

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Juliana dos Santos Carmo

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS FLORES E DOS
EXTRATOS MEDICINAIS DE *CANNABIS SATIVA***

Rio de Janeiro

2019

Juliana dos Santos Carmo

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS FLORES E DOS
EXTRATOS MEDICINAIS DE *CANNABIS SATIVA***

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Dr^a Joana Angélica Barbosa Ferreira
Preceptora: Dr^a Eliana Rodrigues Machado

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Carmo, Juliana dos Santos

Avaliação da qualidade microbiológica das flores e dos extratos medicinais de *Cannabis sativa*. / Juliana dos Santos Carmo. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

46f. : il. ; fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Tutora: Dr^a Joana Angélica Barbosa Ferreira.

Preceptora: Dr^a Eliana Rodrigues Machado.

1. Cannabis. 2. Extrato medicinal. 3. Controle de qualidade. 4. Análise Microbiológica. I. Título.

Evaluation of the microbiological quality of flowers and medicinal extracts of *Cannabis sativa*.

Juliana dos Santos Carmo

**Avaliação da qualidade microbiológica das flores e dos extratos medicinais de
*Cannabis sativa***

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Luiz Lima Brandão (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Kayo Cesar Bianco Fernandes (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Virgínia Martins Carvalho (Doutora)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Joana Angélica Barbosa Ferreira (Doutora) - Tutora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho ao Setor de Produtos Não Estéreis que me recebeu de braços abertos nesse período de trabalho e ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde que me possibilitou participar do programa de Residência Multiprofissional e poder ajudar no desenvolvimento de um trabalho importante para a Vigilância Sanitária e para a Saúde Pública.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe e ao meu padrasto por serem os meus maiores incentivadores.

A minha orientadora Dr^a Joana Angélica Barbosa Ferreira que se empenhou em me ensinar as rotinas laboratoriais e transferiu todo o seu conhecimento na área para me ajudar na execução deste trabalho.

A minha colega de trabalho Priscila por ter estado sempre ao meu lado me ajudando em qualquer situação.

A todos os colaboradores do Setor Não estéreis que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e a Pós-Graduação que me recebeu neste Programa de Residência Multiprofissional e sempre esteve pronta a me auxiliar quando necessário.

Aos professores que contribuíram com a minha formação na área de Vigilância Sanitária.

RESUMO

Cannabis sativa L. é uma espécie herbácea que possui vários princípios ativos, sendo os mais conhecidos o Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD). Efeitos farmacológicos são atribuídos à interação de canabinoides com receptores canabinoides distribuídos no Sistema Nervoso Central (CB1) e Periférico (CB2). No Brasil, pacientes pediátricos com epilepsia refratária estão em tratamento medicamentoso com extrato oleoso de cannabis e apresentam resposta terapêutica satisfatória. Famílias desses pacientes estão produzindo seus próprios extratos de forma artesanal, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), portanto, é necessário realizar o controle de qualidade desses extratos. Considerando isso, este estudo consistiu na avaliação microbiológica de um total de 78 amostras, dentre elas flores de cannabis (n = 6), extratos artesanais (n = 40) e extratos importados (n = 32), disponibilizadas ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) por meio de parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A avaliação microbiológica baseou-se nos limites preconizados pela 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010 e 2º suplemento de 2017) para este tipo de produto. Todas as flores avaliadas apresentaram altas taxas de contaminação microbiana, 40% das amostras de extratos artesanais estavam fora dos limites recomendados pela Farmacopeia Brasileira e apenas 16% dos extratos importados apresentaram-se fora desses limites. Foram encontrados os seguintes micro-organismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter pyrinus*, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Cedecea davisae*, *Cedecea neteri*, *Bacillus* spp., *Aspergillus* spp. e *Candida albicans*. Os resultados mostraram que o controle microbiológico é essencial, uma vez que altas cargas microbianas podem alterar as propriedades físicas e químicas do produto e ainda caracterizar risco de infecção para os usuários. Portanto, espera-se com este estudo subsidiar estratégias de monitoramento desses produtos para minimizar os riscos, a fim de garantir a segurança e a efetividade do produto.

Palavras-chave: Cannabis. Extrato Medicinal. Controle de Qualidade. Análise Microbiológica.

ABSTRACT

Cannabis sativa L. is an herbaceous species that has many active principles, the most known being Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD). Pharmacological effects are attributed to the interaction of cannabinoids with cannabinoid receptors distributed in the Central Nervous System (CB1) and Peripheral (CB2). In Brazil, pediatric patients with refractory epilepsy are in medical treatment with oily cannabis extract and have presented satisfactory therapeutic response. Families of these patients are producing their own extracts in an artisan way, according to the National Agency of Sanitary Surveillance (Anvisa) therefore, it is necessary to carry out the quality control of these extracts. Considering this, this study consisted in the microbiological evaluation of a total of 78 samples, among them cannabis flowers (n = 6), handmade extracts (n = 40) and imported extracts (n = 32), made available to National Institute of Quality Control in Health (INCQS) through a partnership with the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). The microbiological evaluation was based on the limits recommended by the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia (2010 and 2nd supplement of 2017) for this type of product. All evaluated flowers presented high rates of microbial contamination, 40% of the samples of handmade extracts were outside the limits recommended by the Brazilian Pharmacopoeia and only 16% of the imported extracts presented outside these limits. The following microorganisms were found: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter pyrinus*, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Cedecea davisae*, *Cedecea neteri*, *Bacillus* spp., *Aspergillus* spp. and *Candida albicans*. The results showed that the microbiological control is essential, since high microbial charges can alter the physical and chemical properties of the product and still characterize risk of infection for the users. Therefore, it is expected with this study to subsidize strategies of monitoring these products to minimize the risks, in order to guarantee the safety and effectiveness of the product.

Keywords: Cannabis. Medicinal Extract. Quality Control. Microbiological Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Amostras dos extratos oleosos de cannabis produzidos artesanalmente.	12
Figura 2 - Flores da <i>Cannabissativa</i>	12
Figura 3 - Esquema geral da preparação de extratos oleosos artesanais.....	13
Figura 4 - Medicamento Mevatyl® à base de THC e CBD.....	16
Figura 5 - Esquema do ensaio da contagem de micro-organismos.....	23
Figura 6 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de <i>E. coli</i>	26
Figura 7 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de <i>Salmonella</i>	26
Figura 8 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 9 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de <i>S. aureus</i>	28
Quadro 1 - Limites microbianos para produtos não estéreis	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias Gram-negativas bile tolerantes.....	25
Tabela 2 - Análise microbiológica de flores de <i>Cannabis sativa</i>	31
Tabela 3 - Análise microbiológica dos extratos artesanais de cannabis.....	33
Tabela 4 - Análise microbiológica dos extratos importados de cannabis.....	36

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBD	Canabidiol
CFM	Conselho Federal de Medicina
DCB	Denominação Comum Brasileira
DNAse	Desoxirribonuclease
EMB	Eosina Azul de Metileno
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
POP	Procedimento Operacional Padronizado
SNC	Sistema Nervoso Central
THC	Tetrahidrocannabinol
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VM	Vermelho de Metila
VP	VogesProskauer
VRBG	Violeta Vermelho Bile Glicosado
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	111
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVO	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Verificação da capacidade inibitória	200
4.2 Contagem total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras	22
4.2.1 Contagem de colônias.....	233
4.3 Contagem de bactérias gram-negativas bile tolerantes	24
4.4 Pesquisa de patógenos	25
4.4.1 <i>Escherichia coli</i>	25
4.4.2 <i>Salmonella</i>	26
4.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
4.4.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	277
4.4.5 <i>Candida albicans</i>	28
4.4.6 <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	28
4.4.7 Outros micro-organismos	288
4.5 Avaliação da qualidade microbiológica	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Flores de <i>cannabis sativa</i>	30
5.2 Extratos oleosos artesanais de cannabis medicinal	32
5.3 Extratos oleosos importados de cannabis medicinal	355
5.4 Micro-organismos identificados	37
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O uso medicinal de *Cannabis sativa* L. tem sido regulamentado em vários países da Europa, como Portugal, Holanda, Bélgica e Espanha, em alguns estados americanos, como Califórnia, Minnesota e a capital Washington (ROBSON, 2001; ZUARDI *et al.*, 2006; SZAFLARSKI; BEBIN, 2014). Medicamentos à base de extratos de cannabis são produzidos para diferentes indicações terapêuticas como Alzheimer (IUVONE *et al.*, 2004), dor neuropática na esclerose múltipla (ROG *et al.*, 2005) e na artrite reumatoide (BLAKE *et al.*, 2006), esquizofrenia (ZUARDI *et al.*, 2006), Parkinson (ZUARDI *et al.*, 2009) e epilepsia (HUSSAIN *et al.*, 2015), constituindo por vezes a única alternativa terapêutica no controle de doenças graves e incuráveis.

Apesar do canabidiol (CBD) ter sido isolado a partir do extrato de cannabis em 1940 por Adams e colaboradores (1940), foi a partir da década de 1960, após a identificação do Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) pelo grupo do professor Raphael Mechoulam, de Israel (MECHOULAM *et al.*, 1963), que vários trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos mostrando as propriedades farmacológicas de seus compostos (MECHOULAM *et al.*, 1970; MECHOULAM *et al.*, 2007; WHITING *et al.*, 2015).

