial Number: 1

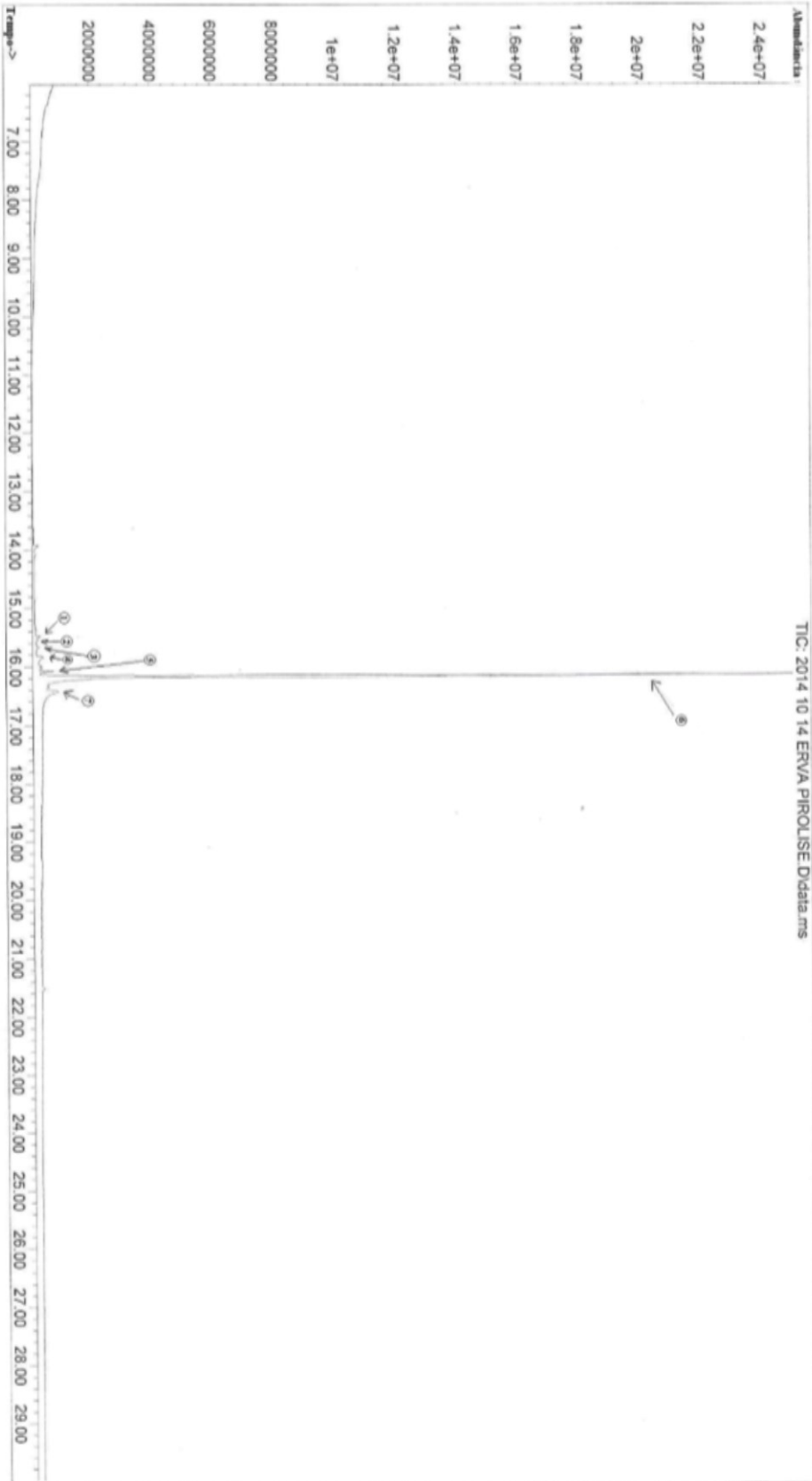


Gráfico 1

Cromatograma obtido para a amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cordia alliodora* L por GC-MS (EI+), evidenciando os sete picos principais que representam, respectivamente: o (1) 3'-acetilbaccatinina, o (2) canbicromano, o (3) 3'-THC sililado, o (4) canbicronol, o (5) 3'-acetilbaccatinol (3'-THC), o (6) 3'-acetilbaccatinol (3'-THC) e o (7) canbicronol (CBN).

