

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

Taline Ramos Conde

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATO  
DE *Cannabis sativa* UTILIZADO POR FAMÍLIA BRASILEIRA COMO TERAPIA  
NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇA COM EPILEPSIA  
REFRATÁRIA**

Rio de Janeiro

2021

Taline Ramos Conde

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATO  
DE *Cannabis sativa* UTILIZADO POR FAMÍLIA BRASILEIRA COMO TERAPIA  
NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇA COM EPILEPSIA  
REFRATÁRIA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Helena Pereira da Silva Zamith  
Colaboradora: Dra. Virgínia Martins Carvalho

Rio de Janeiro

2021

Conde, Taline Ramos

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATO DE *Cannabis sativa* UTILIZADO POR FAMÍLIA BRASILEIRA COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇA COM EPILEPSIA REFRATÁRIA. / Taline Ramos Conde. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

179 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith.

1. Genotoxicidade. 2. Mutagenicidade. 3. *Cannabis sativa* / Canabidiol. 4. Ensaio Cometa *in vitro*. 5. Ensaio de micronúcleo *in vitro*. I. Título.

*In vitro* cytotoxicity and genotoxicity evaluation of *Cannabis sativa* extract used by Brazilian family as a therapy in the control of seizures in children with refractory epilepsy

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.”

Taline Ramos Conde

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATO  
DE *Cannabis sativa* UTILIZADO POR FAMÍLIA BRASILEIRA COMO TERAPIA  
NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA  
REFRATÁRIA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 30 / 09 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Maritse Gerth Silveira (Doutora)  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

---

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Virgínia Martins Carvalho (Doutora) - Colaboradora  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho às crianças: aos meus filhos, Catarina e Bernardo, por quem tento melhorar e evoluir a cada dia; e a todas as crianças portadoras de epilepsia refratária que necessitam do canabidiol.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por me dar força e sabedoria, permitindo chegar até aqui.

A minha família por todo apoio e cuidados. Aos meus pais por toda ajuda nos cuidados com meus filhos e minha casa. Ao meu marido por todo companheirismo e incentivo de sempre. Aos meus filhos pelas alegrias, à Catarina pela compreensão nos momentos da minha ausência, e ao Bernardo por chegar de surpresa nesse período turbulento.

A minha orientadora, Dra Helena Zamith, por seus ensinamentos, pela paciência, dedicação, incentivo, e por acreditar em mim.

À Dra Virgínia Carvalho pela colaboração, por fornecer o extrato e por toda ajuda. E também à família cadastrada no projeto Farmacannabis que aceitou doar um pouco do extrato para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade para avaliar o meu trabalho. Em especial a Dra Shirley por revisar a minha dissertação.

Ao meu chefe, Fabio Amendoeira, por permitir o meu ingresso no mestrado, pela disponibilidade para participar da banca, e ainda por me confiar responsabilidades com as quais pude perceber que a minha capacidade é maior do que eu acredito.

Aos meus amigos do DFT, Ronald, Renata Medeiros, Magno, Roseli, pela ajuda e cada palavra de incentivo. À Fernanda, também pela companhia e por cada docinho que ganhei para alegrar minhas tardes. Em especial à Renata Calil, incansável me ajudando em toda a parte experimental (“Bora!”), foi meu braço direito, esquerdo, e ainda meus olhinhos quando precisei (“Deixaaa!”). E ainda, Ludmila e Deise, quem dividiram comigo a bancada nos experimentos do doutorado.

Aos doadores voluntários, por cada tubinho de sangue, que foram essenciais para a realização dos meus ensaios.

Ao INCQS pela oportunidade de obter esse título e pelo apoio financeiro.

À CPG por toda ajuda sempre que precisei.

Aos meus colegas de turma (VISA 2019) pelos momentos compartilhados.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

A esperança tem duas filhas lindas, a indignação e a coragem; a indignação nos ensina a não aceitar as coisas como estão; a coragem, a mudá-las.

Santo Agostinho

## RESUMO

Derivados canabinóides extraídos da *Cannabis sativa* L., principalmente o canabidiol (CBD), têm demonstrado eficácia no tratamento de epilepsia grave e na diminuição das crises convulsivas em pacientes epiléticos refratários ao tratamento convencional. O uso medicinal de CBD e de  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) é regulamentado em diversos países sendo usados como princípios ativos de medicamentos. No Brasil, em 2016, através da RDC 66/2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária autorizou a importação para uso médico pessoal, de *C. sativa* L, de partes da planta e de extratos contendo CBD e THC. Visando a segurança do paciente e devido ao uso pretendido prolongado, o objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* de extrato de *C. sativa* em triglicerídeo de cadeia média (TCM). O extrato, com 25 mg/mL de CBD e 1 mg/mL de THC, foi preparado e padronizado pelo Laboratório de Análises Toxicológicas da UFRJ e utilizado por criança de uma família brasileira no controle de convulsões com epilepsia refratária. O ensaio Cometa (EC) e o ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) em células de sangue total humano (CSTH) *in vitro*, foram realizados na ausência e na presença de mistura S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254. No EC, o tratamento das CSTH com o veículo TCM (1,3 a 20%) e com extrato de *C. sativa* (CBD 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL) na ausência de S9 não induziu dano significativo ao DNA ( $p > 0,05$ ) quando comparadas aos controles celular e veículo TCM correspondente, respectivamente. O extrato de *C. sativa* (CBD 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL) na presença de S9 induziu dano significativo ao DNA ( $p < 0,05$ ) em CSTH nas concentrações de CBD 1,0 e 2,0 mg/mL testadas quando comparadas ao controle solvente TCM correspondente com S9. No EMnBC, o tratamento com o extrato de *C. sativa* (CBD 0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL) e TCM (2,5 a 20%), na presença e ausência de mistura S9, não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em linfócitos humanos. Logo, concluiu-se que o extrato de *C. sativa* em TCM, nas 5 concentrações de CBD testadas, foi considerado não mutagênico em CSTH não induzindo efeitos clastogênico e/ou aneugênico em linfócitos humanos, na presença e ausência da mistura S9.

Palavras-chave: Genotoxicidade. Mutagenicidade. *Cannabis sativa*. Canabidiol. Epilepsia. Ensaio Cometa *in vitro*. Ensaio de micronúcleo *in vitro*.



## ABSTRACT

Cannabinoid derivatives extracted from *Cannabis sativa* L., mainly cannabidiol (CBD), have shown efficacy in the treatment of severe epilepsy and in the reduction of seizures in epileptic patients refractory to conventional treatment. The medicinal use of CBD and  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol (THC) is regulated in several countries and used as active ingredients in medicines. In Brazil, in 2016, through RDC 66/2016, the Brazilian National Health Surveillance Agency authorized the importation for personal medical use of *C. sativa* L, plant parts and extracts containing CBD and THC. Taking into account the patient safety and due to prolonged intended use, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of *C. sativa* extract on medium chain triglyceride (MCT). The extract, with 25 mg/mL of CBD and 1 mg/mL of THC, was prepared and standardized by the Toxicological Analysis Laboratory of UFRJ and used by a child of a Brazilian family to control seizures with refractory epilepsy. The *in vitro* Comet assay (CA) and the *in vitro* cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in whole human blood cells (WHBC) were performed in the absence and presence of Arochlor 1254-induced rat liver S9 mixture. In the CA, treatment of WHBC with MCT vehicle (1.3 to 20%) and with *C. sativa* extract (CBD 0.3; 1.0; 2.0 and 5.0 mg/mL) in the absence of S9 did not induce significant DNA damage ( $p > 0.05$ ) when compared to the untreated and corresponding MCT vehicle-controls, respectively. The extract of *C. sativa* (CBD 0.3; 1.0; 2.0 and 5.0 mg/mL) in the presence of S9 induced significant DNA damage ( $p < 0.05$ ) in WHBC at the concentrations of CBD 1.0 and 2.0 mg/mL tested when compared to the corresponding TCM solvent control with S9. In the CBMN assay, treatment with *C. sativa* extract (CBD 0.3; 0.6; 1.3; 2.5 and 5.0 mg/mL) and MCT (2.5 to 20%), in the presence and absence of S9 mixture, did not induce chromosomal breaks and/or chromosome gain or loss in human lymphocytes. Therefore, it was concluded that the extract of *C. sativa* in TCM, in the 5 concentrations of CBD tested, was considered non-mutagenic in WHBC not inducing clastogenic and/or aneugenic effects in human lymphocytes, in the presence and absence of the S9 mixture.

Keywords: Genotoxicity. Mutagenicity. *Cannabis sativa*. Cannabidiol. Epilepsy. *In vitro*. Comet assay. *In vitro* micronucleus assay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Drogas anticonvulsivantes de primeira e segunda escolhas no tratamento da epilepsia .....	18
Quadro 2 – Principais efeitos adversos relacionados aos medicamentos antiepilépticos .....	19
Figura 1 – Principais canabinóides presentes na planta <i>Cannabis sativa</i> .....	22
Quadro 3 – Diluições dos extratos de <i>C. sativa</i> em TCM e do TCM em sangue total humano heparinizado para obtenção das concentrações finais em CBD (C <sub>f</sub> 1 a C <sub>f</sub> 4) no ensaio Cometa <i>in vitro</i> sob condições alcalinas .....	49
Quadro 4 – Diluições dos extratos de <i>C. sativa</i> em TCM no protocolo de tratamento em sangue total humano heparinizado para obtenção das concentrações finais em CDB (C <sub>f</sub> 1 a C <sub>f</sub> 5) no EMnBC .....	49
Figura 2 – Esquema da realização das etapas do ensaio Cometa .....	54
Figura 3 – Fotomicrografias de diferentes classes de danos ao DNA em células sanguíneas humanas .....	55
Figura 4 – Esquema da realização das etapas do ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio da citocinese .....	57
Figura 5 – Célula binucleada de linfócito humano com a presença de um micronúcleo no citoplasma .....	58
Figura 6 – Efeito do TCM na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> sem ativação metabólica .....	62
Figura 7 – Efeito do TCM e do extrato de <i>Cannabis sativa</i> na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> na ausência de ativação metabólica .....	65
Figura 8 – Efeito do TCM e do extrato de <i>Cannabis sativa</i> na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> na presença de ativação metabólica .....	69
Figura 9 – Efeito do TCM e do extrato de <i>Cannabis sativa</i> na frequência de formação de micronúcleos no ensaio <i>in vitro</i> de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) em células sanguíneas humanas na ausência de ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados .....	75

Figura 10 – Efeito do TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na frequência de formação de micronúcleos no ensaio *in vitro* de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) em células sanguíneas humanas *in vitro* na presença de ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados ..... 84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citotoxicidade do veículo triglicérides de cadeia média (TCM) em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios DAF/BrEt realizados ..... 60

Tabela 2 – Ensaio Cometa do veículo TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Dano ao DNA em valores médios  $\pm$  erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios independentemente realizados ..... 61

Tabela 3 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 3 ensaios DAF/BrEt realizados ..... 63

Tabela 4 – Ensaio Cometa do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Dano ao DNA em valores médios de Unidades Arbitrárias Totais (UAT)  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Combinação dos resultados dos 3 ensaios independentemente realizados ..... 64

Tabela 5 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Combinação dos resultados dos 3 ensaios DAF/BrEt realizados ..... 66

Tabela 6 – Ensaio Cometa do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios  $\pm$  erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 3 ensaios realizados ..... 68

Tabela 7 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-02) do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas sem ativação metabólica ..... 71

Tabela 8 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-03) do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas

humanas na ausência de ativação metabólica ..... 73

Tabela 9 – Ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....75

Tabela 10 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-05) do extrato de *Cannabis sativa* na presença de ativação metabólica em células sanguíneas humanas ..... 79

Tabela 11 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-06) do extrato de *Cannabis sativa* na presença de ativação metabólica em células sanguíneas humanas ..... 81