Os efeitos farmacológicos são atribuídos à interação dos canabinoides com seus receptores distribuídos no Sistema Nervoso Central (CB1) e Periférico (CB2) (LEWEKE & KOETHE, 2008). O CBD apresenta efeitos farmacológicos paradoxais em relação aos efeitos do Δ^9 -THC, enquanto o Δ^9 -THC se relaciona aos estados de euforia, ansiedade e psicóticos, o CBD tem mostrado efeitos depressores no Sistema Nervoso Central (SNC) com ação antipsicótica e ansiolítica (MECHOULAM *et al.*, 2007).

O sistema endocanabinoide consiste em receptores de canabinoides, canabinoides endógenos e várias enzimas que controlam a ativação e a disponibilidade destes endocanabinoides (SAITO *et al.*, 2010). O Δ^9 -THC se liga aos receptores CB1 e CB2 agindo como um agonista parcial, exercendo uma atividade neural mista, excitatória e inibitória, em diferentes áreas do cérebro, mostrando não atuar somente em receptores canabinoides específicos (PERTWEE, 2008). Ao contrário do Δ^9 -THC, o CBD apresenta baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2, sua ação parece resultar de mediação na sinalização dos endocanabinoides através

da hidrólise enzimática ou inibição da recaptção da anandamida, o neurotransmissor canabinoide endógeno (MECHOULAM *et al.*, 2002). Além disso, o CBD parece ser capaz de funcionar como um agonista dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT1A promovendo efeito ansiolítico (CAMPOS; GUIMARÃES, 2008; FOGAÇA *et al.*, 2014; MARINHO *et al.*, 2015).

No Brasil, a cannabis medicinal tem sido muito utilizada para dores crônicas e enfermidades neurológicas, mas o uso terapêutico de maior prevalência é no controle de crises convulsivas em portadores de epilepsias refratárias (CARVALHO, 2017), neste caso o uso da planta se dá na forma de extrato oleoso (Figura 1) com teores de CBD maiores que THC, produzido a partir das flores da cannabis (Figura 2) como mostra o esquema apresentado na Figura 3. Os efeitos farmacológicos dependem da dose e da interação entre THC e CBD que podem se apresentar em diferentes proporções nos extratos.

Figura 1 - Amostras dos extratos oleosos de cannabis produzidos artesanalmente



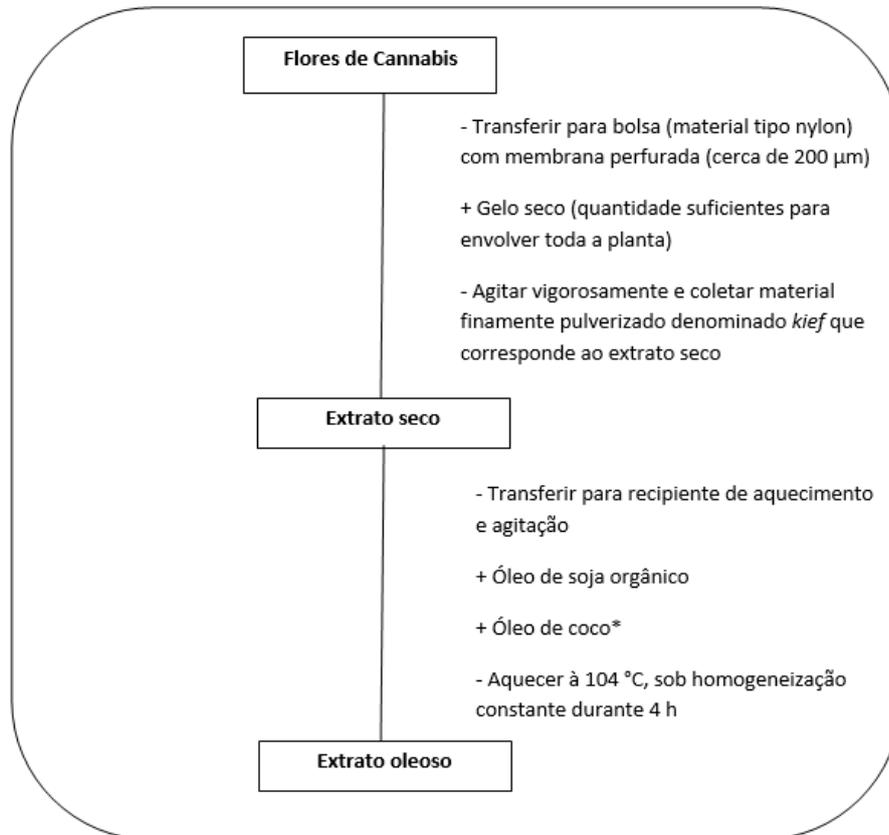
Fonte: (CARVALHO, 2017).

Figura 2 - Flores da *Cannabis sativa*



Fonte: (CARVALHO, 2017).

Figura 3 - Esquema geral da preparação de extratos oleosos artesanais



Nota: O óleo de coco orgânico é adicionado para melhor a palatabilidade na proporção de 1/3 à 1/2 do volume final de óleo.

Fonte: (CARVALHO, 2017).

A *Cannabis* spp. está presente na lista de espécies que não podem ser utilizadas na composição de produtos tradicionais fitoterápicos, de acordo com a RDC N° 26, de 13 de Maio de 2014, que difere medicamentos fitoterápicos de produtos tradicionais fitoterápicos.

A RDC N° 26/2014 afirma que medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Já os produtos tradicionais fitoterápicos são obtidos com emprego exclusivo de matérias primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico científica e que sejam planejados para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Além disso, os produtos tradicionais fitoterápicos não podem ser destinados ao manejo de doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, não

podem conter matérias primas em concentração de risco tóxico conhecido e não devem ser administrados pelas vias injetável e oftálmica.

Considerando o cenário de uso atual em que os extratos de cannabis são utilizados para o controle de um quadro clínico extremamente grave que é a epilepsia refratária, o reconhecimento da Anvisa ao autorizar sua importação torna-se clara a necessidade de discussão da RDC Nº 26/2014 que parece não ser aplicável a alguns produtos fitoterápicos de uso tradicional, como é o caso da cannabis.

A epilepsia refratária, ou farmacorresistente, no qual tem sido bastante utilizado o extrato de cannabis para o controle das convulsões, acometem principalmente crianças portadoras de síndrome genéticas raras (CDKL5, Rett e Dravet) que tem como característica mais debilitante as crises convulsivas que apresentam alta frequência com alto risco de óbito e lesões neurológicas irreversíveis (CAMPOS-CASTELLO *et al.*, 2007; PÉREZ; MORENO, 2015; ZHI *et al.*, 2016).

A síndrome de Rett é uma doença de herança dominante ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene MECP2, com um quadro clínico característico que ocorre principalmente nas meninas. Os sintomas desta síndrome têm início em geral entre 6 e 18 meses de idade. Esta condição afeta aproximadamente 1 em cada 10.000 meninas (CAMPOS-CASTELLO *et al.*, 2007). Caracteriza-se por perda de interesse e falta de interação com as pessoas, associada à regressão da habilidade de comunicação e pela presença de movimentos estereotipados, especialmente das mãos. Há ainda desaceleração da velocidade de crescimento craniano, alterações da frequência respiratória com períodos de apneia, bruxismo, escoliose e convulsões frequentes. Esta síndrome é causada por mutações no MECP2 na maioria dos casos, mas uma proporção de casos atípicos pode resultar de mutações no gene *cdkl5* (CAMPOS-CASTELLO *et al.*, 2007).

O gene *cdkl5* fornece informações para produzir a proteína CDKL5 que é essencial para o desenvolvimento normal do cérebro. Embora pouco se conheça sobre a função dessa proteína, sabe-se que pode desempenhar um papel na regulação da atividade de outros genes, incluindo o gene MECP2. A maioria das crianças que apresenta a mutação no gene *cdkl5* sofre de crises epiléticas que

começam nos primeiros meses de vida, desenvolve problemas na fala, na locomoção e dificuldades para se alimentar (ZHI *et al.*, 2016).

A Síndrome de Dravet é uma encefalopatia progressiva rara que se caracteriza por uma epilepsia grave e resistente ao tratamento convencional. É uma doença de origem genética e aproximadamente 80% dos pacientes afetados apresentam uma mutação no gene *scn1a*, o qual tem como função codificar uma proteína constituinte de um canal responsável pelo transporte de sódio através das membranas celulares (PÉREZ; MORENO, 2015). A doença geralmente aparece no primeiro ano de vida, caracterizando-se por convulsões clônicas ou tônico-clônicas generalizadas ou unilaterais de duração prolongada com possível elevação da temperatura corporal (PÉREZ; MORENO, 2015).

O uso de extrato de cannabis por pacientes portadores de alguma dessas síndromes diminuiu significativamente o número de crises convulsivas diárias (PORTER & JACOBSON, 2013). Visto isso, e diante do clamor e pressão de movimentos sociais (CARVALHO *et al.*, 2017), o Conselho Federal de Medicina (CFM) regulamentou a prescrição dos extratos de cannabis no final do ano de 2014 e sendo assim, no início de 2015 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) regulamentou a importação desses extratos, através da Resolução CFM Nº 2.113/14 (BRASIL, 2014) e da RDC Nº 17/15 (BRASIL, 2015).