File : D:\RITAS\BSB\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
 Operator : [BSB]jpn
 Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: 2014 10 14 Erva pirolise
 Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
 Vial Number: 1

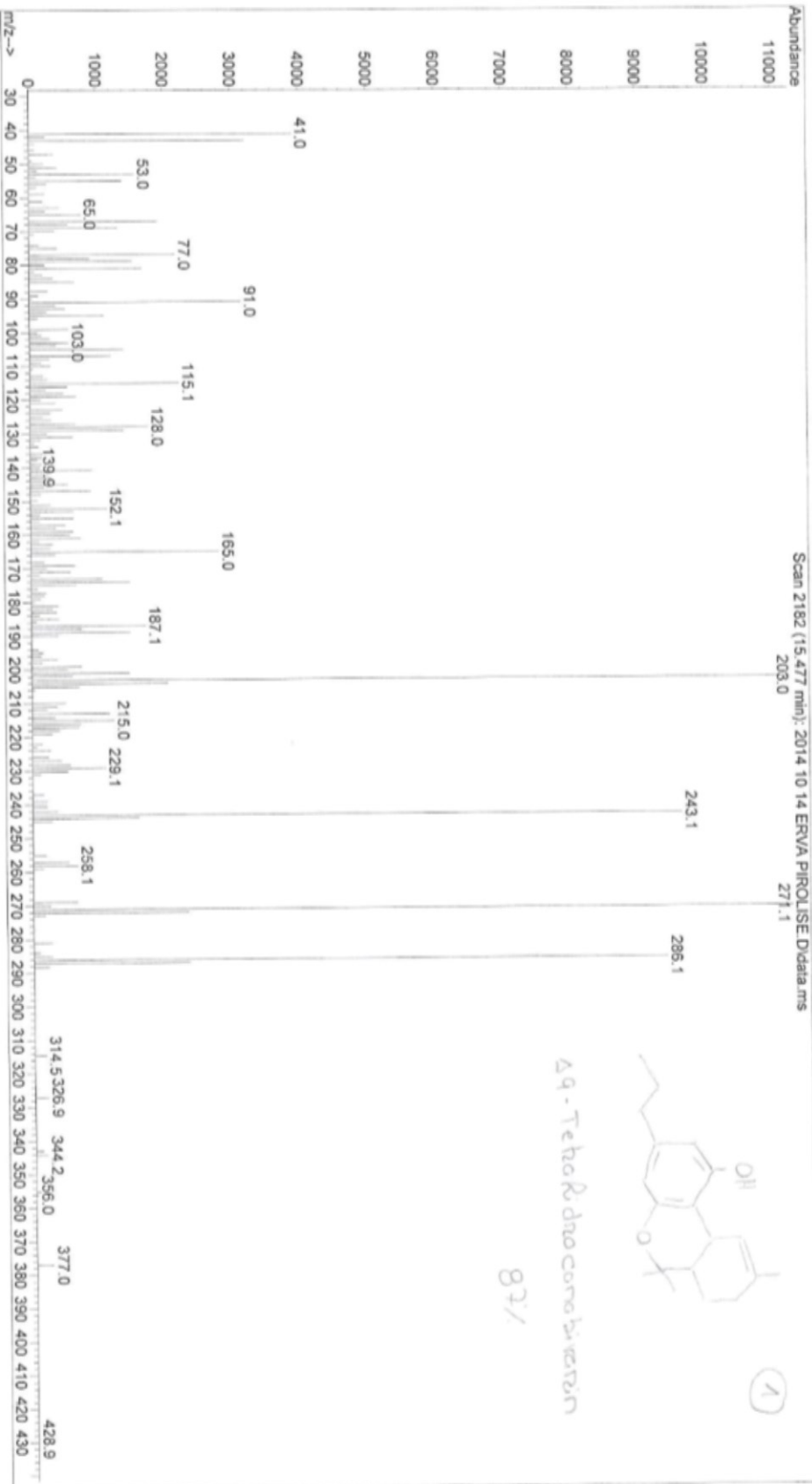
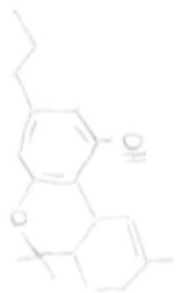


Gráfico 2

Espectro de massa, obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 1
 (anexo 1 - gráfico 1), o Δ⁹-tetra-hidrocanabinol.