Tabela 12 – Ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na presença de ativação metabólica em células sanguíneas humanas *in vitro*. Combinação dos resultados dos 2 EMnBC realizados ..... 83

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AFB – Aflatoxina B<sub>1</sub>
- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- $\beta$ -NADP –  *$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (fosfato de dinucleotídeo de  $\beta$ -nicotinamida-adenina)
- BaP – Benzo-a-pireno
- BrEt – Brometo de etídio
- CBD – Canabidiol
- CBDA – Ácido canabidiólico
- CC-B – Citocalasina B
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CFM – Conselho Federal de Medicina
- C<sub>f</sub> – Concentração final no tratamento
- C<sub>i</sub> – Concentração inicial do extrato
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COL – Colcemid®
- CP – Consulta pública da ANVISA
- Cp – Controle positivo
- CP – Ciclofosfamida
- Cs – Controle solvente
- CSTH – Células de sangue total humano
- DAF – Diacetato de fluoresceína
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EC – Ensaio Cometa
- EEG – Eletroencefalograma
- EMA – *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicamentos)
- EMnBC – Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese
- EMS – Metanosulfonato de etila
- EPM – Erro padrão da média
- EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration* (Agência Norte Americana de Drogas e Alimentos)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HEPES – *4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid* (ácido 4-(2-hidroxietil) - 1 piperazina etanosulfônico)

HMPC – *Herbal Medicinal Products Committee* (Comitê de Produtos Medicinais à base de plantas da EMA)

ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano)

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IR – Índice de replicação

LATox– Laboratório de Análises Toxicológicas

MMC – Mitomicina C

MMS – Metanossulfonato de metila

Mn – Micronúcleo

NCI – *National Cancer Institute* – (Instituto Nacional do Câncer Norte Americano)

Notivisa – Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária

OECD – *Organization for Economic Co-Operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PHA – Fitohemaglutinina A

POP – Procedimento Operacional Padronizado

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada (da ANVISA)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*. Meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*

SCGE– *Single Cell Gel Electrophoresis*

SFB – Soro Fetal Bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TCM – Triglicerídeos de Cadeia Média

THC – Tetrahydrocannabinol

THCA – Ácido tetrahydrocannabinólico

UA – Unidades Arbitrárias

UAT – Unidades Arbitrárias Totais

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Epilepsia.....	16
1.2 Tratamento da epilepsia .....	17
1.3 A planta <i>Cannabis sativa</i> .....	21
1.4 Uso medicinal de derivados da <i>Cannabis sativa</i> .....	27
1.5 Aspectos regulatórios quanto ao uso medicinal de derivados de <i>Cannabis sativa</i> .....	31
1.6 Toxicologia pré-clínica: importância dos ensaios de genotoxicidade .....	35
1.7 Justificativa.....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
2.1 Objetivo Geral.....	47
2.2 Objetivos Específicos .....	47
<b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>48</b>
3.1 Metodologia .....	48
3.1.1 Amostra teste: extrato de <i>Cannabis sativa</i> .....	48
3.1.2 Participantes da pesquisa .....	51
3.1.3 Ensaios <i>in vitro</i> .....	52
3.1.3.1 <i>Preparo da Mistura S9</i> .....	52
3.1.3.2 <i>Ensaio Cometa in vitro</i> .....	52
3.1.3.3 <i>Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese</i> .....	57
3.2 Resultados .....	61
3.2.1 Ensaio Cometa (EC).....	61
3.2.1.1 <i>Citotoxicidade e ensaio Cometa do veículo TCM</i> .....	61
3.2.1.2 <i>Citotoxicidade e ensaio Cometa do extrato de Cannabis sativa sem ativação metabólica</i> .....	63
3.2.1.3 <i>Citotoxicidade e ensaio Cometa do extrato de Cannabis sativa com ativação metabólica</i> .....	66
3.2.2 Ensaio de Micronúcleo pelo Bloqueio da Citocinese (EMnBC) .....	71
3.2.2.1 <i>Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese sem ativação metabólica</i> .....	71
3.2.2.2 <i>Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese com ativação metabólica</i> .....	77



<b>3.3 Discussão</b> .....	86
3.3.1 Citotoxicidade e genotoxicidade do triglicerídeos de cadeia média (TCM) .....	86
3.3.2 Projeto Farmacocannabis .....	89
3.3.3 Citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> do extrato de <i>Cannabis sativa</i> .....	91
3.3.3.1 Citotoxicidade e ensaio Cometa do extrato de <i>C. sativa</i> na ausência e presença de mistura S9. ....	91
3.3.3.2 Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese na ausência e presença de mistura S9. ....	96
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>105</b>
<b>5 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>108</b>
<b>ANEXO 1 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE C. SATIVA</b> .....	<b>123</b>
<b>ANEXO 2 – COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO AO CEP/FIOCRUZ</b> .....	<b>124</b>
<b>ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....	<b>125</b>
<b>APÊNDICE A – CONVITE AOS PARTICIPANTES</b> .....	<b>133</b>
<b>APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>134</b>
<b>APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO COMO DOADOR</b> .....	<b>139</b>
<b>APÊNDICE D – PREPARO DE SOLUÇÕES EMPREGADAS NO ENSAIO COMETA</b> .....	<b>140</b>
<b>APÊNDICE E – PREPARO DE SOLUÇÕES EMPREGADAS NO ENSAIO DE MICRONÚCLEO <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>146</b>
<b>APÊNDICE F – PREPARO DA FRAÇÃO S9 E MISTURA S9</b> .....	<b>150</b>
<b>APÊNDICE G – RESULTADOS DOS ENSAIOS INDIVIDUAIS DE CITOTOXICIDADE E COMETA DO VEÍCULO TCM</b> .....	<b>154</b>
<b>APÊNDICE H – RESULTADOS DOS ENSAIOS INDIVIDUAIS DE CITOTOXICIDADE E COMETA DO EXTRATO DE <i>CANNABIS</i> SEM S9</b> .....	<b>157</b>
<b>APÊNDICE I – RESULTADOS DO ENSAIO PRELIMINAR PARA DEFINIÇÃO DO CONTROLE POSITIVO NOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E COMETA COM S9</b> ....	<b>162</b>
<b>APÊNDICE J – RESULTADOS DOS ENSAIOS INDIVIDUAIS DE CITOTOXICIDADE E COMETA DO EXTRATO DE <i>CANNABIS</i> COM S9</b> .....	<b>166</b>
<b>APÊNDICE K – RESULTADOS DO EMNBC-01 PRELIMINAR PARA DEFINIÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS E CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE TCM NA AUSÊNCIA DE ATIVAÇÃO METABÓLICA</b> .....	<b>177</b>
<b>APÊNDICE L – RESULTADOS DO EMNBC-04 PRELIMINAR PARA DEFINIÇÃO DO CONTROLE POSITIVO EM CSTH NA PRESENÇA DE ATIVAÇÃO METABÓLICA (MISTURA S9)</b> .....	<b>179</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma doença neurológica crônica que resulta de um distúrbio nas funções cerebrais, envolvendo descargas elétricas anormais, excessivas e sincronizadas dos neurônios cerebrais. Sua causa pode estar ligada a processos patológicos ou síndromes, e tem como consequência crises epiléticas recorrentes associadas a diversos fatores etiológicos. Além disso, é definida pela ocorrência de duas ou mais crises epiléticas não provocadas no período de 12 meses, ou seja, sem a ocorrência de algum evento agudo evidente, como febre alta, níveis elevados de álcool, intoxicação por drogas ou crise de abstinência (FONSECA *et al.*, 2016; LIBERALESSO, 2018; RENARDIN *et al.*, 2019).

Esta doença consiste no transtorno neurológico sério mais frequente, sendo considerado o segundo de ocorrência entre adultos jovens, atrás apenas da enxaqueca. Atinge mais de 50 milhões de pessoas no mundo, cerca de 40 milhões em países em desenvolvimento. Pessoas de diferentes etnias, sexos, condições socioeconômicas e regiões podem ser acometidas, sofrendo consequências profundas, incluindo morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais. Estudos estimam, como prevalência, que aproximadamente 1% da população mundial é acometida pela epilepsia (GARZON, 2002; GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005, CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017; MATOS *et al.*, 2017; ALMEIDA PEREIRA *et al.*, 2018).

Também à epilepsia se associam problemas sociais e econômicos. Pode ser considerado um problema relevante de saúde pública, objeto de muito debate. Ocorre em cerca de 1% da população mundial. Estudos baseados em comunidades e em populações selecionadas revelam que indivíduos com epilepsia podem apresentar uma incidência de mortalidade duas a três vezes superior quando comparadas ao restante da população (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005; FONSECA *et al.*, 2016).

No Brasil, não há dados confiáveis a respeito da incidência e prevalência da epilepsia, devido à alta variabilidade entre as diferentes regiões do país. Cerca de 2 a 3% das pessoas terão diagnóstico de epilepsia em algum momento da vida. Segundo estimativas do Ministério da Saúde, são diagnosticados cerca de 157.070

casos novos de epilepsia a cada ano no país. Com isso, a prevalência de epilepsia estimada no Brasil varia entre 10 a 15/1000 indivíduos (ALMEIDA PEREIRA *et al.*, 2018; LIBERALESSO, 2018).

Segundo Renardin e colaboradores (2019), essa condição neurológica surge principalmente durante a primeira infância, tendo impacto durante todo o desenvolvimento do indivíduo, devido à manifestação ou experiência desta condição e em decorrência das necessidades específicas de apoio, além da respectiva influência sobre a dinâmica familiar. As crianças são as mais afetadas apresentando prevalência de aproximadamente 5/1000, e maior frequência na faixa etária de 0 a 9 anos de idade. Acredita-se que isso pode ser devido ao sistema nervoso infantil ainda estar imaturo, com poucas reações inibitórias das sinapses. Além disso, nessa fase, as crianças estão mais sujeitas às infecções acompanhadas de hipertermia e distúrbios hidroeletrólíticos, fazendo com que seja um grupo mais suscetível à epilepsia (FONSECA *et al.*, 2016).

## **1.2 Tratamento da epilepsia**

A ocorrência de crises epiléticas pode prejudicar a qualidade de vida dos indivíduos, causando danos cerebrais, principalmente quando ocorrer durante o seu desenvolvimento. Não existe cura para a epilepsia, nem tratamentos que possam prevenir o desenvolvimento da doença, existem apenas terapias que tratam os sintomas da epilepsia, como convulsões. Assim, o tratamento da epilepsia consiste na melhoria da qualidade de vida para o paciente, através do uso de fármacos, causando o mínimo possível de efeitos adversos na dose empregada para o controle das crises convulsivas, pois quando não são tratadas adequadamente podem levar a um aumento da frequência de repetição das crises. Os medicamentos anticonvulsivantes disponíveis são apropriados para o controle de repetição dessas crises. Adicionalmente, as crises epiléticas mal controladas podem acarretar danos físicos, cognitivos, psicológicos e sociais para os indivíduos (ALVARENGA *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2017; BRASIL, 2018a; FARRELLY; VLACHOU; GRINTZALIS, 2021).