Os produtos à base de CBD liberados para importação no Brasil por pacientes que tenham cadastro na Anvisa, segundo a RDC Nº 17/2015, estão associados com outros canabinoides, dentre eles o THC por se tratar de um extrato vegetal. São eles: Cibdex Hemp CBD Complex (Gotas) 1 a 2oz, Cibdex Hemp CBD Complex (Cápsulas); Hemp CBD Oil 2000 mg Canabidiol- 240 mL; Real Scientific Hemp Oil (RSHO) CBD 14-25% 3–10 g (Pasta) e Revivid LLC Hemp Tincture 500mg (22:1 CBD/THC) (Gotas) – 30mL, todos produzidos por empresas americanas e, portanto, não possuem eficácia e segurança avaliadas pela Anvisa.

Já em 2017, a Anvisa aprovou o registro do medicamento específico Mevatyl® (THC, 27 mg/mL + CBD, 25 mg/mL) na forma farmacêutica de solução oral (*spray*), ilustrado na Figura 4. É o primeiro medicamento registrado no país à base de *C. sativa*. O novo medicamento Mevatyl®, registrado em outros países com o nome comercial Sativex®, é indicado para o tratamento sintomático da espasticidade moderada a grave relacionada à esclerose múltipla, sendo destinado a pacientes adultos não responsivos a outros medicamentos antiespásticos e que demonstram

melhoria clinicamente significativa dos sintomas relacionados à espasticidade durante um período inicial de tratamento com o Mevatyl® (BULA MEVATYL®, Beaufour Ipsen Farmacêutica Ltda.).

Figura 4 - Medicamento Mevatyl® à base de THC e CBD



Fonte:(<http://www.smokebuddies.com.br>).

O Mevatyl® não é indicado para o tratamento de epilepsia, pois a alta concentração de THC possui potencial de causar agravamento de crises epiléticas. O medicamento também não é recomendado para uso em crianças e adolescentes com menos de 18 anos de idade devido à ausência de dados de segurança e eficácia para pacientes nesta faixa etária. Conforme dados de estudos clínicos realizados com Mevatyl® a ocorrência de dependência com o seu uso é improvável (BULA MEVATYL®, Beaufour Ipsen Farmacêutica Ltda.). Este fitofármaco é comercializado com tarja preta em sua rotulagem e a sua dispensação está sujeita a prescrição médica por meio de notificação de receita A prevista na Portaria SVS/MS Nº 344/1998 e de Termo de Consentimento Informado ao Paciente.

Posterior a este fato, no mesmo ano de 2017, a Anvisa atualizou a lista das Denominações Comuns Brasileiras (DCB) com a inclusão da *Cannabis sativa* L. (RDC Nº 156/17). No entanto, a medida não é um reconhecimento da cannabis como planta medicinal, uma vez que a DCB é apenas uma lista de nomes oficiais para todas as substâncias que são ou podem vir a ser de interesse da indústria farmacêutica no Brasil. Assim, a designação de uma DCB para uma planta, não implica em reconhecer que ela é planta medicinal, mas sim que ela tem potencial para ser planta medicinal (para pesquisas) ou pode ser reconhecida e importada como planta medicinal (por decisões judiciais), ou pode ser utilizada como insumo de um medicamento que receba registro.

Considerando que ainda não há registro no Brasil de medicamentos à base

de CBD para o tratamento de convulsões epilépticas e que a importação desses produtos gera custos elevados, famílias recorrem à justiça brasileira para liberação do cultivo de *C. sativa* com objetivo de preparar o próprio extrato de cannabis (ANVISA, 2017).

Como qualquer medicamento fitoterápico, os extratos de cannabis devem ter o mínimo de controle de qualidade e segurança de uso para a população, quesito fundamental para a recuperação ou preservação da saúde do paciente. A qualidade microbiológica de fitoterápicos é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras da Anvisa, que estabelecem limites máximos da carga microbiana no produto e a ausência de determinados patógenos (FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª edição, 2º suplemento, 2017).

Nos Estados Unidos da América (EUA) já existe, desde 2013, uma farmacopeia específica para *Cannabis* spp. (AMERICAN HERBAL PHARMACOPEIA, 2013) que determina os padrões de identidade, análises e controle de qualidade para as plantas, logo, esta farmacopeia não tem aplicabilidade para os extratos medicinais de cannabis, que quando importados são analisados de acordo com o que está preconizado na farmacopeia brasileira.

O presente estudo destinou-se a contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a qualidade microbiológica dos extratos de cannabis importados e principalmente aqueles produzidos artesanalmente. Além da qualidade das flores utilizadas no processo de extração que, por se tratar de um processo artesanal, o risco de contaminação microbiológica é mais elevado do que numa produção industrial, podendo comprometer não só a qualidade do produto, mas também a saúde do paciente.

2 JUSTIFICATIVA

Na legislação atual, regulamentada pela Anvisa, a *C. sativa* é considerada como proscrita, exceto para fins médicos e científicos, de forma controlada e supervisionada (BRASIL, 2017). Ou seja, isso não impede a realização de pesquisas e utilização com finalidade terapêutica, sendo possível, inclusive, o registro de medicamento à base de substância e/ou planta proscrita.

Ainda que a Anvisa autorize a importação dos extratos de cannabis, o acesso a este medicamento acarreta em questões burocráticas e principalmente financeiras, uma vez que esses produtos são vendidos a preços elevados. Tendo em vista esse fato, famílias de pacientes portadores da epilepsia refratária estão obtendo autorização, por meio judicial, para cultivarem cannabis e produzirem seus próprios extratos medicinais.

Considerando que os extratos de cannabis são utilizados em sua maioria por crianças acometidas por doenças neurológicas graves e a produção artesanal dos extratos não tem nenhum tipo de controle de qualidade microbiológica, faz-se necessário a análise desse extrato, pois a contaminação pode trazer riscos para a saúde do usuário e também causar mudanças na identidade e qualidade do extrato.

Existem muitos estudos sobre as propriedades farmacológicas da *C. sativa*, mas poucos abordam sobre análise microbiológica dos extratos oleosos de cannabis, tampouco sobre seus contaminantes. Estudos revelaram o potencial antimicrobiano dos canabinoides (APPENDINO *et al.*, 2008), do óleo da semente da cannabis e produtos da extração alcoólica da planta (ALI *et al.*, 2012), entretanto, análises microbiológicas dos extratos oleosos de cannabis realizadas no presente estudo, demonstraram alta abundância de micro-organismos patogênicos.

Além disso, responsáveis de pacientes que utilizam extratos medicinais de cannabis produzidos artesanalmente relataram que seus filhos apresentaram casos de diarreia e febre alta após o uso do produto, que pode estar relacionado à contaminação microbiana.

Diante da importância do tema para a saúde pública, este estudo torna-se de alta relevância, pois envolve o monitoramento microbiológico de extrato artesanal de cannabis, abordagem ainda não adotada pelos produtores no Brasil, que poderá favorecer a melhoria da qualidade dos produtos e fornecer subsídios aos órgãos sanitários para a monitorização e regulamentação desses produtos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a segurança microbiológica de extratos de cannabis produzidos artesanalmente e correlacionar com aqueles que são comercializados, produzidos no exterior.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar microbiologicamente as flores secas de *C. sativa* utilizadas no processo extrativo, os extratos medicinais da cannabis produzidos de forma artesanal no Brasil e os extratos medicinais importados, produzidos industrialmente;
- Verificar a presença de inibidores de crescimento microbiano;
- Realizar a contagem total de bactérias aeróbias, bolores, leveduras e bactérias Gram-negativas bile tolerantes;
- Pesquisar patógenos através de enriquecimento em meio seletivo e identificá-los por caracterização fenotípica;
- Correlacionar os micro-organismos identificados nas amostras com a possível origem da contaminação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os extratos oleosos de cannabis foram produzidos por familiares de pacientes epiléticos que possuem *habeas corpus* para preparar seu próprio extrato com flores de cannabis cultivadas em casa, no qual muitas preparações foram assistidas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) através de um projeto de extensão, chamado Farmacannabis-UFRJ (CARVALHO, 2017). Após a coleta, foram fornecidas amostras para o Setor de produtos não estéreis, no Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), por meio da parceria (Ofício N° 657/2017) para verificação da qualidade microbiológica.

Além das amostras de extratos oleosos artesanais (n = 40), também foram fornecidas amostras de extratos importados (n = 32) e algumas flores de *C. sativa* (n = 6) que foram analisadas imediatamente após o recebimento no laboratório.

Para a realização das análises foram utilizados os Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) do Laboratório de Produtos Não Estéreis: POP 65.3210.008, rev.: 18 (Pesquisa de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise); POP 65.3210.009, rev.: 20 (Verificação da capacidade inibitória de produtos não estéreis do departamento de microbiologia); POP 65.3210.010, rev.: 20 (Contagem total de bactérias aeróbias, bile tolerantes, bolores e leveduras em produtos farmacêuticos e água para diálise).

Todos os POPs citados foram baseados na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA Brasileira 2010 e segundo suplemento 2017) e correspondem à ensaios acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) pela Norma Técnica da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) ISO/IEC 17.025/2017 e também são qualificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

4.1 Verificação da capacidade inibitória

O ensaio da verificação da capacidade inibitória é o ensaio inicial realizado em todas as amostras com o objetivo de verificar se há uma possível presença de inibidores microbianos na amostra que possa originar um resultado falso negativo (INCQS, 2018^a).