Δ⁹-Tetra Hidro canabinol

82/

File : D:\RITAS\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
 Operator : jpn
 Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: 2014 10 14 Erva pirolise
 Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
 Vial Number: 1

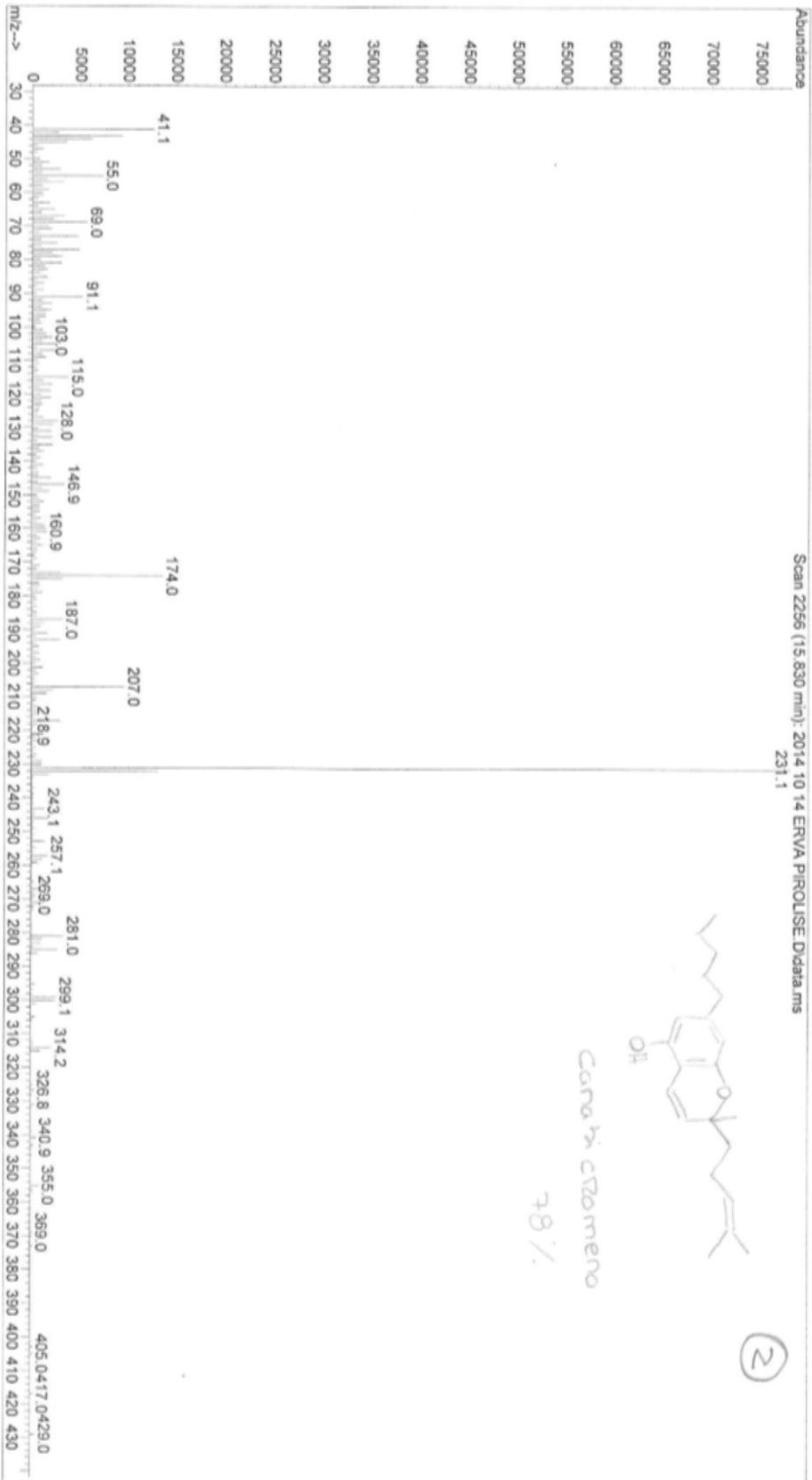


Gráfico 3

Espectro de massa, obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 2 (anexo 1 - gráfico 1), o carabolinoneo