Atualmente, cerca de 20 drogas com propriedades anticonvulsivantes estão disponíveis, mas associadas a diversos efeitos colaterais e a um alto custo financeiro (ALVARENGA *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2016; CARVALHO; BRITO;

GANDRA, 2017; ALMEIDA PEREIRA *et al.*, 2018). O tratamento efetivo depende da identificação dos tipos de crises e da escolha do fármaco apropriado, avaliando-se os benefícios clínicos e os potenciais efeitos colaterais. O diagnóstico de epilepsia deve ser feito inicialmente pela identificação do tipo de crise apresentada, pelas manifestações clínicas e pelo registro da atividade elétrica cerebral através do eletroencefalograma (EEG). As crises epiléticas podem ser classificadas como generalizadas (crises tônico-clônicas, tônicas, clônicas, atônicas, mioclônicas e com ou sem perda de consciência) ou focais. As crises generalizadas têm origem em algum ponto da rede neural que é capaz de recrutar rapidamente outras redes bilaterais. As crises epiléticas focais iniciam-se de forma localizada numa área específica do cérebro e suas manifestações clínicas dependem do local de início e propagação da descarga epileptogênica para outras áreas. As crises de início focal podem ser subdivididas considerando a alteração ou não da consciência durante a crise (percepção dos eventos por parte do indivíduo) e tipo de manifestação da crise (motoras e não motoras). O Quadro 1 exemplifica as principais drogas anticonvulsivantes de primeira e segunda escolhas no tratamento da epilepsia em relação aos tipos de crise epilética (YACUBIAN, 2002; BRASIL, 2018a).

Quadro 1 – Drogas anticonvulsivantes de primeira e segunda escolhas no tratamento da epilepsia

	Crises focais	Crises generalizadas			
		Tônico-clônicas	Ausências	Mioclônicas	Atônicas/tônicas
<b>Drogas de primeira escolha</b>	Carbamazepina Fenitoína	Carbamazepina Fenitoína Valproato	Etossuximida Valproato	Valproato Clonazepan	Valproato
<b>Drogas de segunda escolha</b>	Valproato Fenobarbital Topiramato Lamotrigina Vigabatrina Gabapentina	Fenobarbital Lamotrigina Topiramato	Clonazepan Lamotrigina Topiramato	Fenobarbital Lamotrigina Topiramato	Clonazepan Nitrazepan Topiramato Lamotrigina

Fonte: (YACUBIAN, 2002)

A opção pelo tratamento antiepilético deve ser baseada em três critérios, tais como: risco de recorrência de crises, consequências da continuação das crises para o paciente, a eficácia e os efeitos adversos causados pelo fármaco escolhido para o tratamento. O risco de recorrência de crises pode variar de acordo com o tipo de crise e com a síndrome epilética do paciente. A decisão de iniciar o tratamento é fortalecida após a ocorrência de duas ou mais crises epiléticas não provocadas

com intervalo superior a 24 horas. A escolha do fármaco deverá considerar outros fatores além da eficácia, como efeitos adversos, especialmente para alguns grupos de pacientes, como crianças, mulheres em idade reprodutiva, gestantes e idosos, a tolerabilidade individual e facilidade de administração. As recomendações, baseadas em evidências de eficácia e efetividade para a escolha de fármacos antiepilépticos, são as seguintes:

- Adultos com epilepsia focal: carbamazepina, fenitoína e ácido valpróico;
- Crianças com epilepsia focal: carbamazepina;
- Idosos com epilepsia focal: lamotrigina e gabapentina;

O Quadro 2 enumera os principais efeitos adversos relatados para cada tipo de medicamento antiepiléptico (BRASIL, 2018a).

Quadro 2 – Principais efeitos adversos relacionados aos medicamentos antiepilépticos

<b>Tipo de medicamento antiepiléptico</b>	<b>Principais efeitos adversos relatados</b>
Ácido valpróico/valproato de sódio	sonolência, cansaço, tremor, alterações da função do fígado, diminuição das plaquetas, ganho de peso, queda de cabelos
Carbamazepina	vermelhidão da pele, sonolência, ganho de peso, diarreia, náusea, vômitos, problemas para caminhar, mudanças de humor, tremor, transtorno de memória, visão dupla e impotência
Clobazam	sonolência, transtornos de memória e de comportamento, perda progressiva do efeito terapêutico
Clonazepan	sonolência, hiperatividade (em crianças), transtornos cognitivos, sialorréia, diplopia, fadiga e depressão (em adultos)
Etossuximida	diarreia, náusea, vômitos, sonolência, perda de peso, dor de cabeça
Fenitoína	incoordenação, sonolência, aumento do volume e sangramento das gengivas, crescimento de pelos no corpo e na face
Fenobarbital	tontura, sonolência, depressão, mudança no comportamento, transtornos de memória e de concentração, hiperatividade em crianças
Gabapentina:	aumento do apetite, ganho de peso, tontura, incoordenação, dor de cabeça, tremor, cansaço, náusea, comportamento agressivo (em crianças)
Lamotrigina	dor de cabeça, náusea, vômitos, visão dupla, tonturas, incoordenação e tremor
Levetiracetam	tontura, sonolência, desânimo, cansaço e dor de cabeça
Primidona	semelhantes aos do fenobarbital
Topiramato	sonolência, perda do apetite, cansaço, nervosismo, pensamento lento, dificuldade de encontrar palavras, dificuldade de concentração, perda de peso, cálculo renal e glaucoma
Vigabatrina	defeitos do campo visual, sonolência, dor de cabeça, tontura, incoordenação, transtornos de memória e comportamento, ganho de peso e tremor

Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2018a)

O tratamento com as drogas antiepilépticas não deve ser muito longo em crianças. Há evidências que indicam um prazo de, pelo menos, 2 anos sem crises antes da retirada do fármaco antiepiléptico em crianças, principalmente se o paciente tiver crises focais ou EEG anormal. Após esse período, com crises controladas, a chance de continuar sem crises foi de 70%. Os principais fatores preditivos para recorrência de crises foram crises focais, disfunção neurológica, etiologia sintomática remota e alterações no EEG (YACUBIAN, 2002; BRASIL, 2018a).

Estima-se que apenas 25% dos indivíduos epiléticos no mundo tenham acesso aos fármacos convencionais. Desses, cerca de 75% dos pacientes apresentam êxito no tratamento adequado com fármacos antiepilépticos, mas há indivíduos que continuam apresentando crises e não tem um controle satisfatório com a terapia medicamentosa. A resistência ao tratamento farmacológico é denominada epilepsia refratária ou fármaco-resistente, e equivale à falha na tentativa apropriada de escolha de drogas antiepilépticas, em monoterapia ou terapias combinadas, para o controle de crises convulsivas. As epilepsias refratárias ou de difícil controle correspondem a cerca de 20% a 30% dos pacientes epiléticos, uma vez que as crises são persistentes mesmo com o tratamento com fármacos antiepilépticos potencialmente eficazes (ALVARENGA *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2016; CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017; MATOS *et al.*, 2017; ALMEIDA PEREIRA *et al.*, 2018). Entre as crianças brasileiras, de 0 a 17 anos, as estimativas para a incidência de epilepsia variam muito, de 41 a 187/100.000 crianças/ano. (SERRA-PINHEIRO *et al.*, 2021).

Apesar da constante busca por novos medicamentos antiepilépticos na tentativa de melhorar o perfil de segurança dos tratamentos, as taxas de resistência aos fármacos permanecem inalteradas. Assim, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da epilepsia, principalmente para pacientes refratários aos tratamentos disponíveis (MATOS *et al.*, 2017). Nesse sentido, a ciência tem voltado à atenção para plantas com efeitos farmacológicos comprovados, como a *Cannabis sativa* (SANTOS; SCHERF; MENDES, 2019).

Estudos com base nos derivados canabinóides da *C. sativa* mostram-se promissores, sendo o canabidiol (CBD) eficaz no tratamento de epilepsia grave. O CBD foi eficaz em sua capacidade de reduzir a frequência das crises convulsivas, além de reduzir significativamente as convulsões específicas na síndrome de

Lennox-Gastaut (FARRELLY; VLACHOU; GRINTZALIS, 2021). Apesar do mecanismo de ação não estar completamente elucidado, o CBD diminui as crises convulsivas em pacientes epiléticos refratários, previne danos cerebrais irreversíveis e impede efeitos retroativos de desenvolvimento individual. A segurança a longo prazo, as propriedades farmacocinéticas e as interações medicamentosas do CBD não estão ainda suficientemente esclarecidas, provavelmente devido à restrição legal à planta e aos seus derivados (GALLILY;YEKHTIN;HANUŠ, 2015; PAMPLONA; SILVA; COAN, 2018; VALIM BRIGANTE *et al.*, 2018, SILVA;SARAIVA, 2019). Segundo Patel e colaboradores (2021), o CBD no tratamento de epilepsias refratárias é considerada uma droga antiepilética eficaz, segura e bem tolerada para uso em longo prazo. Além disso, o CBD não perde eficácia em um período de tratamento superior a 3 anos (PATEL *et al.*, 2021).

O uso terapêutico do outro derivado canabinóide, THC como anticonvulsivante, tem sido limitado devido às suas propriedades psicoativas e à possibilidade de tolerância à droga, portanto a sua segurança a longo prazo é motivo de preocupação (BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020).

### 1.3 A planta *Cannabis sativa*

A planta *C. sativa*, popularmente conhecida como maconha, é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem e tem sido usada não só como droga de abuso, mas também com fins medicinais. Foi descrita pelos chineses, no Pen-Ts'ao Ching, a primeira farmacopéia conhecida no mundo, por volta de 2.700 a.C. No Brasil, no início do século XX, extratos de *Cannabis* eram comercializados para tratamento de transtornos mentais, como sedativos e hipnóticos. Porém, o uso medicinal começou a declinar devido ao seu efeito psicotrópico e ao aumento do uso recreativo (CARLINI, 2006; HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006; ZUARDI, 2006a; ZUARDI *et al.*, 2006b; CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010; MOREAU, 2014).

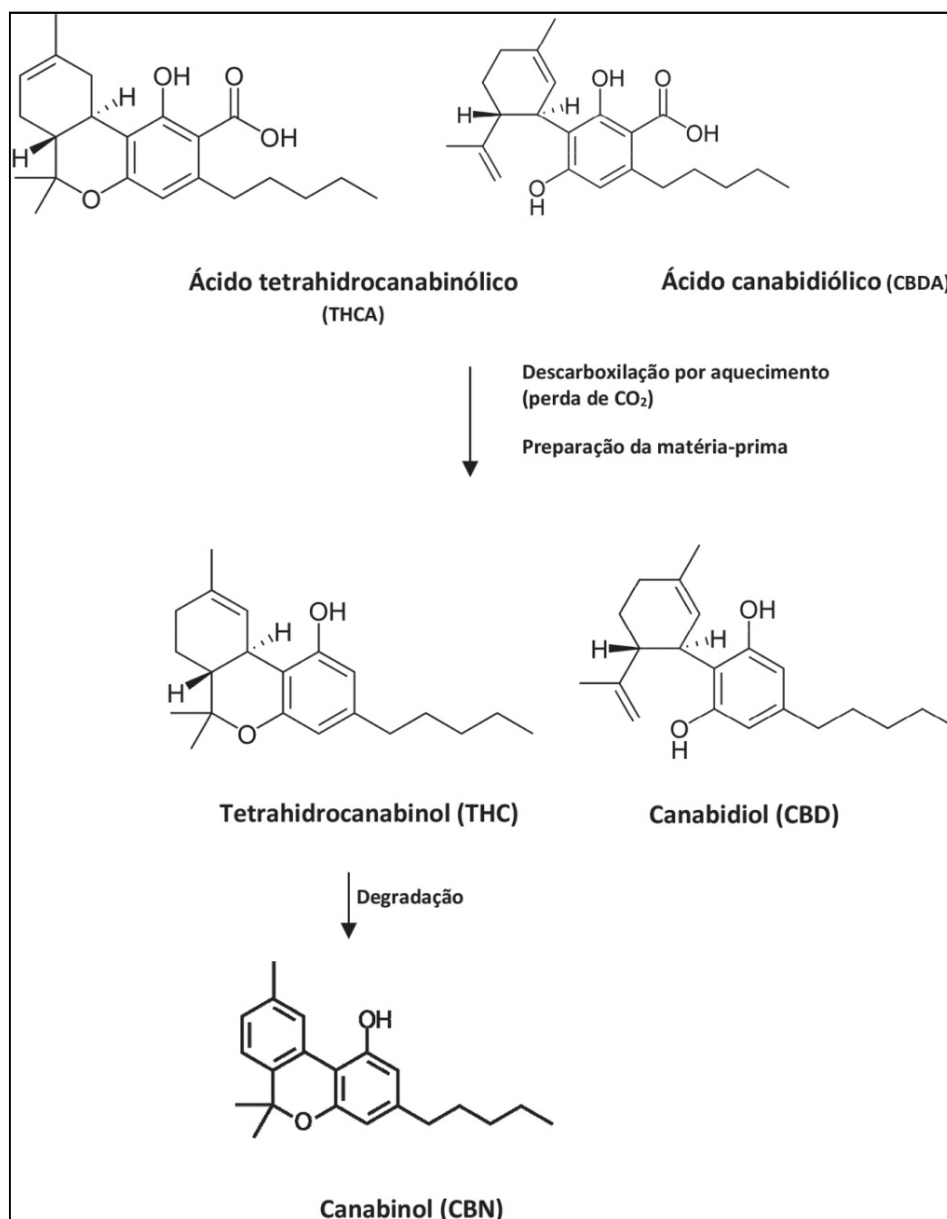
A *C. sativa* é uma planta da família *Moraceae* e contém centenas de substâncias químicas. Um número superior a 565 constituintes já foi identificado em *C. sativa*, incluindo no mínimo 120 canabinóides (ou fitocannabinóides) e 120 terpenos (IBRAHIM *et al.*, 2019; HARRIS *et al.*, 2019; ISEPPI *et al.*, 2019).