Na realização deste ensaio são utilizados cinco micro-organismos de referência: *Staphylococcus aureus* (ATCC CRM 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC CRM 9027), *Escherichia coli* (ATCC CRM 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Candida albicans* (ATCC CRM 10231). A partir da criopreservação dos micro-organismos de referência, foram feitos subcultivos em 5 mL de caldo caseína-soja (Merck, EUA) separadamente e foram posteriormente incubados a $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 18 - 24 horas, com exceção de *C. albicans* que foi incubada a $(22,5 \pm 2,5)$ °C até 5 dias.

Após o período de incubação dos micro-organismos, foram preparados os inóculos através de diluições decimais a partir do fator 2 até a obtenção de 100 células viáveis. Posteriormente inoculou-se 1 mL da suspensão de cada micro-organismo, separadamente em tubo contendo 8 mL de caldo caseína-soja e 1 mL da amostra (identificado como presença da amostra); paralelamente, inoculou-se 1 mL da suspensão, em tubo contendo 9 mL de caldo caseína-soja sem a amostra (identificado como ausência da amostra) e tubo contendo meio sem amostra e sem micro-organismo identificado como branco. Os tubos identificados como: presença da amostra, ausência da amostra e branco foram incubados a $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 24 h, com exceção dos ensaios frente à *C. albicans* que foram incubados a $(22,5 \pm 2,5)$ °C por até 5 dias.

Após o período de incubação e ao verificar crescimento dos micro-organismos empregados na presença da amostra indica a ausência de substâncias inibidoras, devendo então prosseguir com as análises microbiológicas da amostra. Já a ausência de crescimento dos micro-organismos empregados frente à amostra indica a presença de substâncias inibidoras de crescimento microbiano. Essa atividade inibitória deve ser então eliminada, antes das análises microbiológicas, conforme descrito a seguir.

4.1.1 Procedimentos para eliminar a atividade inibitória

- a) Método de diluição: aumentar o volume do diluente ou meio de cultura a ser utilizado mantendo constante a quantidade do produto.
- b) Método de inativação: adicionar ao meio de cultura substâncias inativadoras na quantidade suficiente, de acordo com a substância presente na amostra: utilizar

caldo caseína-soja com 1% de penicilinase para amostras que contenham penicilinas; ou utilizar caldo caseína-soja com 0,4% de polissorbato 80 e 0,5% de lecitina de soja para amostras com outras substâncias que requeiram inativação ou usar outras substâncias inativadoras adequadas de acordo com o produto, por exemplo: Caldo neutralizante DEY-ENGLEY ou Neutralizante Universal.

c) Associação dos métodos da diluição e inativação: aumentar o volume do meio utilizado e adicionar ao mesmo a substância inativadora, conforme o caso.

d) Método de filtração por membrana: eliminar, através de lavagens sucessivas, as substâncias inibitórias presentes na amostra que possam dificultar ou inibir o crescimento de micro-organismos contaminantes.

Se mesmo assim não for possível a eliminação da atividade inibitória do produto atribui-se ao produto uma atividade antimicrobiana, frente aos micro-organismos testados.

4.2 Contagem total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras

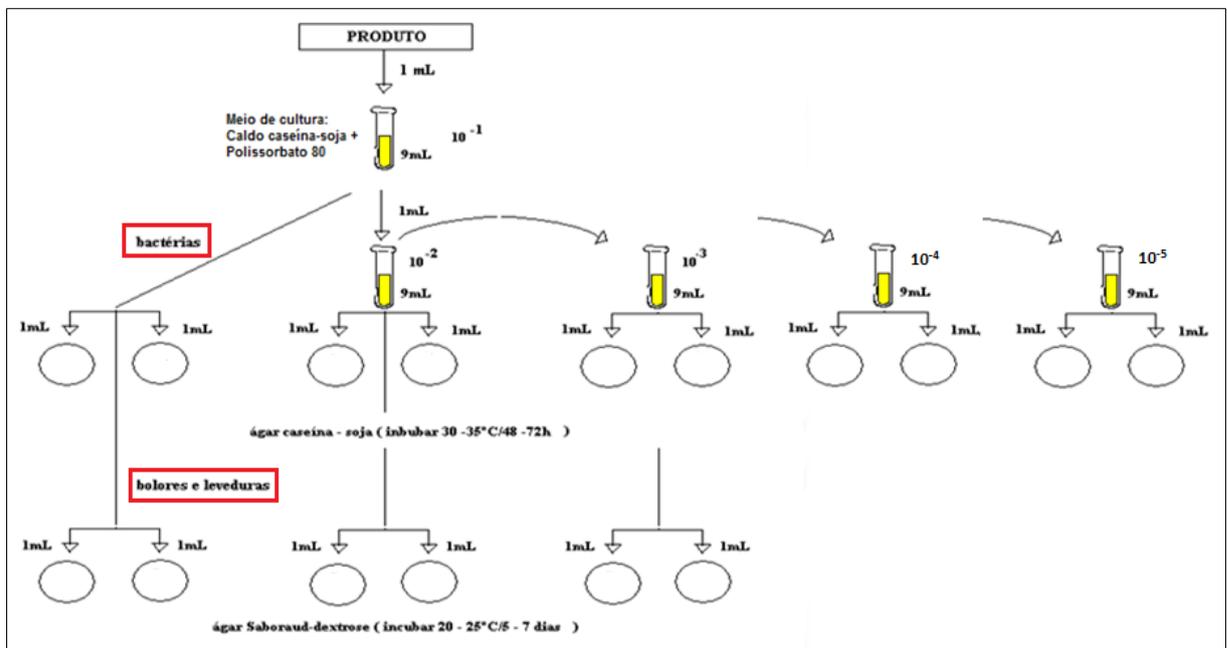
Como os extratos de cannabis são produtos de natureza lipídica, transferiu-se 1 mL da mistura da amostra paratubo de ensaio com 9 mL de caldo caseína-soja com 0,1% de polissorbato 80 para atingir a diluição 1:10. O produto foi homogeneizado cuidadosamente a uma temperatura de 40–45°C em banho termostático. Foram preparadas diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente (caldo caseína-soja) acrescido de polissorbato 80. Já para análise das flores secas de cannabis transferiu-se 1 g da amostra para tubo de ensaio com 9 mL de caldo caseína-soja para atingir a diluição 1:10, foram preparadas diluições decimais sucessivas e então foi dado prosseguimento ao ensaio.

Utilizou-se o método de contagem por semeadura em profundidade (em duplicata) e para contagem total de bactérias aeróbias foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) da amostra para 2 placas de Petri e adicionado 20 mL de ágar caseína-soja (Merck, EUA), previamente fundido e resfriado a 45–50°C em banho termostático. Após homogeneização e solidificação do ágar as placas foram incubadas a $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 48 h (INCQS, 2018^b).

Já para a contagem de bolores e leveduras (semeadura em profundidade) foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) da amostra para 2 placas de Petri e adicionado 20 mL de ágar sabouraud-dextrose 4% (Difco, EUA), previamente fundido e resfriado a $45-50^{\circ}\text{C}$ em banho termostático. Após homogeneização e solidificação do ágar as placas foram incubadas a $(22,5 \pm 2,5)^{\circ}\text{C}$ por 5 a 7 dias (INCQS, 2018^b).

A Figura 5 apresenta o esquema do ensaio para a contagem total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras.

Figura 5 - Esquema do ensaio da contagem de micro-organismos.



Fonte: (FERREIRA, 2016).

4.2.1 Contagem de colônias

Foi contado o número de colônias nas placas de ágar caseína-soja, que apresentaram até 300 colônias de bactérias e nas placas de ágar sabouraud dextrose com até 100 colônias fúngicas, utilizando contador de colônias.

Para a realização do cálculo foi utilizado a seguinte fórmula:

$$N = \frac{(\sum P_i)}{(\sum V_i)} D$$

Onde:

N = Número de Unidade Formadora de Colônia (UFC) /1 g ou 1 mL

D = Fator de diluição usado

ΣP_i = Soma do número de colônias observadas em cada placa

ΣV_i = Soma do volume do teste em cada placa

Quando as placas de todas as diluições não apresentavam colônias, a contagem foi registrada como sendo menor que uma vez a menor diluição. Por exemplo, se nenhum crescimento foi detectado na diluição 1:10, a contagem foi inferior a 10 unidades formadoras de colônias/g ou mL.

4.3 Contagem de bactérias gram-negativas bile tolerantes

Transferiu-se uma alíquota de 1 mL da diluição 1:10 da amostra (antes de sua incubação) para tubos contendo 9 mL de caldo Mossel para enterobactéria (Difco, EUA), realizando diluições em série até 10^{-3} . Os três tubos foram incubados a $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 24 a 48 h. Após período de incubação, para cada tubo com crescimento positivo, foram realizadas subculturas em agar violeta vermelho bile glicosado (VRBG) (Merck, EUA) e posteriormente incubadas a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 18 a 24 horas (INCQS, 2018^b).

O crescimento de colônias bem desenvolvidas de bactérias Gram-negativas, geralmente vermelhas ou avermelhadas, indica contaminação (resultado positivo). Anotam-se os resultados positivos e negativos, e determina-se o número mais provável de bactérias por grama ou mililitro do produto segundo tabela 1.