File :D:\RITAS\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
 Operator : jpn
 Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: 2014 10 14 Erva pirolise
 Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
 Vial Number: 1

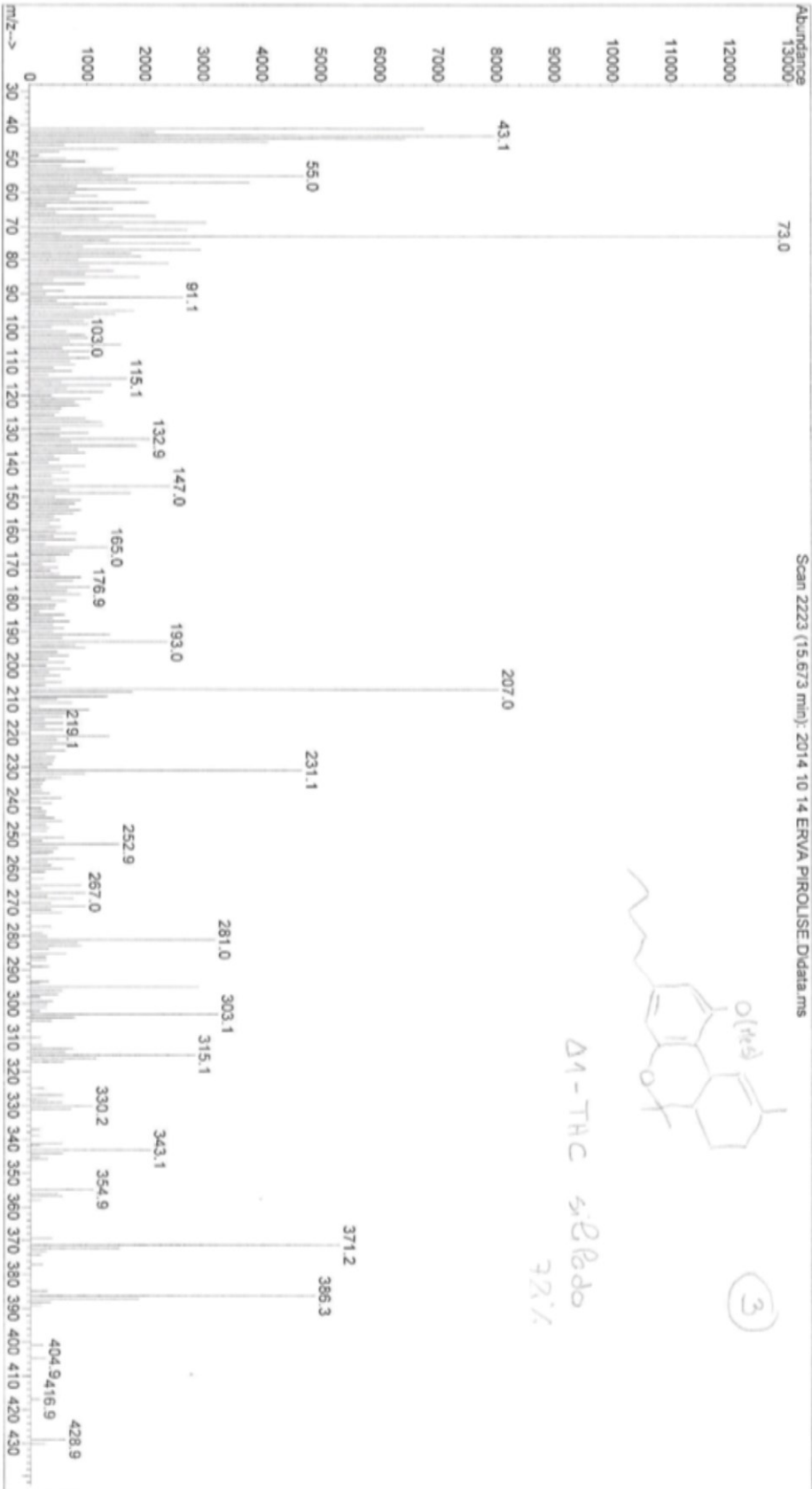


Gráfico 4
 Espectro de massa obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 3 (arquivo 1), o Δ⁹-tetraidrocannabinol síbilado.