Os principais e mais abundantes canabinóides são o ácido tetrahydrocannabinólico (THCA) e ácido canabidiólico (CBDA). Esses ácidos, quando

aquecidos, são descarboxilados e convertidos as suas formas neutras, originando o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD). Essas substâncias apresentam efeitos farmacológicos paradoxais no Sistema Nervoso Central. O THC é psicoativo com propriedades euforizantes, enquanto o CBD é depressor com propriedades anticonvulsivante e ansiolítica. O THC também pode sofrer degradação térmica e ser convertido a canabinol (CBN) (CARVALHO, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020).

A Figura 1 abaixo ilustra os principais canabinóides presentes na *C. sativa*.

Figura 1 – Principais canabinóides presentes na planta *Cannabis sativa*.



Fonte: (CARVALHO *et al.*, 2020)



O isolamento e a identificação do CBD e THC, na década de 60, e a descoberta de que o efeito psicoativo da *C. sativa* está associado apenas ao THC, estimularam o interesse científico. Na década de 90, a descoberta de receptores específicos para canabinóides, CB-1 e CB-2, e de canabinóides endógenos no cérebro propiciaram muitas publicações na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) sobre o valor terapêutico da *C. sativa* (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006; ZUARDI *et al.*, 2006b; GALLILY; YEKHTIN; HANUŠ, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2019). O Sistema endocanabinóide modula a excitabilidade neuronal e tem se mostrado disfuncional em pacientes com epilepsia. Este sistema é composto por dois receptores, CB-1 e CB-2 que são ativados por canabinóides endógenos, como a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) quando há uma atividade neuronal excessiva (BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020). Os receptores CB-1 predominam no sistema nervoso central (SNC) e periférico e são menos ativos em outros tecidos, como baço, amígdalas, trato gastrintestinal, útero, próstata e glândulas adrenais. Os receptores CB-2 são encontrados principalmente no sistema imunológico e são de menor ocorrência no SNC e periférico e no trato gastrintestinal. Os receptores CB-1 estão envolvidos na regulação central da ingestão de alimentos, na resposta ao estresse, ao comportamento viciante, à regulação da atividade hepática e gastrintestinal, ao olfato e atividade cardiovascular. Diferentemente, os receptores CB-2 desempenham um papel no sistema imunológico, na regulação da neurodegeneração e, em menor grau, no processamento de recompensa e comportamento viciante (SCHAIQUEVICH *et al.*, 2020)

O CBD, componente não psicoativo da *C. sativa*, tem baixa afinidade pelos receptores CB-1 e CB-2. Suas propriedades anticonvulsivantes ocorrem através de vários mecanismos. O CBD atua indiretamente nos receptores CB-1, impedindo a degradação da anandamida, aumentando assim seus níveis no cérebro. Acredita-se que o CBD tenha ação indireta nos receptores canabinóides e suas ações são mediadas por efeitos agonistas e antagonistas em canais iônicos, transportadores de neurotransmissores e múltiplos receptores transmembrânicos. O THC, componente psicoativo da *C. sativa*, tem um efeito agonista parcial nos receptores CB-1 e CB-2. Os receptores CB-1 mediam o efeito anticonvulsivante do THC, enquanto o CBD não demonstrou ter um efeito semelhante (GASTON; SZAFLARSKI, 2018; BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020). O mecanismo antiepilético do CBD não foi totalmente elucidado mas aceita-se que seja mediado pela inibição

da neurotransmissão glutamatérgica excitatória, principalmente por meio de mecanismos independentes do receptor canabinóide (HAUSMAN-KEDEM; MENASCU; KRAMER, 2018).

O CBD é uma substância envolvida na modulação de diferentes receptores fora do sistema endocanabinóide, o que pode explicar suas propriedades antiepilépticas, anti-inflamatórias, analgésicas e ansiolíticas (SCHAIQUEVICH *et al.*, 2020). O CBD é capaz de modular alguns dos efeitos do THC, pois diminui os efeitos psicoativos do THC, aumentando sua tolerabilidade e potencializando seu alcance terapêutico. Além disso, o CBD pode neutralizar alguns dos efeitos psicoativos da ativação do CB-1 no cérebro, possivelmente por meio de um aumento indireto da atividade dos receptores A1 da adenosina. Isso pode explicar, pelo menos em parte, por que os usuários de preparações de *cannabis* com alta proporção de CBD/THC são menos propensos a desenvolver sintomas psicóticos do que aqueles que usam preparações nas quais essa proporção é baixa. Esses e outros mecanismos de ação do CBD podem contribuir para o "efeito *entourage*" entre CBD e THC e para a capacidade do CBD de reduzir os efeitos colaterais psicoativos do THC. Ao mesmo tempo, o CBD pode potencializar os efeitos anticonvulsivantes do THC (SCHAIQUEVICH *et al.*, 2020).

Enquanto o THC apresenta efeito psicoativo e desempenha um papel importante no uso abusivo da *C. sativa*, o CBD é um composto não psicomimético que tem potencial medicinal para vários distúrbios neuropsiquiátricos. Estudos têm identificado um potente efeito anticonvulsivante de canabinóides em animais, sendo o CBD eficaz no tratamento de epilepsia grave, apesar de seu mecanismo de ação não estar ainda bem compreendido (SURAEV *et al.*, 2018; VALIM BRIGANTE *et al.*, 2018). Tanto o THC como o CBD apresentam propriedades anticonvulsivantes em modelos *in vitro* e *in vivo*. Enquanto a maioria dos estudos sugere que o CBD tem um papel superior na redução da atividade epiléptica em comparação com o THC, o THC tem um maior potencial para o comprometimento do comportamento humano, incluindo a cognição e os distúrbios psiquiátricos crônicos (HAUSMAN-KEDEM; MENASCU; KRAMER, 2018). As propriedades psicoativas do THC limitaram seu uso clinicamente, devido a efeitos colaterais adversos, por isso há mais pesquisas explorando o uso terapêutico do CBD (BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020).

Além dos canabinóides, a *C. sativa* contém um grande número de substâncias monoterpênicas e sesquiterpênicas, conhecidas como terpenos, outra

classe química relevante. Os terpenos são os principais constituintes das resinas vegetais e óleos essenciais, e estão relacionados às propriedades farmacológicas de muitas plantas medicinais, incluindo a *C. sativa*. Os terpenos são produzidos ou secretados nas folhas e inflorescências da planta, juntamente com os canabinóides, e são responsáveis pelo cheiro característico da planta. Podem ser fontes de variáveis aromas, sabores e outras características que ajudam a diferenciar as variedades da planta. Os terpenos são óleos voláteis perfumados encontrados na resina da planta, alguns terpenos são relativamente bem conhecidos por seu potencial na biomedicina e têm sido usados na medicina tradicional, enquanto outros ainda precisam de mais estudos. As propriedades medicinais dos terpenos são baseadas em ensaios clínicos e em animais. Devido à baixa toxicidade, esses terpenos já são amplamente utilizados como aditivos alimentares e em produtos cosméticos. (BARON, 2018; NUUTINEN, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2019; HARRIS *et al.*, 2019, ISEPPI *et al.*, 2019; SANTIAGO *et al.*, 2019).

Há poucos estudos sobre a possível contribuição dos terpenos para a atividade da *C. sativa*. Suraev e colaboradores (2018) avaliaram a composição e uso de extratos de *C. sativa* em epilepsia infantil e identificaram a presença de 3 terpenos predominantes,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -mirceno e  $\alpha$ -pineno (SANTIAGO *et al.*, 2019). Acredita-se que o  $\beta$ -mirceno esteja associado aos efeitos sedativo, analgésico e relaxante muscular. O  $\alpha$ -pineno leva à melhoria do aprendizado e da memória por meio de sua ação anti-acetilcolinesterase, além de aumentar a motilidade gastrointestinal. O  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno são conhecidos por possuir atividades analgésicas e antiproliferativas; o  $\beta$ -cariofileno (2 mg/g) é responsável pelos efeitos anti-inflamatórios de algumas preparações da planta. O óxido de cariofileno já foi relatado como o componente responsável pela identificação da *C. sativa* por cães farejadores de drogas devido ao odor perfumado característico de terpenos (IBRAHIM *et al.*, 2019; ISEPPI *et al.*, 2019; SANTIAGO *et al.*, 2019).

Os terpenos são lipofílicos e tem locais de ação muito variáveis (BARON, 2018). Além disso, os terpenos podem melhorar algumas propriedades biológicas atribuídas aos canabinóides, devido à sua capacidade de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica e interagir com os receptores de neurotransmissores. Devido a esse efeito, foi possível o desenvolvimento de

patente, de um adesivo canabinóide transdérmico, com uso de terpeno como agente de permeação (BARON, 2018; ISEPPI *et al.*, 2019).

Assim, os componentes presentes na *C. sativa*, como os fitocanabinóides e terpenos, podem atuar de forma individual ou sinergicamente na indução dos diversos efeitos terapêuticos. Esse efeito é conhecido como *entourage* e consiste na idéia de que o uso de todos os componentes da planta pode exercer efeitos substancialmente maiores do que a soma de cada componente individual. O efeito *entourage* é considerado um atributo positivo da *C. sativa*, com a suposição de que as propriedades terapêuticas são superiores ou mais favoráveis, quando obtidas com o consumo de toda a planta, ao invés dos componentes individuais, como o THC ou somente do CBD. Gallily, Yekhtin e Hanuš (2015) relataram que o CBD na presença de outros constituintes em um extrato padronizado de *C. sativa* apresentou melhor relação dose-resposta e maior potência ou eficácia anti-inflamatória e antinociceptiva do que o CBD puro em camundongos. Esse efeito pode ser devido a interações aditivas ou sinérgicas entre o CBD e outros componentes presentes nos extratos. Muitas pesquisas têm sido conduzidas para isolar e caracterizar componentes da fitoterapia tradicional para usos terapêuticos. Adicionalmente, a sinergia terapêutica observada com extratos de planta resulta na necessidade de uma quantidade menor de componentes ativos e, conseqüentemente, efeitos adversos reduzidos. Na meta-análise realizada, Pamplona, Silva e Coan (2018) descrevem que houve mais relatos de melhora de pacientes tratados com extratos ricos em CBD (71%) do que pacientes tratados com CBD purificado (46%). Os pacientes tratados com extratos ricos em CBD relataram dose média efetiva mais baixa (6,0 mg/kg/dia) do que aqueles que usaram CBD purificado (25,3 mg/kg/dia). Além disso, os efeitos adversos foram mais frequentes em pacientes que receberam produtos contendo CBD purificado do que naqueles que foram tratados com extratos ricos em CBD (GALLILY; YEKHTIN; HANUŠ, 2015; BARON, 2018; PAMPLONA; SILVA; COAN, 2018; SANTIAGO *et al.*, 2019; BITENCOURT; TAKAHASHI; CARLINI, 2021). O extrato de *Cannabis* enriquecido com CBD tem um potencial efeito anticonvulsivante como tratamento complementar em pacientes pediátricos com epilepsia refratária tendo um perfil de segurança considerado favorável (HAUSMAN-KEDEM; MENASCU; KRAMER, 2018).