Tabela 1 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias Gram-negativas bile tolerantes

Resultados para quantidade de produto de			Número provável de bactérias por grama, ou mililitro do produto
0,1 g ou mL	0,01 g ou mL	0,001 g ou mL	
+	+	+	Mais de 10 ³
+	+	-	Menos de 10 ³ e mais de 10 ²
+	-	-	Menos de 10 ² e mais de 10
-	-	-	Menos de 10

Fonte: (Modificado da FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª edição, 2010).

4.4 Pesquisa de patógenos

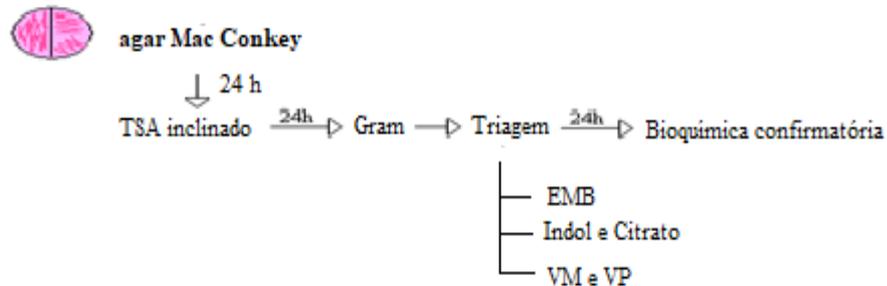
Esse método possibilita verificar a presença ou a ausência de micro-organismos específicos em meios seletivos. Para todas as pesquisas descritas a seguir, utilizou-se a amostra na diluição 10⁻¹ em caldo caseína-soja previamente incubada a (32,5 ± 2,5) °C durante 18 a 24 h (INCQS, 2018^c).

4.4.1 *Escherichia coli*

Transferiu-se 1 mL da amostra para 100 mL de caldo MacConkey (Difco, EUA). Incubou-se a (43 ± 1) °C durante 24–48 h. Após período de incubação, realizou-se subcultura em placa de Agar MacConkey (Difco, EUA) e incubou-se a (32,5 ± 2,5) °C durante 18 a 72 h. O crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, com micromorfologia característica de bacilo Gram-negativo, indica presença provável de *E. coli* que deve ser confirmada por coloração de Gram (INCQS, 2016) e testes bioquímicos específicos: citrato (Merck, EUA), indol (Merck, EUA), eosina azul de metileno (EMB) (Merck, EUA), vermelho de metila (VM) e VogesProskauer (VP) como apresentado na figura 6.

Figura 6 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de *E. coli*

PESQUISA DE *Escherichia coli*

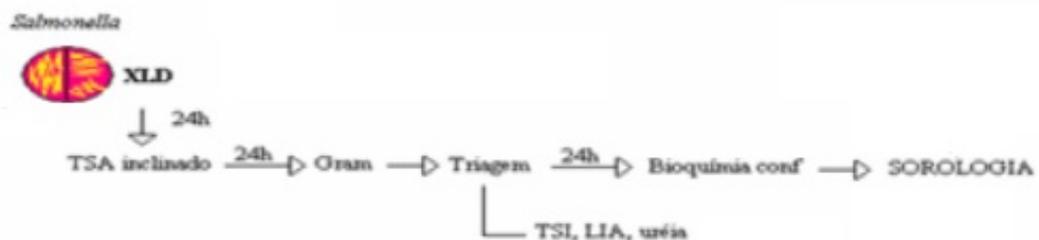


Nota: TSA inclinado = agar caseína soja inclinado
 Fonte: (FERREIRA, 2016).

4.4.2 *Salmonella*

Transferiu-se 0,1 mL da amostra para tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo enriquecimento *Salmonella* Rappaport-Vassiliadis (Merck, EUA). Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 18 a 24 h. Após período de incubação, realizou-se subcultura em placa contendo agar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Difco, EUA) e incubou-se a $32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24h. O crescimento de colônias bem desenvolvidas, vermelhas com ou sem centro negro indica presença provável de *Salmonella* que deve ser confirmada por coloração de Gram e testes bioquímicos específicos: agar lisina ferro (LIA) (Merck, EUA), agar tríplice açúcar ferro (TSI) (Merck, EUA) e agar ureia (Merck, EUA), como apresentado na figura 7.

Figura 7 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de *Salmonella*

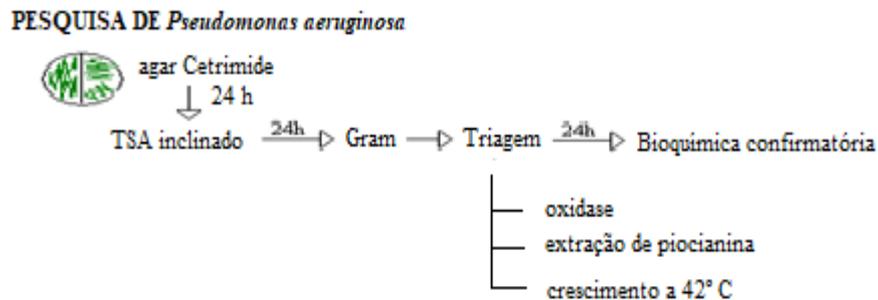


Nota: TSA inclinado = agar caseína soja inclinado
 Fonte: (FERREIRA, 2016).

4.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Transferiu-se uma alíquota da amostra para placa contendo Agar cetrimide (Difco, EUA). Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24 h. O crescimento de colônias verdes indica presença provável de *P. aeruginosa* que deve ser confirmada através de coloração de Gram (INCQS, 2016) e testes bioquímicos específicos: oxidase, pigmentação (extração de piocianina) e crescimento a 42°C, como apresentado na figura 8.

Figura 8 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de *P. aeruginosa*

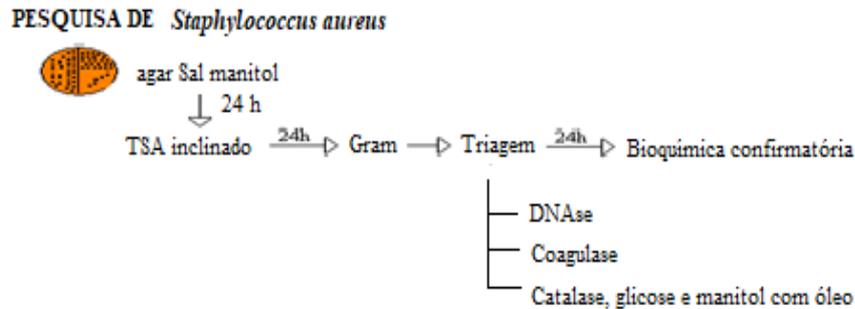


Nota: TSA inclinado = agar caseína soja inclinado
 Fonte:(FERREIRA, 2016).

4.4.4 *Staphylococcus aureus*

Transferiu-se uma alíquota da amostra para placa contendo agar sal manitol (Merck, EUA). Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24 h. O crescimento de colônias amarelas ou brancas rodeada por uma zona amarela indica presença provável de *S. aureus* que deve ser confirmada por coloração de Gram (INCQS, 2016) e testes bioquímicos específicos: desoxirribonuclease (DNase) (Merck, EUA), coagulase, catalase, glicose e manitol com óleo, como apresentado na figura 9.

Figura 9 - Esquema das metodologias dos ensaios para pesquisa e identificação de *S. aureus*



Nota: TSA inclinado = agar caseína soja inclinado
 Fonte: (FERREIRA, 2016).

4.4.5 *Candida albicans*

Transferiu-se uma alíquota para placa contendo Agar sabouraud dextrose e Agar Nickerson. Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24–48 h. O crescimento de colônias brancas em Agar sabouraud e colônias pretas em Agar Nickerson indica presença provável de *C. albicans* que deve ser confirmada por testes bioquímicos.

4.4.6 *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Transferiu-se uma alíquota da amostra para placa contendo Agar sabouraud dextrose. Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24–48 h. O crescimento de colônias grandes com crescimento radial, micélio aéreo de coloração inicialmente branca, tornando-se verde oliva em Agar sabouraud dextrose indica presença provável de *A. flavus* e/ou *A. parasiticus* sendo necessárias observações macro e micromorfológicas que identificam os fungos filamentosos.

4.4.7 Outros micro-organismos

As colônias que não foram compatíveis com as características dos micro-organismos pesquisados acima foram isoladas e submetidas ao crescimento em agar caseína soja inclinado. Após período de incubação $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 18–72 h foram realizadas triagens e bioquímica complementar para identificação de gênero e espécie.

Os testes de identificação microbiana para a confirmação de cada micro-organismo encontrado devem ser realizados segundo Jorgensen&Pfaller, 2015.

4.5 Avaliação da qualidade microbiológica

Os produtos analisados foram avaliados microbiologicamente baseando-se nos critérios preconizados pela Farmacopeia Brasileira, levando em consideração o tipo de matriz, como pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 - Limites microbianos para produtos não estéreis

<i>Via de administração</i>	<i>Contagem total de bactérias aeróbias</i> <i>UFC/g ou mL^a</i>	<i>Contagem total de fungos</i> <i>UFC/g ou mL^a</i>	<i>Pesquisa de patógenos^{b, c}</i>
2 Produtos de origem vegetal^d			
2.1 Produto acabado			
Para uso oral, contendo insumo ativo que foi submetido a pré-tratamento que reduz a carga microbiana.	10 ⁴	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em 1g ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g ou 10 mL. Limite máximo de 10 ² bactéria Gram negativa bile tolerante ^e em 1g ou mL.
2.2 Insumos farmacêuticos vegetais			
Droga vegetal (rasurado ou triturado) que será submetida a pré-tratamento que reduz a carga microbiana	10 ⁷	10 ⁴	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g. Limite máximo de 10 ³ bactéria Gram negativa bile tolerante ^e em 1g.