File : D:\RITAS\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
 Operator : jpn
 Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name : 2014 10 14 Erva pirolise
 Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
 Vial Number: 1

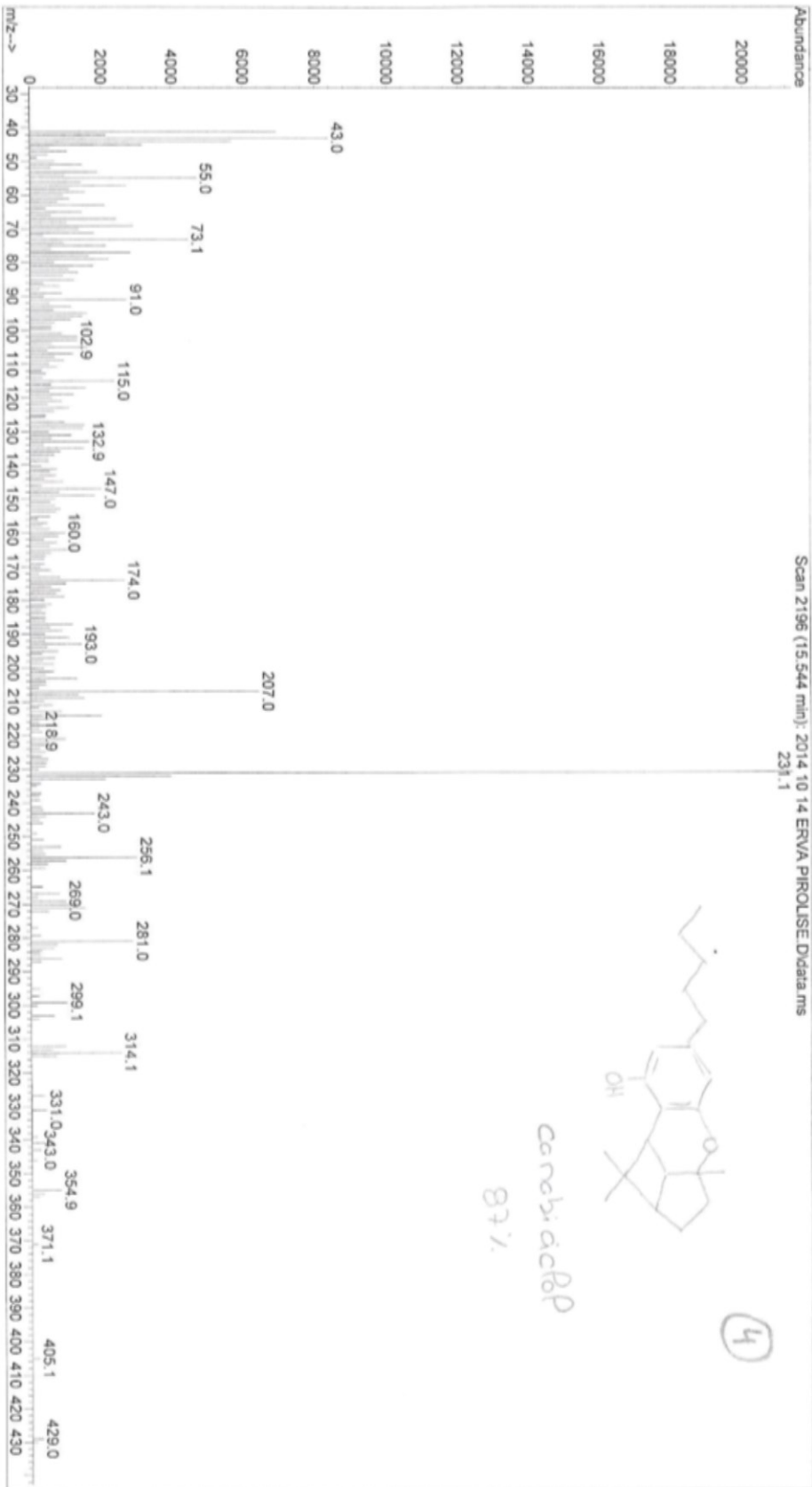


Gráfico 5

Espectro de massa, obtido por GC-MS (EI⁺), do composto presente no pico 4
 (sero 1 - gráfico 1), e candidato.