A partir do exposto acima, constata-se que, além da comprovação da propriedade terapêutica que é atribuída à *C. sativa*, principalmente, pela presença

dos canabinóides, CBD e THC, estudos adicionais são necessários para avaliação de efeitos dos extratos da planta no desenvolvimento cerebral e seu potencial teratogênico. Especial atenção deverá ser também direcionada aos terpenos nas preparações da *C. sativa* devido à expressiva presença deste grupo de substâncias nos extratos da planta, e por sua capacidade de penetração através da barreira hematoencefálica (NASCIMENTO; DALCIN, 2019). Devido à natureza lipofílica, os canabinóides são amplamente distribuídos no organismo. Os canabinóides atravessam a placenta e são excretados através do leite materno durante a lactação. Estudos em animais prenhas constataram que as concentrações plasmáticas fetais de canabinóides eram de 10% em relação das concentrações maternas (SCHAIQUEVICH *et al.*, 2020).

#### **1.4 Uso medicinal de derivados da *Cannabis sativa***

O uso medicinal de THC e CBD é regulamentado em diversos países como princípios ativos de alguns medicamentos. O dronabinol e a nabilona, derivados de THC são comercializados nos EUA, como Marinol<sup>®</sup>, e no Reino Unido, como Cesamet<sup>®</sup>, respectivamente, para o controle de náuseas na quimioterapia e como estimulante de apetite em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006; ZUARDI, 2006a; ZUARDI, 2008). O Sativex<sup>®</sup>, um medicamento na forma de spray oral, contendo THC e CBD, é indicado para o tratamento de espasticidade em esclerose múltipla e aprovado em vários países, incluindo Canadá, EUA, Alemanha, Dinamarca, Suécia, Suíça, Israel e, em 2017 foi aprovado no Brasil, como Mevatyl<sup>®</sup>. Este foi o primeiro medicamento à base de derivados canabinóides de *C. sativa* registrado no Brasil, contendo THC (27 mg/mL) e CBD (25 mg/mL) (LEUSSINK *et al.*, 2012; ANVISA, 2017). E ainda, em 2018, o Epidiolex<sup>®</sup>, um medicamento extraído de *C. sativa* contendo mais de 98% de CBD (100 mg/mL) e com teor de THC inferior a 0,5%, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA com indicação para o tratamento de epilepsia intratável, especialmente para uso pediátrico, por administração oral (LEWIS-BAKKER *et al.*, 2019; MILLAR *et al.*, 2019; YAO; STEIN; MAGGIO, 2019; FARRELLY; VLACHOU; GRINTZALIS, 2021). A partir de abril de 2020, no Brasil, a ANVISA autorizou a produção do primeiro produto de *Cannabis* de origem nacional pela indústria farmacêutica brasileira Prati-Donaduzzi. O canabidiol da Prati-

Donaduzzi é um fitofármaco em forma de solução oral em frascos com 30 mL, produzido a partir do princípio ativo puro, livre de THC. Inicialmente foi disponibilizado na apresentação de 200 mg/mL, e posteriormente, em 2021, nas concentrações de 20 e 50 mg/mL. Esses produtos são versões do medicamento que está em estágio final de estudo clínico fase III, através de uma parceria público-privada entre a Prati-Donaduzzi e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (PRATI-DONADUZZI, 2020; 2021).

Nos EUA, extratos de *C. sativa* ricos em CBD são legalmente comercializados como suplemento alimentar (CARVALHO, 2017; CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017). Em preparações obtidas a partir da planta, as concentrações de CBD e THC podem variar de acordo com fatores genéticos e ambientais, como o tempo de cultivo, maturação da planta e o processamento da amostra, que engloba as etapas de secagem, estocagem e extração (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006; MOREAU, 2014). Extratos de *Cannabis* podem conter até 40% de CBD (ZUARDI, 2006b; BERGAMASCHI *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2017). Tratamentos com CBD tem se mostrado eficazes em pacientes com epilepsia refratária. Além disso, extratos ricos em CBD mostram um perfil terapêutico melhor do que o CBD isolado nesses pacientes (GALLILY;YEKHTIN;HANUŠ, 2015; PAMPLONA;SILVA;COAN, 2018). É provável que essa diferença seja devido aos efeitos sinérgicos do CBD com outros fitocompostos, conhecido como efeito *entourage*, mas que ainda precisa ser confirmado em estudos clínicos controlados (PAMPLONA;SILVA;COAN, 2018).

Apesar de já serem descritos uma centena de canabinóides, os produtos medicinais utilizados atualmente são padronizados em relação aos teores de THC e CBD (CARVALHO, 2019). Na América do Norte e Europa, a partir das proporções de THC e CBD pode se classificar a *Cannabis* como droga/maconha (*drug type/marijuana*) ou como fibra/cânhamo (*fiber type/hemp*). Plantas com teores de THC superiores ao de CBD são classificadas como maconha e sujeitas a maior controle. As variedades de plantas com teores de CBD superiores ao de THC são classificadas como *cânhamo* e permitidas na produção de fibras, suplementos alimentares e cosméticos desde que o teor de THC seja  $\leq 0,3\%$  (CARVALHO *et al.*, 2020). Nos EUA, o uso generalizado de *Cannabis* por pacientes precedeu a validação de qualidade do uso de *Cannabis* para epilepsia. Neurologistas e especialistas em canabinóides estão cada vez mais inclinados a monitorar e orientar o uso da planta herbácea *Cannabis* em pacientes com epilepsia. Isso leva à

necessidade da comunidade médica responder ao uso de *Cannabis* no ambiente clínico, através de investigação científica rigorosa e de realização de ensaios clínicos a serem avaliados pelo FDA, agência regulatória americana responsável pela aprovação de medicamentos (SULAK; SANETO; GOLDSTEIN, 2017).

Os canabinóides são extraídos das sumidades floridas das espécimes fêmeas da planta (ZUARDI, 2006; CARVALHO *et al.*, 2020). CBD e THC são altamente lipossolúveis e para uso terapêutico. A extração deve ser realizada sob condições adequadas de temperatura, pressão, tempo de extração e tipo de solvente. Os solventes orgânicos mais utilizados são etanol, metanol, clorofórmio, butano e n-hexano. O etanol tem baixa seletividade, mas alcançou melhor eficácia na extração de canabinóides não-psicoativos, quando usado por duas vezes mais na maceração da planta. Lewis-Bakker e colaboradores (2019), relatam a existência de métodos convencionais e domésticos para a extração de *Cannabis*, como extração etanólica, maceração, extração com butano e extração rápida a álcool. Os autores empregaram 4 métodos de extração, como a extração assistida por ultrassom, extração de fluido supercrítico, nas quais obtiveram os canabinóides ácidos em suas formas naturais, uma vez que não empregam o aquecimento. Os dois outros métodos de extração, extração de Soxhlet e extração assistida por microondas, permitiram a conversão dos canabinóides ácidos em suas formas ativas neutras através da descarboxilação (LEWIS-BAKKER *et al.*, 2019; NASCIMENTO; DALCIN, 2019).

Apesar da farmacocinética ainda não estar bem esclarecida, acredita-se que a absorção dos canabinóides pode variar de acordo com a via de administração escolhida. Em estudos com animais, a administração de CBD pela via oral atingiu pico de concentração plasmática após 2 h, pela via intranasal em 10 minutos e nos géis transdérmicos em 15,5 h. O CBD apresenta baixa biodisponibilidade oral, menor que 10%, devido ao alto metabolismo de primeira passagem que ocorre no intestino e no fígado, levando a uma baixa absorção pelo trato gastrointestinal. Assim como o THC, o CBD é altamente lipofílico, e são transportados através da corrente sanguínea ligados às proteínas plasmáticas, apresentando o CBD, volume de distribuição de 32 L/kg. No fígado, o CBD é hidroxilado em 7-OH-canabidiol por algumas isoformas das enzimas do citocromo P450 e seus metabólitos são excretados principalmente nas fezes, e uma pequena porção na urina (YAO; STEIN; MAGGIO, 2019).

Os fitocannabinóides atuam como potenciais anticonvulsivantes. Devido às propriedades psicoativas do THC, a maioria dos estudos realizados se concentrou no uso de CBD em pacientes. O uso de CBD como terapia adjuvante no tratamento da epilepsia resultou na diminuição da frequência de convulsões e benefícios secundários como melhora no humor, no estado de alerta e no sono (BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020). De acordo com Silva e Saraiva (2019), “há relatos de que o uso do CBD é capaz de superar a eficácia de medicamentos convencionais para o tratamento de crises convulsivas e que suas propriedades farmacológicas vão além do efeito alucinógeno provocado pelo uso indiscriminado da planta.”. Esta atividade anticonvulsivante do CBD não foi estendida a outros derivados fitocannabinóides ainda, mas uma mudança no foco está atualmente se movendo em direção ao potencial terapêutico de outros fitocannabinóides menos estudados. A nova busca por tratamentos com *C. sativa* no Brasil foi impulsionada pelo sucesso no controle de convulsões em crianças com epilepsia refratária. Assim, muitas famílias começaram a importar esses extratos para tratar crises convulsivas, apesar do *status* ilegal da planta e seus derivados, com risco de processo contra tráfico de drogas. (CARVALHO, 2017; CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017; FARRELLY; VLACHOU; GRINTZALIS, 2021).

Embora o uso de *cannabis* seja ilegal na maioria dos países, as evidências sugerem sua potencial eficácia no tratamento da epilepsia, particularmente no grupo refratário. Os benefícios secundários relatados entre os pacientes é um dos aspectos motivadores de pais e cuidadores para continuar esse tratamento com extrato, mesmo quando não há a eficácia anticonvulsivante esperada (HAUSMAN-KEDEM; MENASCU; KRAMER, 2018). O CBD é administrado rotineiramente em pacientes que também recebem outros medicamentos e/ou nutrientes que podem interagir com o CBD, limitando a eficácia anticonvulsivante e aumentando a toxicidade dos canabinóides ou dos medicamentos administrados concomitantemente (SCHAIQUEVICH *et al.*, 2020). Na maioria dos ensaios clínicos, o CBD é usado em conjunto com medicamentos para epilepsia, portanto, resta determinar se o próprio CBD é antiepiléptico ou um potencializador de medicamentos antiepilépticos tradicionais. Ensaios futuros poderão avaliar a eficácia do CBD no tratamento de convulsões devido a etiologias específicas. O CBD aumentou a concentração plasmática de algumas outras drogas antiepilépticas, especialmente o clobazam, por meio de sua ação inibitória no sistema do citocromo



P450 hepático (ZAHEER *et al.*, 2018). A elevação dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) também foi observada, principalmente em pacientes com uso de valproato quando associado ao CBD (BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020). Alguns dados sugerem que o CBD tende a reduzir a ocorrência de eventos adversos, em geral, quando usado como terapia complementar a outros anticonvulsivantes (PAMPLONA; SILVA; COAN, 2018).