Fonte: (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª edição, 2º suplemento, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro ensaio realizado foi verificação da capacidade inibitória, no qual todas as amostras obtiveram resultados positivos, ou seja, não apresentaram inibidores do crescimento microbiano. Os resultados da contagem total de bactérias aeróbias, bolores e levedura, e bactérias Gram-negativas bile tolerantes, foram apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, referente às flores, extratos artesanais e extratos importados, respectivamente.

5.1 Flores de *cannabis sativa*

Todas as seis amostras de flores de cannabis analisadas apresentaram contaminação microbiana, porém, quatro amostras (66,7%) estavam acima dos limites recomendados pela Farmacopeia Brasileira (Tabela 2).

Foram detectadas a presença de enterobactérias em quase todas as amostras, tais como: *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Enterobacter gergoviae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter pyrinus*, *Cedecea davisae* e *Cedecea neteri*. *Enterobacter* sp. é comum em matérias-primas vegetais, uma vez que está relacionado ao meio ambiente das plantas (ARAÚJO; OHARA, 2000).

Tabela 2 - Análise microbiológica de flores de *Cannabis sativa*

Nº amostra	Contagem Total de Bactérias Aeróbias	Contagem de Bolores e Leveduras	Contagem de Bactérias Gram-negativas bile tolerantes	Micro-organismos
1	$6,0 \times 10^2$	< 10	$> 10^4$	<i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Escherichia coli</i>
2	< 10	$1,0 \times 10^3$	< 10	<i>Aspergillus parasiticus</i> e <i>Aspergillus alliaceus</i>
3	$3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$	$> 10^5$	<i>Bacillus coagulans</i>; <i>Bacillus acidocaldarius</i>; <i>Enterobacter cloacae</i>; <i>Enterobacter gergoviae</i>; <i>Escherichia coli</i>; <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
4	$2,0 \times 10^6$	< 10	$> 10^5$	<i>Cedecea davisae</i>; <i>Cedecea neteri</i> e <i>Escherichia coli</i>
5	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$> 10^3$	<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Pantoea agglomerans</i> e <i>Aspergillus niger</i>
6	$2,5 \times 10^6$	< 10	$> 10^4$	<i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter pyrinus</i>

Nota: Resultados das contagens em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g)

Fonte: (Do autor, 2018).

5.2 Extratos oleosos artesanais de cannabis medicinal

De um total de 40 amostras de extratos artesanais de cannabis medicinal analisadas, 16 apresentaram-se acima dos limites microbianos preconizados pela Farmacopeia Brasileira para esse tipo de produto. Ou seja, 40,0% das amostras estavam com elevado nível de contaminação microbiana, dentre fungos e bactérias (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise microbiológica dos extratos artesanais de cannabis (continua)

Nº amostra	Contagem Total de Bactérias Aeróbias	Contagem de Bolores e Leveduras	Contagem de Bactérias Gram-negativas bile tolerantes	Micro-organismos
1	< 10	1,0 x 10 ⁴	< 10	<i>Candida albicans</i>
2	3,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ³	< 10	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Aspergillus brasiliensis</i>
3	< 10	< 10	< 10	
4	2,0 x 10 ²	1,0 x 10 ⁴	< 10	<i>Bacillus circulans</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
5	< 10	1,0 x 10 ³	< 10	<i>Aspergillus parasiticus</i>
6	< 10	< 10	< 10	
7	< 10	< 10	< 10	
8	< 10	< 10	< 10	
9	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ⁴	< 10 ²	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Bacillus pumilus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
10	< 10	1,0 x 10 ³	< 10	<i>Aspergillus parasiticus</i>
11	< 10	< 10	< 10	
12	< 10	< 10	< 10	
13	5,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁴	< 10	<i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus acidocaldarius</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
14	< 10	< 10	< 10	
15	< 10	< 10	< 10	
16	< 10	1,0 x 10 ⁴	< 10	<i>Aspergillus parasiticus</i>
17	< 10	1,0 x 10 ³	< 10	<i>Aspergillus parasiticus</i>
18	< 10	< 10	< 10	
19	< 10	1,0 x 10 ⁴	< 10	<i>Candida albicans</i>
20	< 10	< 10	< 10	
21	< 10	< 10	< 10	
22	< 10	< 10	< 10	

Tabela 3 - Análise microbiológica dos extratos artesanais de cannabis (conclusão)

Nº amostra	Contagem Total de Bactérias Aeróbias	Contagem de Bolores e Leveduras	Contagem de Bactérias Gram-negativas bile tolerantes	Micro-organismos
23	1,0 x 10⁶	< 10	> 10³	<i>Bacillus circulans, Bacillus brevis, Cronobacter sakazakii e Escherichia coli</i>
24	< 10	< 10	< 10	
25	< 10	< 10	< 10	
26	< 10	< 10	< 10	
27	1,5 x 10⁴	< 10	> 10³	<i>C. sakazakii e Enterobacter cloacae</i>
28	< 10	< 10	< 10	
29	< 10	< 10	< 10	
30	1,0 x 10⁶	< 10	> 10³	<i>C. sakazakii, Enterobacter cloacae e Cedecea davisae</i>
31	< 10	< 10	< 10	
32	< 10	< 10	< 10	
33	< 10	< 10	< 10	
34	1,5 x 10⁵	< 10	> 10³	<i>Bacillus pumilus, Bacillus cereus, C. sakazakii, Enterobacter cloacae e Pantoea agglomerans</i>
35	< 10	1,0 x 10⁴	< 10	<i>Aspergillus parasiticus e Candida albicans</i>
36	< 10	< 10	< 10	
37	< 10	< 10	< 10	
38	< 10	< 10	< 10	
39	1,0 x 10⁵	< 10	< 10	<i>Staphylococcus epidermidis e Bacillus subtilis</i>
40	< 10	< 10	< 10	

Nota: Resultados das contagens em Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL)

Fonte: (Do autor, 2018).

Os resultados demonstraram que mesmo o produto passando por um processo extrativo com temperatura em torno de 104 °C, não foi suficiente para eliminar completamente a contaminação microbiana em alguns casos, com o crescimento de uma variedade de espécie de bactérias e fungos.

Alguns fatores também são importantes a serem considerados no controle de produtos de origem vegetal, como poluição na água de irrigação e na atmosfera, condições de coleta, manipulação, secagem e estocagem. Tais fatores relacionam-se a ocorrência de contaminação microbiana, por vezes de espécies patogênicas que podem agir sobre a integridade do produto ou diretamente no usuário. Ao se tratar de um produto com finalidade terapêutica, verifica-se a importância de especificações adequadas de qualidade microbiológica, da mesma forma que ocorre para os demais medicamentos não estéreis (BUGNO *et al.*, 2005).

A necessidade do controle microbiológico é importante, devido, principalmente, à segurança, eficácia e aceitabilidade, uma vez que falhas no controle do processo de fabricação podem levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, a alteração das características físicas (cor, viscosidade) e químicas (inativação do princípio ativo) do produto, com graves consequências à saúde do consumidor, pelo uso de produtos em desacordo com suas características de qualidade estabelecidas (YAMAMOTO *et al.*, 2004).

5.3 Extratos oleosos importados de cannabis medicinal

Dos extratos importados analisados, apenas 16,0% apresentaram falha no atendimento às especificações quanto à presença de contaminantes microbianos acima do limite preconizado pela Farmacopeia Brasileira (Tabela 4). Os resultados indicam que os produtos industrializados possuem um controle de qualidade microbiano mais rigoroso, quando comparado aos extratos artesanais que apresentaram mais que o dobro de amostras fora das especificações.

Tabela 4 - Análise microbiológica dos extratos importados de cannabis

Nº amostra	Contagem Total de Bactérias Aeróbias	Contagem de Bolores e Leveduras	Contagem de Bactérias Gram-negativas bile tolerantes	Micro-organismos
1	< 10	< 10	< 10	
2	< 10	< 10	< 10	
3	< 10	< 10	< 10	
4	< 10	< 10	< 10	
5	< 10	< 10	< 10	
6	2,0 x 10⁵	2,0 x 10³	< 10	<i>B. brevis</i>, <i>B. cereus</i> e <i>A. parasiticus</i>
7	< 10	< 10	< 10	
8	< 10	< 10	< 10	
9	< 10	< 10	< 10	
10	< 10	1,0 x 10⁴	< 10	<i>A. parasiticus</i> e <i>Aspergillus brasiliensis</i>
11	< 10	< 10	< 10	
12	< 10	< 10	< 10	
13	< 10	< 10	< 10	
14	< 10	< 10	< 10	
15	< 10	< 10	< 10	
16	< 10	< 10	< 10	
17	< 10	< 10	< 10	
18	< 10	< 10	< 10	
19	< 10	< 10	< 10	
20	< 10	< 10	< 10	
21	< 10	< 10	< 10	
22	2,0 x 10⁵	< 10	> 10³	<i>P. agglomerans</i> e <i>E. cloacae</i>
23	< 10	< 10	< 10	
24	< 10	1,0 x 10⁴	< 10	<i>C. albicans</i>
25	< 10	< 10	< 10	
26	< 10	< 10	< 10	
27	< 10	< 10	< 10	
28	< 10	< 10	< 10	
29	< 10	< 10	< 10	
30	< 10	< 10	< 10	
31	2,0 x 10³	< 10	< 10	<i>Bacillus acidocaldarius</i> e <i>Bacillus subtilis</i>
32	< 10	< 10	< 10	

Nota: Resultados das contagens em Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL).