File : D:\RITAS\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
 Operator : jpn
 Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: 2014 10 14 Erva pirolise
 Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
 Vial Number: 1

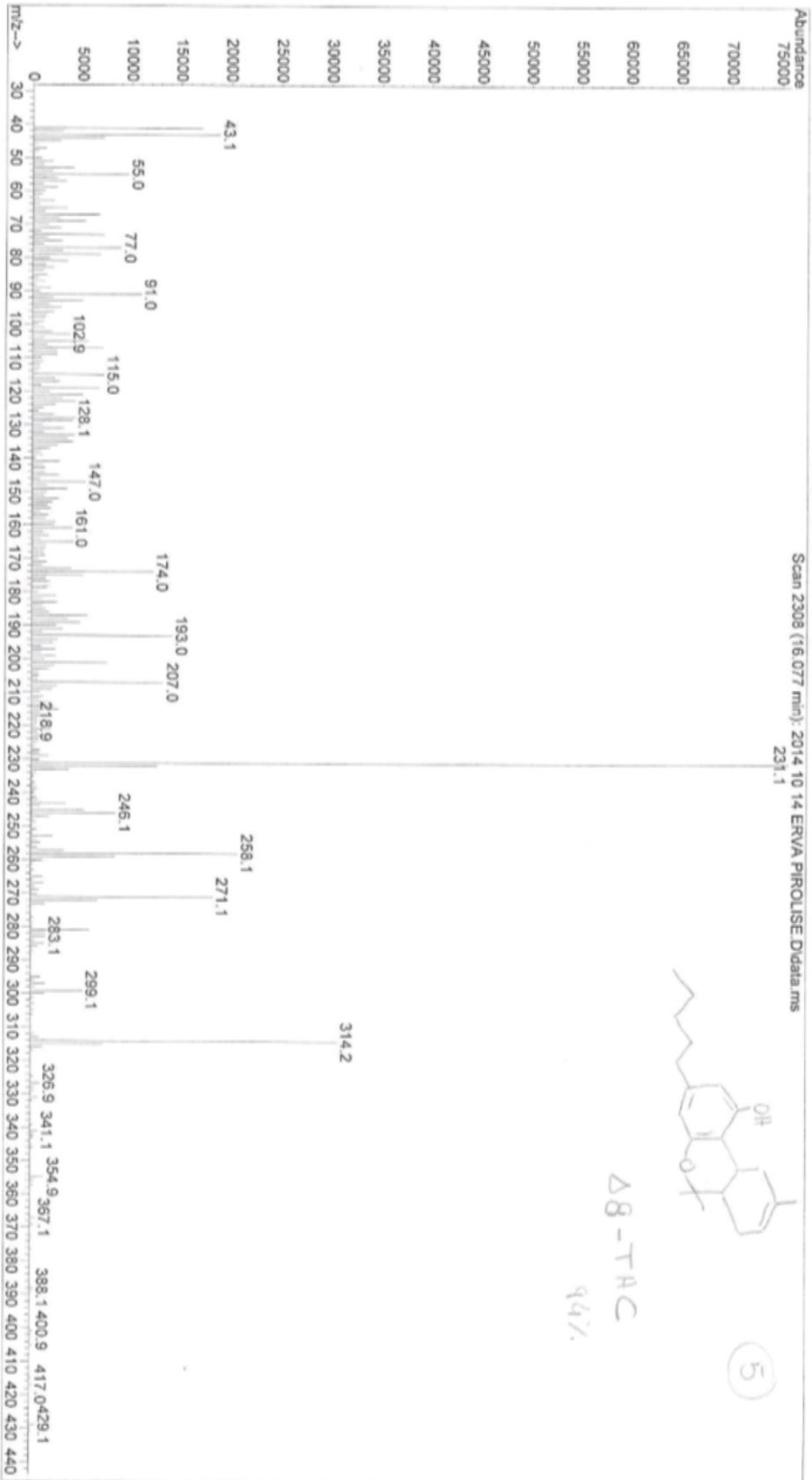


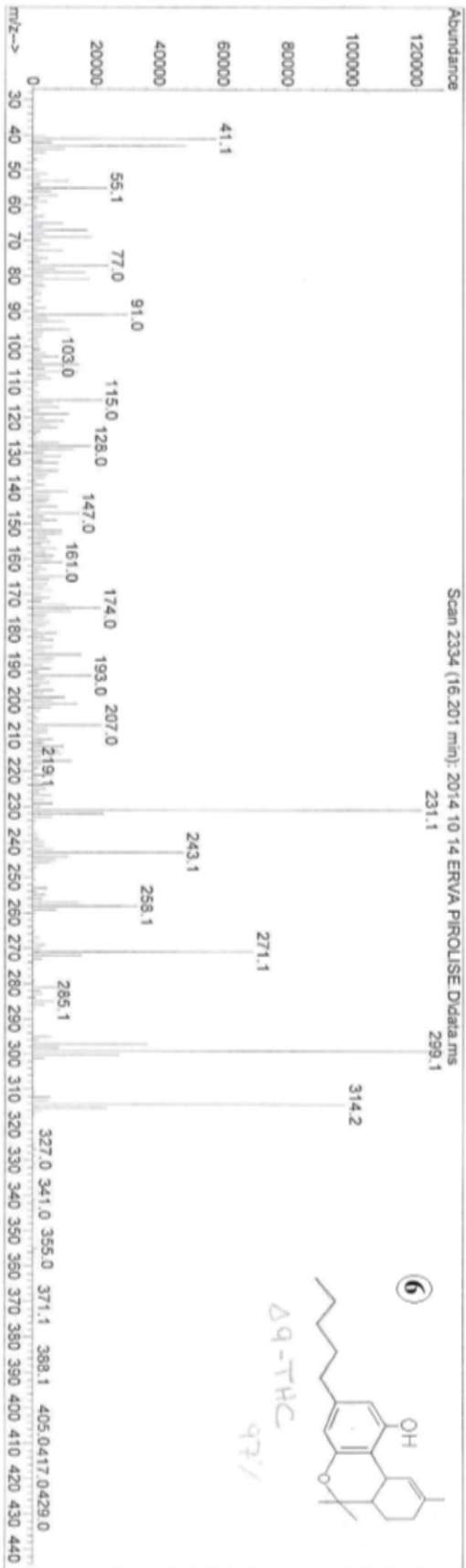
Gráfico 6

Espectro de massa, obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 5 (numero 1 - gráfico 1), o Δ^8 -tetrahidrocannabinol.

Operator : jpn
Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
Instrument : GCMSD
Sample Name : 2014 10 14 Erva pirolise
Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
Vial Number: 1

Gráfico 7

Espectro de massa obtido por GC-MS (EI+) do composto presente no pico 6
(anexo 1 - gráfico 1), o Δ⁹-tetraidrocanabinol.



File : D:\RITAS\2014 10 14 ERVA PIROLISE.D
Operator : jpn
Acquired : 14 Oct 2014 19:04 using AcqMethod DRUGS30.M
Instrument : GCMSD
Sample Name: 2014 10 14 Erva pirolise
Misc Info : 2014 10 14 Erva pirolise
Vial Number: 1