### **1.5 Aspectos regulatórios quanto ao uso medicinal de derivados de *Cannabis sativa***

Em alguns países, o uso medicinal de derivados de *C. sativa* já está bem regulamentado. Nos EUA, o uso terapêutico do CBD em pesquisas para tratamento de epilepsias refratárias em crianças foi aprovado pela FDA desde dezembro de 2013. Essa aprovação norte-americana e os bons resultados terapêuticos demonstrados em alguns estudos influenciaram na autorização do uso medicinal e industrialização de medicamentos à base de CBD e THC no Brasil (ANVISA, 2016b). Isso pode ser o início para futuras pesquisas sobre outros canabinóides, ainda não analisados quanto às propriedades e potenciais efeitos terapêuticos (SANTOS; SCHERF; MENDES, 2019). Na União Européia, o cultivo e a extração de derivado de *C. sativa* são permitidos, desde que o teor de THC seja inferior a 0,2%. De acordo com o Regulamento da União Européia (UE) nº 1307/2013, para obtenção do óleo rico em CBD, a técnica de extração mais utilizada é a técnica de extração por CO<sub>2</sub> em estado supercrítico (UE, 2013; PAVLOVI *et al.*, 2018; NASCIMENTO; DALCIN, 2019). Recentemente, o Tribunal de Justiça da União Europeia (TJEU) anulou os regulamentos da UE sobre o cânhamo, *Cannabis* com menos do 0,2% de THC na Política Agrícola Comum (CAP) do bloco, uma vez que o CBD não pode ser considerado um produto agrícola. Além disso, decidiu-se que o CBD não é uma droga entorpecente (OLIVEIRA, 2020).

No Brasil, a Lei nº 11.343/06 considera como drogas, as substâncias ou produtos capazes de causar dependência, sendo complementada pela Portaria nº 344/98, que em seu Anexo I, lista as plantas e substâncias sob controle especial no Brasil, incluindo as de uso proibido. A *C. sativa* consta na lista E, que relaciona plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas. O CBD consta na lista C1, referente às substâncias sujeitas a controle especial e o THC na

lista F2, que contém as substâncias psicotrópicas de uso proscrito no Brasil (BRASIL, 1998; BRASIL, 2006).

Desde abril de 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem autorizado pedidos excepcionais para importação de produtos à base de CBD para uso pessoal e tratamento de saúde, desde que prescrito por profissional legalmente habilitado. Em 2014, a ANVISA recebeu 360 pedidos de importação de CBD, dos quais 333 foram autorizados, 22 aguardavam o cumprimento de exigência e 5 foram arquivados por desistência ou falecimento do paciente. Entre 2014 e 2016, a ANVISA recebeu 1.449 solicitações de importação de produtos à base de CBD, das quais 1.279 foram autorizadas (88%). No período de 5 anos, desde 2015, houve um aumento da demanda de produtos à base de CBD de aproximadamente 700%. No ano de 2018 houve um total de 3.860 solicitações, uma média mensal de 301 pedidos de importação de CBD por mês. No ano de 2019 foram 7.001 solicitações, com uma média mensal de 583 pedidos recebidos, 93% a mais em relação ao ano anterior. E em 2020, atingiu-se o um número de 16.836 de processos de solicitação para importação excepcional de produtos à base de CBD (BRASIL, 2015b; 2016c; 2016d; 2017; 2018b; 2019c; 2020b; 2021b).

A partir da Resolução do Conselho Federal de Medicina (CFM) nº 2113/2014, que aprovou o uso compassivo de CBD para pacientes portadores de epilepsia com até 18 anos de idade, permitiu-se a prescrição do mesmo por médicos das especialidades de neurologia, neurocirurgia e psiquiatria. Em 2015, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17/2015, definiu critérios e procedimentos para a importação, em caráter excepcional, de produtos à base de CBD. A seguir, a RDC 66/2016 passou a permitir a importação, para uso médico pessoal, da planta, partes da planta e seus derivados, incluindo o THC, e a RDC 128/2016 atualizou o Anexo I (Produtos à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides) da RDC nº 17/2015 incluindo mais 7 produtos que já tiveram autorização de importação anterior por parte da Agência. Posteriormente a RDC 17/2015 também foi alterada pela RDC 306/2019, na qual os pedidos de importação, em caráter de excepcionalidade, passaram a ser recebidos exclusivamente pelo Portal de Serviços do Governo Federal (ANVISA, 2016a; BRASIL, 2014b; 2015a; BRASIL, 2016a; 2016b; 2019a). E então, foram obtidas as primeiras salvaguardas para o cultivo de *C. sativa* para fins medicinais (CARVALHO, 2017), pois além da importação, as famílias passaram a solicitar a liberação de cultivo, obtido na Justiça através de *habeas corpus*, com a

justificativa de autonomia para administração da droga e diminuição do custo (PASSOS, 2019).

Em agosto de 2016, a ANVISA disponibilizou um formulário específico para registro de casos suspeitos de reações adversas pós-uso do CBD, em versões para pacientes e profissionais de saúde. Nesse mesmo ano, o Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária (Notivisa) registrou 35 notificações de reações adversas, como aumento de secreção, inapetência e aumento do apetite, lentidão psíquica, alteração psíquica, sonolência, perda de memória recente e vômito. De acordo com Buchanan-Peart e colaboradores (2020), os eventos adversos associados ao uso de *cannabis* medicinal sob a forma de extratos incluem sonolência, diarreia, diminuição do apetite, aumento das transaminases e agravamento das convulsões. (BRASIL, 2017; BUCHANAN-PEART *et al.*, 2020).

No Brasil, o Laboratório de Análises Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LATox-FAR-UFRJ), é o primeiro no país a monitorar o tratamento médico com fitocannabinóides. Através do projeto Farmacannabis, o LATox monitora o preparo caseiro dos extratos medicinais, e analisa os extratos utilizados pelos pacientes cadastrados, a fim de verificar a segurança das terapias em uso. A maioria dos pacientes são crianças com epilepsia e autismo intratáveis (CARVALHO, 2017; CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017).

Além disso, em 2019, a Justiça Federal, através do Ministério Público do estado da Bahia instituiu que medicamentos a base de CBD e THC registrados pela ANVISA sejam inseridos na lista de medicamentos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). E ainda, a Defensoria Pública de Rondônia assegurou o tratamento com CBD de sete crianças no interior do estado, com medicamentos importados dos EUA custeados pelo governo (NASCIMENTO; DALCIN, 2019).

A partir de estudos e evidências científicas sobre o benefício terapêutico de medicamentos à base de *C. sativa*, a ANVISA publicou, em junho de 2019, duas propostas de Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs) para consulta pública. A Consulta Pública nº654/2019 abordou os procedimentos para o registro e monitoramento de medicamentos à base de *Cannabis spp.*, seus derivados e análogos sintéticos, e a Consulta Pública nº655/2019 tratou dos requisitos técnicos e administrativos para o cultivo da planta por empresas farmacêuticas, única e exclusivamente para fins medicinais e científicos. Com

isso, a ANVISA quer favorecer a produção nacional de terapias a base de *Cannabis* com garantia de qualidade e segurança, além de permitir a ampliação do acesso da população a medicamentos. As normas serão aplicáveis a medicamentos cuja indicação seja restrita a pacientes com doenças debilitantes graves e/ou que ameaçam a vida sem alternativas terapêuticas (ANVISA, 2019a; 2019b). Assim, em dezembro de 2019, a ANVISA publicou a RDC 327/2019 que estabelece os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para fabricação e importação, além de estabelecer requisitos para a comercialização, prescrição, dispensação, monitoramento e fiscalização, de produtos de *Cannabis* para fins medicinais, por pessoas jurídicas também. Assim, em 2020, ANVISA autorizou a produção do primeiro produto de *Cannabis* nacional, solicitado pela farmacêutica Prati-Donaduzzi. Em 2021, a segunda empresa a receber autorização foi a NUNATURE. Esses “produtos com *Cannabis*” não são considerados medicamentos, essa foi uma classificação criada pela ANVISA, na RDC 327/19, com a finalidade de acelerar a oferta de derivados de *Cannabis* no mercado, sem que fossem necessários anos de estudos clínicos (BRASIL, 2019b; PRATI-DONADUZZI, 2020; 2021; BRUNO, 2021).

A partir de janeiro de 2020, através da RDC 335/2020, a ANVISA passou a simplificar o processo de solicitação de importação excepcional dos produtos à base de CBD em associação com outros canabinóides. Além disso, o prazo de validade da autorização de importação concedida pela Agência foi ampliado para dois anos. A RDC 335/2020 substituiu e revogou a RDC 17/2015, suas atualizações e alterações pela RDC 128/2016 e 306/2019 também foram revogadas. De acordo com a RDC 335/2020, fica permitida a importação, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado para tratamento de saúde, de produto derivado de *Cannabis*. A importação pode ser realizada por responsável legal ou procurador, e ainda ser intermediada por entidade hospitalar, unidade governamental ligada à área da saúde, operadora de plano de saúde para o atendimento exclusivo e direcionado ao paciente previamente cadastrado na ANVISA. O cadastro deve ser realizado por meio do formulário eletrônico para a importação e uso de produto derivado de *Cannabis*, disponível no Portal de Serviços do Governo Federal. Somente após a aprovação do cadastro, as importações poderão ser realizadas, por meio de registro no sistema informatizado de comércio exterior, por bagagem acompanhada ou por remessa expressa. O produto a ser

importado deve ser produzido e distribuído por estabelecimentos devidamente regularizados pelas autoridades competentes em seus países de origem para as atividades de produção, distribuição ou comercialização (BRASIL, 2020a).

Em outubro de 2021 foi publicada a RDC 570/2021, que altera a RDC 335/2020, com o objetivo de reduzir o tempo para aprovação do cadastro. A RDC 570 alterou o procedimento operacional de análise dos pedidos de importação pela ANVISA. A prescrição do produto passa a ser avaliada apenas pela autoridade sanitária em PAF (Portos, Aeroportos e Fronteiras) antes de seu desembaraço aduaneiro, evitando duplicidade de análise e permitindo maior rapidez na etapa de aprovação do cadastro. A aprovação do cadastro passa a ocorrer mediante análise simplificada no caso dos produtos derivados de *Cannabis* já listados pela ANVISA. Dessa forma, no ato do cadastramento, será avaliada exclusivamente a regularidade do produto, ou seja, se o produto a ser importado é produzido e distribuído por estabelecimentos devidamente regularizados pelas autoridades competentes em seus países de origem para as atividades de produção, distribuição ou comercialização. Além disso, a ANVISA também está trabalhando na atualização dos sistemas, a fim de permitir, em breve, a aprovação automática do cadastro nos casos de produtos constantes em lista predefinida pela Agência. (BRASIL, 2021a)

Há uma crescente expectativa de que novos medicamentos à base de derivados canabinóides possam apresentar mais segurança e eficácia para pacientes portadores de crises convulsivas refratárias. O uso de CBD, ainda restrito no país se torna a única possibilidade de tratamento, apesar de seu registro e introdução no mercado nacional representar um desafio para indústria farmacêutica. O processo dificultoso e burocrático de aquisição do CBD prejudica não somente os pacientes, mas também as pesquisas científicas e estudos clínicos, que são imprescindíveis para garantir a qualidade e segurança de um medicamento. Logo, são necessários incentivos e investimentos em pesquisas sobre CBD e outros componentes da *C. sativa*, a fim de comprovar suas aplicações terapêuticas, benefícios, efeitos adversos, e assim, favorecer o uso seguro e eficaz da planta e seus derivados (SILVA; SARAIVA, 2019).

## **1.6 Toxicologia pré-clínica: importância dos ensaios de genotoxicidade**

A avaliação toxicológica é um requisito essencial para o desenvolvimento de medicamentos, sendo importante também para plantas medicinais. Os estudos toxicológicos podem fornecer informações sobre a segurança de uso de plantas medicinais. A avaliação da segurança das plantas medicinais é um tema preocupante no que se refere à integração da medicina tradicional nos sistemas de atenção à saúde (AREMU *et al.*, 2013).

Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

Os extratos artesanais de *C. sativa*, como produtos para saúde, podem ser enquadrados, de acordo com a RDC nº 26/2014, na categoria de derivado vegetal. Como derivado vegetal são definidos os produtos obtidos a partir da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, podendo se apresentar nas formas de extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato ou outras (BRASIL, 2014a). Além disso, essa Resolução, em seu Art. 18 define os parâmetros a serem seguidos para os ensaios não clínicos e clínicos de segurança e eficácia e considera que quando não existirem ensaios não clínicos que comprovem a segurança, esses deverão ser realizados seguindo, como parâmetro mínimo, a última versão publicada pela ANVISA do “Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, no que for aplicável a medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2013). Medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos a partir de matérias-primas ativas vegetais exclusivamente, caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2014a).

O Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA foi elaborado com base em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos como a FDA e a *European Medicines Agency*

(EMA), e de instituições de interesse na área, como a *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, *Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)*, *National Cancer Institute (NCI)* e *World Health Organization (WHO)*, visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional. Além disso, esse guia pretende racionalizar estudos não clínicos. Dentre os estudos não clínicos de segurança propostos nesse documento, incluem-se testes de genotoxicidade e carcinogenicidade (BRASIL, 2013).

Os testes de genotoxicidade devem ser capazes de avaliar os potenciais danos ao DNA que podem ser observados na forma de mutações gênicas e alterações cromossômicas, podendo ser numéricas ou estruturais. Estas mutações podem estar fortemente relacionadas à produção de alterações hereditárias e às diferentes etapas do desenvolvimento de malignidades. Substâncias que apresentam resultados “positivos” nesses tipos de testes são potencialmente agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos para seres humanos. Apesar da relação entre exposição a agentes químicos e carcinogênese se encontrar estabelecida em humanos, tem sido difícil avaliar transmissão hereditária a partir de alterações no DNA provocadas por tais agentes, portanto os testes de genotoxicidade têm sido utilizados, principalmente, para a previsão de potencial carcinogênico (BRASIL, 2013).

Testes de genotoxicidade são exigidos pelas agências reguladoras para avaliar o risco potencial de substâncias químicas induzirem câncer. Dentre os testes de genotoxicidade disponíveis, a versão alcalina do ensaio Cometa (EC) *in vitro* e especialmente *in vivo*, o ensaio *in vitro* de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) e o ensaio de micronúcleo *in vivo* têm ampla utilização na avaliação de genotoxicidade de substâncias e são reconhecidos devido à robustez, sensibilidade e poder estatístico (ARALDI *et al.*, 2015). O EC avalia quebras das fitas de DNA que podem ser considerados marcadores de genotoxicidade e o EMnBC avalia quebras (clastogenicidade) e perdas de cromossomos (aneugenicidade). Araldi e colaboradores (2015) consideram a associação desses dois ensaios a mais empregada na avaliação do risco potencial de indução de câncer de substâncias químicas.

O EC ou ensaio de eletroforese de células individuais em gel (*single cell gel electrophoresis assay* - SCGE *assay*) sob condições alcalinas é um teste de

genotoxicidade sensível para a detecção de danos no DNA. Este ensaio consiste em uma técnica eletroforética em microgel, onde as células são embebidas em gel de agarose em lâmina para microscopia, posteriormente são lisadas, submetidas à eletroforese sob condições alcalinas e coradas com um corante fluorescente que se liga ao DNA. As células que apresentam danos crescentes no DNA mostram migração aumentada de DNA cromossômico do núcleo em direção ao anodo que se assemelha à forma de um cometa (TROMPOWSKY, 2016). A extensão de migração do DNA indica a quantidade de quebras de fitas de DNA na célula (COLLINS *et al.*, 2004). Este ensaio pode detectar lesões iniciais de DNA como quebras primárias de fitas simples e quebras de fitas duplas de DNA resultantes da hidrólise espontânea de adutos e de reparos intermediários associados aos locais abásicos e de incisões no DNA (SINGH *et al.*, 1988).

As vantagens do EC incluem desempenho simples e rápido, alta sensibilidade para detectar danos no DNA, permite análise de danos em nível de células individuais, o uso de amostras de células extremamente pequenas (5 µL a 10 µL) e a possibilidade de uso de praticamente qualquer população de células eucarióticas. A análise de imagens facilita e aprimora as possibilidades de medições de cometas, além do custo da realização do ensaio ser extremamente baixo. O teste tem amplas aplicações em estudos de danos e reparos no DNA, no biomonitoramento ambiental e monitoramento de população humana. O EC é também amplamente utilizado em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de substâncias químicas e biológicas (SPEIT; HARTMANN, 2006).

Adicionalmente, a versão alcalina do EC *in vitro* é um sistema de triagem útil e rápido em células de mamífero, podendo ser utilizado em baterias de testes para avaliação de genotoxicidade no desenvolvimento de medicamentos (HARTMANN *et al.*, 2001). Segundo Frötschl (2015), o EC *in vitro* é amplamente utilizado em pesquisa básica na indústria farmacêutica e química para investigar mecanismos genotóxicos como teste de triagem, mas não é preconizado para fins regulatórios. Diferentemente do EC *in vitro*, o EC *in vivo* é aceito para fins regulatórios no registro de medicamentos e substâncias químicas em geral (COLLINS, 2015). O EC *in vitro* tem sido aplicado também na avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade de vários tipos de extratos de produtos naturais, como de plantas medicinais. Taylor e colaboradores (2003) avaliaram a genotoxicidade do extrato bruto, obtido por extração com diclorometano e metanol (9:1), de diferentes partes de 51 plantas



medicinais utilizadas na África do Sul, utilizando o EMnBC e o EC *in vitro*, este realizado em sangue periférico humano tratado, por 2 horas, com diferentes concentrações dos extratos (0, 250 e 500 ppm). O EC avalia, portanto, um efeito geral de dano ao DNA, e fornece informações importantes quando realizado em conjunto com outros ensaios (TAYLOR *et al.*, 2003). Logo, é necessário a realização de outros ensaios de genotoxicidade, em conjunto, na avaliação de dano ao DNA em nível gênico e cromossômico, para confirmar a ausência ou presença de efeito genotóxico das substâncias em estudo.

O EMnBC *in vitro* é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos (Mn) no citoplasma de células em intérfase. Os Mn podem ser formados a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que foram incapazes de migrar para os pólos durante a divisão celular. Esses fragmentos não foram incluídos no núcleo principal, e apresentam quase um terço do tamanho do mesmo. O EMnBC *in vitro* é um dos métodos preferidos para avaliar o dano cromossômico, uma vez que permite medir tanto a perda de cromossomos (aneugenicidade) como as quebras cromossômicas (clastogenicidade) com confiabilidade. A presença de Mn representa danos cromossômicos não reparados, transmitidos às células filhas, ou seja, mutação (FENECH, 2000; OECD, 2016a).

O EMnBC é robusto e pode ser realizado em vários tipos celulares. O teste em células de mamífero pode empregar culturas de linhagens celulares ou culturas primárias, de origem humana ou de roedores. O tipo celular deve ser selecionado com base na capacidade adequada de crescimento em cultura, estabilidade de seu cariótipo, incluindo o número de cromossomos e frequência espontânea de Mn. Dados disponíveis na literatura sugerem que é importante também considerar o *status* de p53, estabilidade genética (cariótipo), capacidade de reparo de DNA e origem (roedores ou humanos) nas células escolhidas para o teste (OECD, 2016a).

No EC *in vitro*, como no EMnBC, as células de mamífero metabolicamente não competentes devem ser expostas às substâncias em estudo, na presença e ausência de uma fonte exógena de ativação metabólica. O sistema mais amplamente utilizado é a mistura S9 preparada a partir da fração S9 pós-mitocondrial obtida por centrifugação a 9000 g de sobrenadante de homogenato de fígado de rato induzido por agentes indutores de enzimas, como Aroclor 1254 e adicionado de cofatores D-glicose-6-fosfato e  $\beta$ -NADP e sais (cloreto de magnésio, cloreto de potássio e solução tampão de fosfato de sódio). A fração S9 contendo as

enzimas microsossomais hepáticas de metabolização de xenobióticos é usualmente empregada em concentrações que variam de 1 a 2% (v/v) mas pode ser aumentada para 10% (v/v) no meio de teste final. A escolha do tipo e da concentração do sistema de ativação metabólica exógeno ou do indutor metabólico empregado pode ser influenciada pela classe de substâncias testadas (OECD, 2016a).

No EMnBC, após o início do tratamento, as células são cultivadas por um período de tempo suficiente para permitir que o dano cromossômico leve à formação de Mn em células na etapa da intérfase. As células são coradas e analisadas quanto à presença de Mn. O ideal é analisar os Mn apenas em células que completaram a mitose. Para que isso ocorra, após completar uma divisão nuclear, as células são impedidas de realizar citocinese com o uso de citocalasina-B (CC-B) e, são identificadas pela aparência binucleada. A CC-B é um inibidor da polimerização da actina necessária para a formação do anel de microfilamento que divide o citoplasma entre os núcleos das células-filhas durante a citocinese. O uso desse bloqueador da citocinese permite o acúmulo de praticamente todas as células em divisão no estágio binucleado da divisão celular. Os Mn são contados apenas em células binucleadas, o que permite comparações confiáveis de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão celular. A extensão da citotoxicidade ou atividade citostática induzida pela substância teste deve ser avaliada em todas as culturas analisadas juntamente com a ocorrência de Mn em células binucleadas (FENECH, 2000; OECD, 2016a). Esse método foi desenvolvido inicialmente em linfócitos humanos de sangue periférico em cultura, mas já foi adaptado para vários outros tipos celulares, como em células de ovário de hamster chinês (CHO), células de pulmão de hamster chinês (V79), dentre outras (FENECH, 2000). O aumento da frequência de Mn nos linfócitos é um preditor reconhecido de risco de câncer (BONASSI *et al.*, 2007).

O EMnBC tem amplas aplicações, podendo ser utilizado para se avaliar danos genéticos na população, ou seja, no biomonitoramento das populações humanas, na determinação da sensibilidade à radiação para avaliar o risco de indução de câncer e na otimização da radioterapia. Tem aplicações em ecotoxicologia, em teste de novos produtos farmacêuticos e de agroquímicos quanto à determinação do potencial genotóxico (FENECH, 2000). O EMnBC é um teste padrão de genotoxicidade para a detecção de atividades clastogênicas e aneugênicas de substâncias químicas e considerado o teste-padrão-ouro em

mutagênese pelo Grupo de Trabalho Internacional de Procedimentos de Teste de Genotoxicidade (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003; TROMPOWSKY *et al.*, 2019).

### 1.7 Justificativa

Diversas famílias brasileiras utilizam extratos caseiros de *C. sativa* em TCM, como alternativa de terapia eficaz no controle de convulsões em crianças com epilepsia refratária ao tratamento convencional. Para monitorar o tratamento com o extrato e dar o suporte farmacêutico aos pacientes foi criado o projeto Farmacannabis, no LATOX-FAR-UFRJ.

O LATOX-FAR-UFRJ além de analisar quimicamente a planta e os extratos de *C. sativa*, quanto à determinação de canabinóides, principalmente CBD e THC, orienta as famílias quanto à produção de extratos caseiros. Adicionalmente, a partir da parceria estabelecida entre a UFRJ e o INCQS, são determinados os níveis de metais tóxicos e a qualidade microbiológica dos extratos e plantas de *C. sativa* (CARVALHO, 2017).

O extrato de *C. sativa* pode ser considerado um derivado vegetal, ou seja, produto de extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal que contém as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, de acordo com a RDC nº 26/2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014).