Fonte: (Do autor, 2018).

5.4 Micro-organismos identificados

Existem poucos estudos que avaliam microbiologicamente os extratos oleosos da cannabis medicinal, porém, um estudo desenvolvido por pesquisadores na Califórnia - EUA (MCHARDY *et al.*, 2018) relatou a presença de vários micro-organismos em plantas de *Cannabis sativa*, dentre eles, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. cloacae* e algumas espécies do gênero *Pantoea*.

Outro estudo analisou flores de cannabis comercializadas em *coffee shops* na Holanda (HAZEKAMP, 2006), no qual foram encontrados contaminantes patogênicos, como *E. coli*, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp., com altas contagens em todas as amostras analisadas. Assim como no presente estudo, em que todas as amostras de flores analisadas apresentaram contaminação, visto que, os produtos vegetais estão em contato direto com o ambiente e, portanto, o risco de contaminação microbiológica é maior.

Alguns dos micro-organismos mencionados nesses dois estudos citados também foram encontrados nas amostras analisadas no presente estudo, como *E. cloacae*, *Pantoea* spp., *Aspergillus* spp. e *E. coli*.

Enterobacter cloacae é um bacilo Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae* classificado como bactéria oportunista, responsável por 65-75% de todas as infecções por *Enterobacter*, corresponde entre 5 e 10% de todos os casos de sepse por Gram-negativos e nos últimos anos apareceu como importante causa de infecção hospitalar. Seus reservatórios endógenos incluem o trato gastrointestinal em adultos saudáveis, trato urinário e respiratório, bem como locais cirúrgicos e feridas de queimaduras (LIN *et al.*, 2006).

Escherichia coli é uma bactéria que habita normalmente o intestino humano e de alguns animais, no entanto, nem todas as linhagens de *E. coli* são comensais, sendo as patogênicas capazes de causar doenças debilitantes em tecidos intestinais e extra intestinais, como gastroenterite, intoxicação alimentar, infecções nos tratos urinários e respiratórios, podendo levar ao óbito. Devido a esta bactéria fazer parte da microbiota intestinal de vários animais, é liberada nas fezes e sua presença é indicativo de contaminação fecal (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

A *P. agglomerans*, espécie comumente encontrada em plantas, solo, água e alimentos, embora raramente reconhecida como agente de infecções nosocomiais

endógenas, pode causar epidemias entre pacientes hospitalizados quando associada ao uso de produtos intravenosos contaminados devido à sua capacidade de crescer em fluidos de infusão comerciais (BICUDO *et al.*, 2007).

Micro-organismos do gênero *Bacillus* são bacilos Gram-positivos, formadores de esporos, resistentes a condições ambientais adversas, como calor e baixos níveis de umidade, são comumente encontrados no solo, mas algumas espécies, como *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, são patogênicas, podendo causar diarreia, náusea e vômitos. O *B. cereus* produz uma toxina termoresistente e outra enterotoxina termolábil relacionadas a surtos de intoxicação alimentar. É a espécie do gênero *Bacillus* mais frequente em infecções oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Pode ocasionar bacteremia, septicemia, meningite, abscesso cerebral, pneumonia, endocardite e infecções supurativas em feridas e queimaduras. Já o *B. subtilis* é considerado um patógeno oportunista. Foi isolado em pacientes sob o uso de próteses, imunocomprometidos e em infecções oculares e do sistema nervoso central por introdução traumática (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

A espécie *S. aureus* é um micro-organismo que pode sobreviver permanentemente na microbiota das narinas, pele, garganta e trato intestinal de alguns indivíduos, o que faz com que os indivíduos se tornem disseminadores desse micro-organismo. Na maioria das vezes a colonização é assintomática principalmente nas vias nasais. As rotas de transmissão ocorrem por contato direto, geralmente através da pele de uma pessoa colonizada ou infectada com lesões abertas ou com as mãos e bocas de profissionais de saúde contaminados (COSTA *et al.*, 2011).

Staphylococcus epidermidis, anteriormente considerado um micro-organismo comensal inócuo na pele humana, agora é visto como um importante patógeno oportunista, ocupando o primeiro lugar entre os agentes causadores de infecções nosocomiais juntamente com o *S. aureus*. Em particular, *S. epidermidis* representa a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos internos, provavelmente pelo fato dessa bactéria ser colonizadora onipresente da pele humana, o que resulta na alta probabilidade de contaminação do dispositivo durante a inserção. Embora as infecções por *S. epidermidis* raramente se desenvolva em doenças potencialmente fatais, sua frequência, e o fato de que elas são extremamente difíceis de tratar, devido à presença de genes de resistência a antibióticos e a formação de biofilmes, representa um sério ônus para o sistema público de saúde (OTTO, 2009).

Cronobacter sakazakii é um patógeno oportunista, habita em material vegetal e pode sobreviver em condições muito secas. Foi encontrado em uma variedade de alimentos secos, incluindo fórmulas infantis em pó, leite em pó desnatado, chás de ervas e amidos, além de esgotos. Doenças causadas por essa bactéria são raras, mas elas são frequentemente letais para crianças e podem ser graves em pessoas imunocomprometidas e idosos, podendo causar infecções como enterocolite necrosante, bacteremia, meningite e abscessos / lesões cerebrais, devido a sua capacidade de transitar no estômago, atravessar o epitélio intestinal, sobreviver em macrófagos e atravessar a barreira hematoencefálica (IVERSEN *et al.*, 2007; FORSYTHE, 2018).

Fungos do gênero *Aspergillus* também foram encontrados nas amostras analisadas no presente estudo. Estes são onipresentes no ar, solo e material em decomposição, conseqüentemente estão sendo constantemente inalados e, com isso, o trato respiratório é considerado a porta de entrada desses micro-organismos. A exposição a este fungo no meio ambiente pode provocar reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis ou então aspergilose invasiva e doença disseminada em indivíduos com graves problemas de imunodepressão. A aspergilose invasiva ocorre em uma ampla variedade de cenários clínicos, é variável nas suas manifestações, e ainda está associado com uma taxa de mortalidade muito elevada (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

Candida albicans pode causar infecções invasivas em humanos associadas a alta morbidade e alta mortalidade nos pacientes afetados. Uma das razões pode ser devido à resistência da levedura aos antifúngicos utilizados em sua terapia. As manifestações clínicas da candidíase apresentam uma ampla gama de manifestações clínicas, como candidíase cutânea da mucosa e candidíase invasiva ou sistêmica, esta última caracterizada por infecções profundas ou invasivas e pode ser localizada em um órgão ou disseminada pela corrente sanguínea. Apresentam sintomas cardíacos, digestivos, respiratórios, hepáticos, renais, oculares, nervosos centrais ou disseminados, que é uma forma de tratamento clinicamente difícil (VIEIRA; SANTOS, 2017). Um produto colonizado com esses micro-organismos pode sofrer perda das suas propriedades físico-químicas e principalmente prejudicar a saúde dos usuários, que neste caso são, em sua maioria, crianças imunocomprometidas. Esses micro-organismos encontrados nas amostras podem

estar envolvidos nos casos de diarreia e febre alta relatados por mães de pacientes que fazem uso dos extratos artesanais de cannabis.

Fisk e colaboradores (2009) desenvolveram um estudo em que sementes de *C. sativa* foram submetidas a irradiação gama, e através de uma análise microbiológica antes e após a irradiação puderam observar que os raios gamas eliminavam todos os micro-organismos que foram encontrados nas sementes. Porém, a viabilidade das sementes, ou seja, o seu potencial de germinação diminuiu exponencialmente com o aumento da dose de irradiação.

Levando em consideração esse estudo, pode-se pensar numa possibilidade viável de esterilizar as flores da cannabis antes da preparação do extrato ou até mesmo do próprio produto final, entretanto, deve-se verificar se esta técnica pode alterar as concentrações dos canabinoides presentes. Mais estudos devem ser desenvolvidos, visto que isso poderá otimizar o controle microbiológico dos extratos artesanais de cannabis.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que nenhuma das amostras analisadas apresentou inibidor de crescimento microbiano e um total de 27 amostras apresentaram contaminação, seja por bactérias ou por fungos patogênicos, considerada fora dos limites recomendados pela farmacopeia brasileira. Vinte e três espécies de micro-organismos foram identificadas, sendo dezoito espécies de bactérias e cinco espécies de fungos. Todas as flores analisadas estavam contaminadas e comparando os extratos analisados, aqueles produzidos artesanalmente apresentaram maior número de amostras contaminadas do que os extratos importados, indicando que os produtos industrializados possuem maior controle microbiológico com boas práticas de fabricação.

Os extratos medicinais de cannabis são usados por pessoas imunocomprometidas e, quando contaminados, principalmente por micro-organismos patogênicos, podem não apenas afetar a qualidade do produto, mas também agravar ainda mais a saúde dos usuários.

Os medicamentos fitoterápicos devem ser considerados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos. A fiscalização e o cumprimento às instruções normativas devem ocorrer em todas as etapas do processo de extração até o armazenamento, de modo, a evitar contaminação microbiana com consequente perda das suas propriedades.