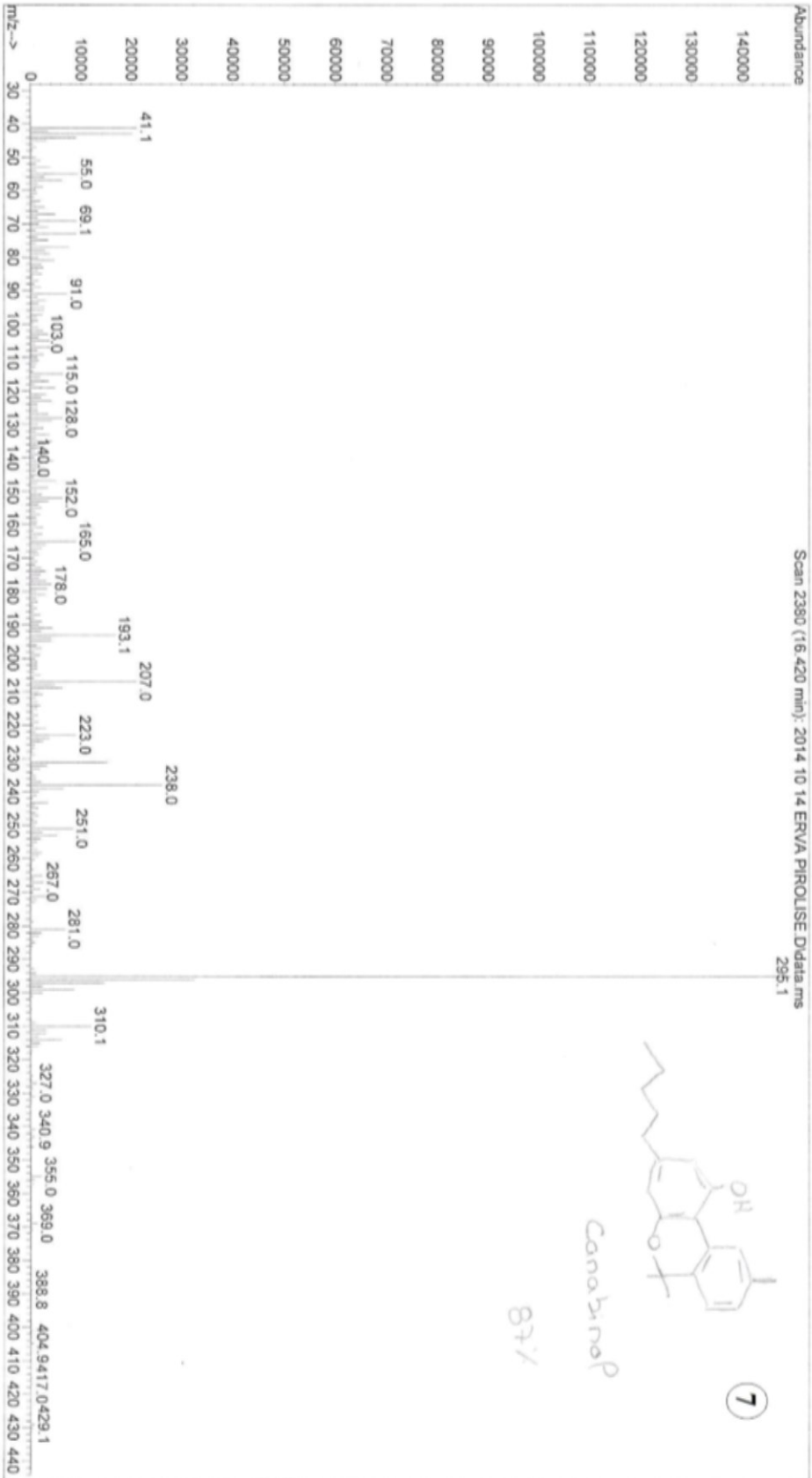


Gráfico 8

Espectro de massa, obtido por GC-MS (EI+), do composto presente no pico 7 (amostra 1 - gráfico 1), o canabinoide.

Anexo 2

HPLC-UV

Gráfico 1

Cromatograma, obtido por HPLC-UV, da primeira corrida da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Camabis sativa* L.. (A) THC total (THC+THCA).

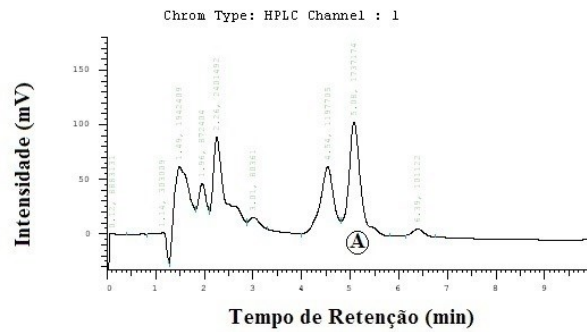


Gráfico 2

Cromatograma, obtido por HPLC-UV, da segunda corrida da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L.. (A) THC total (THC+THCA).

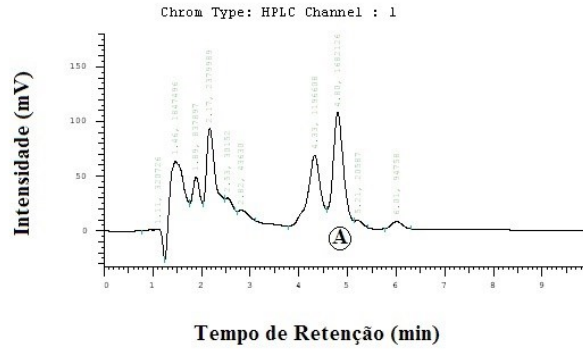


Gráfico 3

Cromatograma, obtido por HPLC-UV, da terceira corrida da amostra da extração metanólica dos produtos da pirólise de *Cannabis sativa* L.. (A)
THC total (THC+THCA).