Devido ao crescente número de pessoas que usam extratos medicinais de cannabis e ao desejo de produzir seu próprio extrato, principalmente devido à relação custo-benefício, são necessários mais estudos sobre este assunto. Além disso, é necessário um monitoramento microbiológico mais rigoroso na preparação do extrato, a fim de garantir a qualidade, segurança e eficácia do produto e, conseqüentemente, uma melhor qualidade de vida para os usuários.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. *et al.* Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, p. 196-200, jan. 1940.
- ALI, E. M. M. *et al.* Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L. **Chinese Medicine**, v. 03, n. 01, p.61-64, 2012.
- AMERICAN herbal farmacopoeia. USA. 2013.
- ANVISA. **Maconha**: Anvisa não é contra uso para fins medicinais. Nota Técnica da Anvisa explica regulamentação do uso medicinal de derivados da maconha e a possibilidade de plantio de *Cannabis sativa*. 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3470896&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=anvisa-nao-e-contra-uso-para-fins-medicinais&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dcultivo%2Bde%2Bcannabis%2B%26_3_cur%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_formDate%3D1441824476958&inheritRedirect=true. Acesso em: 18 out. 2018
- APPENDINO, G. *et al.* Antibacterial Cannabinoids from Cannabis sativa: A Structure–Activity Study. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p.1427-1430, ago. 2008.
- ARAÚJO, A. L. A.; OHARA, M. T. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feiras de São Paulo e de infusos derivados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, n.1, p. 129-137, 2000.
- BICUDO, E. L. *et al.* Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 281-284. 2007.
- BLAKE, D. R. *et al.* Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 45, n. 1, p.50-52, jan. 2006.
- BRASIL. Conselho Federal de Medicina. Resolução **CFM Nº 2.113, de 16 de dezembro de 2014**. Aprova o uso compassivo do canabidiol para o tratamento de epilepsias da criança e do adolescente refratárias aos tratamentos convencionais. Disponível em: http://www.portalmédico.org.br/resolucoes/CFM/2014/2113_2014.pdf. Acesso em: 15 out. 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014.** (2014). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026_13_05_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703> Acesso em: 11/03/2019

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução RDC Nº 17, de 6 de maio de 2015.** (2015). Disponível em:
<http://www.saude.mt.gov.br/upload/noticia/1/arquivo/170615163439-SES-MT-A-rdc-anvisa-17-2015---importacao-cannabidiol.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução RDC Nº 143, de 17 de março de 2017.** Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. Disponível em: http://crf-pr.org.br/uploads/noticia/27816/Resolucao_RDC_143_2017_atualiza_controlados.pdf. Acesso em: 15 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução RDC Nº 156, de 5 de maio de 2017.** Dispõe sobre a alteração das Resoluções da Diretoria Colegiada - RDC nº 64/2012, nº 29/2013, nº 42/2014, nº 01/2015, nº 11/2015, nº 71/2016 e nº 104/2016, para a inclusão, alteração e exclusão de Denominações Comuns Brasileiras – DCB, na lista completa das DCB da Anvisa. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_156_2017_.pdf/8513f1a8-8f85-436a-a48c-1ae3e4c6556b. Acesso em: 16 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria Nº 344, de 12 de maio de 1988.** Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html. Acesso em: 16 out. 2018.

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; NAKAMURA, T. C.; PEREIRA, C. T.; MATOS, D.; PINTO, A. J. T. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 4, p. 491-497, 2005.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p.223-230, may, 2008.

CAMPOS-CASTELLO, J. *et al.* Síndrome de rett: 50 años de historia de um trastorno aun no bienconocido. **Actualizaciones En Neurologia Infantil**, Buenos Aires, v. 67, n. 6/1, p.531-542, 2007.

CARVALHO, V. M. Farmacocannabis-UFRJ: The first laboratory in Brazil to analyze therapeutic products derived from Cannabis. **Br. J. Anal. Chem.**, v. 4, n. 16, p. 44-49, 2017.

CARVALHO, V. M. *et al.* Mães pela cannabis medicinal em um Brasil aterrorizado entre luzes e fantasmas. **Forum sociológico**, n. 30, p. 57-66, 2017.

COSTA, T. M. *et al.* Características clínicas e Esquema de Tratamento medicamentoso de Infecções por *Staphylococcus aureus*: uma possível proposta de identificação para o laboratorista e tratamento para o clínico. **Revista práxis**, v. 3, n. 5, 2011.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 1 v.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Segundo suplemento. Brasília: ANVISA, 2017. 1 v.

FISK, I. D. *et al.* Gamma-irradiation as a method of microbiological control, and its impact on the oxidative labile lipid component of *Cannabis sativa* and *Helianthus annuus*. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 4, p. 613-621, fev. 2009.

FOGAÇA, M. V. *et al.* Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. **European Neuropsychopharmacology**. Ribeirão Preto, p. 410-419. jan. 2014.

FORSYTHE, S. Microbial Source Tracking of *Cronobacter* spp. **Advances in Applied Microbiology**, v. 103, p. 49-101, 2018.

HAZEKAMP, A. An evaluation of the quality of medicinal grade cannabis in the Netherlands. **Cannabinoids**, v. 1, n. 1, p. 1-9. 2006

HUSSAIN, S. A. *et al.* Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for treatment of pediatric epilepsy: A potential role for infantile spasms and Lennox-Gastaut syndrome. **Epilepsy&Behavior**. Los Angeles, p. 138-141. apr. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3210.009**: verificação da capacidade inibitória de produtos não estéreis do departamento de microbiologia. Rev. 20. Rio de Janeiro, 2018. 10 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3)^a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3210.010**: contagem total de bactérias aeróbias, bile tolerantes, bolores e leveduras em produtos farmacêuticos e água para diálise. Rev. 20. Rio de Janeiro, 2018. 14 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3)^b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3210.008**: pesquisa de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise. Rev. 18. Rio de Janeiro, 2018. 48 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3)^c.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **PU 3210.102**: método de coloração de Gram. Rev. 5. Rio de Janeiro, 2016. 5 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

IUVONE, T. *et al.* Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on b-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, p. 134-141. 2004.

IVERSEN, C. *et al.* The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 1471-2148. apr. 2007.

JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M. A. **Manual of clinical microbiology**. 11.ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology, 2015.

LEWEKE, F. M.; KOETHE, D. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. **Addiction Biology**, v. 13, n. 2, p.264-275, jun. 2008.

LIN, Y. C. *et al.* Clinical characteristics and risk factors for attributable mortality in *Enterobacter cloacae* bacteremia. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 39, p. 67-72, 2006.

MARINHO, A. L. Z. *et al.* Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: Contribution of 5HT1A receptors and stressful experiences. **Behavioural Brain Research**, v. 286, p. 49-56, 2015.

MCHARDY, I. *et al.* Infectious risks associated with medicinal Cannabis: Potential implications for immunocompromised patients? **Journal of Infection**, v. 76, n. 5, p. 500-501, 2018.

MECHOULAM, R. *et al.* Cannabidiol – Recent Advances. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 1678-1692, mar. 2007.

MECHOULAM, R. *et al.* Chemical Basis of Hashish Activity. **Science**, v. 169, n. 3945, p.611-612, ago. 1970.

MECHOULAM, R.; PANIKASHVILI, D.; SHOHAMI, E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. **TRENDS in Molecular Medicine**, Jerusalem, Israel, v.8, n. 2, p. 58-61, fev. 2002.

MECHOULAM, R.; SHVO Y. Hashish: The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, Rehovoth, Israel, v. 19, p. 2073-2078, maio 1963.

MEVATYLFARM. RESP. **Bula de remédio**. São Paulo, SP: BeaufourIpsen Farmacêutica Ltda., 2017.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* — the “accidental” pathogen. **Nature Reviews Microbiology**. v. 7, p. 555-567, aug. 2009.

PÉREZ, A. B.; MORENO, N. Síndrome de Dravet. **Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud.**, Venezuela. v. 19, n. 3, p. 27-30, dez. 2015.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: D9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and D9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, Aberdeen, Reino Unido. v. 153, p. 199-215, 2008.

PORTER, B. E.; JACOBSON, C. Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 29, n. 3, p.574-577, dez. 2013.

ROBSON, P. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, p. 107-115, 2001.

ROG, D. J. et al. Randomized, controlled Trial of cannabis based medicine in central pain in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 65, p. 812-819. 2005.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, maio 2010.

SZAFLARSKI, J. P.; BEBIN, E. M. Cannabis, cannabidiol and epilepsy – From receptors to clinical response. **Epilepsy&Behavior**, Alabama, EUA. v. 41, p. 277-282. 2014.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, 2017.

WHITING, P. F. *et al.* Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. **Jama**, v. 313, n. 24, p. 2456-2473. jun. 2015.

YAMAMOTO, H. C.; PINTO, A. J. T.; MEURER, M. V.; CARVALHO, M. A.; REZENDE, P. Controle de qualidade microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na zona da mata, MG. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2., 2004, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG: UFMG, 2004.

ZHI, Y. *et al.* Characterization of the Relationship of CDKL5 with MeCP2 and Dnmt1 in Primary Rat Cortical Neurons. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-9. jan. 2016.

ZUARDI, A. W. *et al.* Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. São Paulo. v. 39, p. 421-429. 2006.

ZUARDI, A. W. *et al.* Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 8, p. 979–983. 2009.