Segundo a RDC nº 26/2014, o extrato de *C. sativa* pode ser enquadrado como matéria-prima ativa vegetal de um medicamento fitoterápico e não de um produto tradicional fitoterápico, pois só pode ser concebido para ser utilizado sob vigilância médica para fins de prescrição ou de monitorização, é administrado em distúrbios ou condições graves, ou seja, de convulsões em crianças e pode conter matéria-prima em concentração de risco tóxico conhecido (BRASIL, 2014).

De acordo com o Art. 15 desta Resolução, quando o derivado vegetal for utilizado na fabricação do medicamento fitoterápico deve ser apresentado laudo de análise do derivado vegetal, indicando o método utilizado, especificação e resultados obtidos dos ensaios realizados para um lote do extrato. A seguir os ensaios que devem ser realizados para o extrato como matéria-prima ativa vegetal:

- 1) solventes e excipientes utilizados na extração do derivado;
- 2) relação aproximada droga vegetal: derivado vegetal;

- 3) testes de pureza e integridade, incluindo: determinação de metais pesados, determinação de resíduos de agrotóxicos e afins, determinação de resíduos de solventes (para extratos que não sejam obtidos com etanol e/ou água), determinação de contaminantes microbiológicos, determinação de micotoxinas quando houver relatos da contaminação da espécie por micotoxinas.
- 4) método para eliminação de contaminantes, quando empregado, e a pesquisa de eventuais alterações.
- 5) caracterização físico-química do derivado vegetal, incluindo: a caracterização, resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade relativa para extratos fluidos; determinação de água, solubilidade e densidade aparente para extratos secos; determinação da densidade, índice de refração e rotação óptica para óleos essenciais e determinação do índice de acidez, de ésteres e de iodo para óleos fixos.
- 6) perfil cromatográfico, acompanhado da respectiva imagem em arquivo eletrônico, com comparação que possa garantir a identidade do derivado vegetal e
- 7) análise quantitativa dos marcadores ou controle biológico.

Outros testes podem ser adicionados ou substituir os descritos no item 5, de acordo com a monografia farmacopeica reconhecida.

Os padrões de identidade, análise e controle de qualidade de *Cannabis* visando o fornecimento de métodos cientificamente válidos para a análise de *Cannabis* e suas preparações estão descritos na monografia “*Cannabis* Inflorescence. *Cannabis* spp.” da *American Herbal Pharmacopoeia* (AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA, 2013).

Os medicamentos fitoterápicos, como todos os medicamentos, são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (ANVISA, 2020). Devem ter a eficácia e a segurança comprovadas por estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2014; ANVISA, 2020). A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem e estudos de estabilidade (ANVISA, 2020).

Conforme a RDC nº 26/2014 (Art. 18), quando não existirem ensaios clínicos, que comprovem a segurança e eficácia do extrato vegetal no medicamento fitoterápico, esses deverão ser realizados seguindo as Boas Práticas Clínicas (BPC), a norma vigente para a pesquisa clínica, a RDC nº39, de 5 de junho de 2008, que

aprova o regulamento para a realização da pesquisa clínica, o guia de “Instruções Operacionais: Informações Necessárias Para a Condução de Ensaios Clínicos com Fitoterápicos”, publicado pela OMS/MS, em 2008, e as determinações do Conselho Nacional de Saúde (CNS), estabelecidas por meio da Resolução nº446 de 11 de agosto de 2011, e da Resolução nº 251, de 7 de agosto de 2017, ou suas atualizações (BRASIL, 2008; OMS, 2008; BRASIL, 2011; BRASIL, 2017).

Segundo o mesmo Art. 18 da RDC nº 26/2014, quando não existirem ensaios pré-clínicos que comprovem a segurança do extrato vegetal com fins medicinais, esses deverão ser realizados seguindo, como parâmetro mínimo, a última versão publicada pela ANVISA do “Guia Para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, no que for aplicável a medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014).

O Guia da ANVISA elaborado com base em documentos de agências regulatórias reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos tem como objetivo, uma maior harmonização com a regulamentação internacional, com a finalidade de racionalizar os estudos pré-clínicos. Os estudos pré-clínicos de segurança propostos nesse documento incluem estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (administração, distribuição, metabolismo e excreção – ADME) (BRASIL, 2013).

Dentre os estudos propostos no Guia da ANVISA, os ensaios de genotoxicidade devem ser realizados para verificar se o extrato vegetal causa potenciais danos ao DNA em células bacterianas *in vitro* (teste de mutação gênica bacteriano) ou em células de mamífero *in vitro* (testes de aberrações cromossômicas ou de micronúcleo ou de mutação gênica tk em células de linfoma de camundongo) e em células de mamífero *in vivo* (testes de aberrações cromossômicas ou de micronúcleo em células de medula óssea de roedores) (BRASIL, 2013). As mutações detectadas por estes ensaios podem estar fortemente relacionadas à produção de alterações hereditárias e às diferentes etapas do desenvolvimento de malignidades. Substâncias ou preparações que apresentam resultados positivos nesses testes são potencialmente agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos para seres humanos. Além destes testes de mutagenicidade, os testes indicadores de

dano ao DNA *in vitro*, como o EC que detecta quebras de fita de DNA é amplamente usado em pesquisa básica na indústria farmacêutica e química como ensaio de *screening* rápido em células de mamífero para investigar mecanismos genotóxicos podendo ser usado numa bateria de testes durante o desenvolvimento de drogas (HARTMANN et al., 2001; FRÖTSCHL, 2015). Logo, os testes de genotoxicidade são exigidos pelas agências reguladoras para avaliar o risco potencial de substâncias químicas induzirem câncer e devem estar concluídos anteriormente à realização dos ensaios clínicos da fase 2 (BRASIL, 2013).

Assim, visando a segurança do paciente, é importante avaliar o potencial mutagênico de plantas medicinais (TAYLOR et al., 2003). Dentre os testes disponíveis para avaliação da genotoxicidade, o EC sob condições alcalinas e o EMnBC *in vitro* são recomendados devido à robustez, sensibilidade e poder estatístico para se avaliar quebras de fita de DNA e efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos (ARALDI et al., 2015; OECD, 2016). O EC avalia, um efeito geral de dano ao DNA, e fornece informações importantes quando realizado em conjunto com outros ensaios (TAYLOR et al., 2003). O aumento da frequência de Mn nos linfócitos humanos é um preditor reconhecido de risco de câncer (BONASSI et al., 2007).

Alguns estudos indicam que substâncias presentes em plantas medicinais podem causar mutagenicidade *in vitro*, toxicidade e carcinogenicidade, o que leva a uma preocupação quanto ao risco de indução de câncer a longo prazo (TAYLOR et al., 2003; VERSCHAEVE; VAN STADEN, 2008).

Extratos brutos de 51 espécies de plantas medicinais utilizadas na África do Sul devido às suas propriedades medicinais e disponibilidade foram avaliadas quanto à genotoxicidade através dos EC alcalino *in vitro* e EMnBC *in vitro* (TAYLOR et al, 2003). Os extratos de diferentes partes de 5 espécies de plantas medicinais, como de *Balanites maughamii*, *Ochna serrulata*, *Trichelia emetica*, *Tulbaghia violaceae*, *Ziziphus mucronata* foram mutagênicos causando aumento de MN em linfócitos humanos no EMnBC. Os extratos de 2 espécies, *Euclea divinorum*, *Spirostachys africana* foram genotóxicos em leucócitos humanos *in vitro* no EC alcalino. Somente as folhas de *B. maughamii* e de *Z. mucronata* deram resultados positivos em ambos os testes.

Além do EMnBC e do EC alcalino *in vitro* em glóbulos brancos humanos, Verschaeve e Van Staden (2008) utilizaram os testes bacterianos de Ames, umu-C

e VITOTOX® para avaliar os efeitos genotóxicos e antígenotóxicos *in vitro* de extratos de plantas medicinais tradicionais sul-africanas. Os autores constataram que alguns extratos vegetais foram genotóxicos e outros apresentaram potencial antimutagênico.

No EMnBC, além dos extratos das 5 espécies de plantas relatadas por Taylor e colaboradores (2003), os extratos de *Gardenia volkensii* e *Spirostachys africana* foram considerados mutagênicos (Verschaeve; Van Staden, 2008). O EMnBC identificou também extratos de plantas com reconhecidas atividades anticancerígenas, como os extratos de folhas de *Catharanthus roseus*, de *Hipoxis colchicifolia* Baker de *Hipoxis hemerocallidea* Fisch.Mey. & Ave-Lall e de *H. hemerocallidea*. O extrato de folhas de *Ornithogalum longibracteatum* aparentemente potencializa a genotoxicidade de MMC, enquanto efeitos antígenotóxicos foram observados pelos extratos de *Rhamnus prinoides*, *Diospyros whyteana*, *Prunus africana* e *Syzygium cordatum* diminuindo significativamente o efeito genotóxico da MMC. Extratos de *Gymnosporia senegalensis* induziram MN em glóbulos brancos humanos que deve ser devido à interação com o fuso, já que esses extratos foram negativos em dois dos testes com bactérias que não possuem fuso.

Em relação à *C. sativa*, há muitas informações relacionadas ao uso recreativo, mas poucos relatos científicos em relação ao uso de extratos medicinais em pacientes pediátricos, o que gera preocupação quanto à segurança com o uso prolongado. Estudos da *C. sativa* como droga ilícita, sem o conhecimento da composição, impedem a avaliação toxicológica adequada e a extrapolação para o uso medicinal por via oral (CARVALHO, 2017; CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017).

Assim, os extratos de *Cannabis* precisam ser avaliados quanto à segurança, pois as principais substâncias, CBD e THC, podem apresentar genotoxicidade. Russo e colaboradores (2019) relataram efeitos genotóxicos e mutagênicos do CBD e canabidivarina (CBDV) como substâncias isoladas, em células de hepatoma humano (HepG2) e em células de tecido epitelial bucal humano (TR146). Kopjar e colaboradores (2019) relataram genotoxicidade em leucócitos e em células do cérebro de ratos Wistar machos tratados com THC em óleo de gergelim por via oral, na dose diária de 7 mg/kg/pc, por 1, 3 e 7 dias, através do EC alcalino *in vivo*.

Na RDC nº 26/2014, é previsto que se existirem em documentação técnico-científica, resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos publicados, esses deverão ser apresentados à ANVISA para avaliação individual quanto à qualidade e à representatividade do estudo. Ao serem válidos, não precisam ser realizados novos estudos pelo solicitante do registro. Os ensaios apresentados devem ter sido realizados com o mesmo derivado vegetal (quando esse for o produto acabado), indicação terapêutica e posologia que se pretende registrar.

O estudo da citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* do extrato padronizado de *C. sativa* é justificado, pois, além de cumprir a missão do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no tocante à avaliação da qualidade e segurança de produtos sujeitos à vigilância sanitária poderá dar subsídios à ANVISA na tomada de decisões.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* de extrato de *C. sativa* em triglicerídeos de cadeia média (TCM) preparado pelo Laboratório de Análises Toxicológicas (LATox) da UFRJ e utilizado por família brasileira como terapia no controle de convulsões em criança com epilepsia refratária.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (DAF/BrEt) em células sanguíneas humanas *in vitro* para avaliação da citotoxicidade de extrato de *C. sativa* na ausência e presença da mistura S9.
- Realizar o EC em condições alcalinas em células sanguíneas humanas *in vitro* de extrato de *C. sativa* na ausência e presença de mistura S9.
- Realizar o EMnBC de mutagenicidade em células sanguíneas humanas *in vitro* de extrato de *C. sativa* e simultaneamente avaliar a citotoxicidade através das determinações do índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (IPBC) e do índice de replicação (IR) na ausência e presença da mistura S9.
- Relacionar os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade em células sanguíneas humanas *in vitro* sem e com ativação metabólica com a composição do extrato preparado e analisado quanto aos teores de CBD e THC pelo LATox da UFRJ

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Citotoxicidade e Genotoxicidade (SCG) do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do INCQS-FIOCRUZ.

O EC *in vitro* em células de sangue total humano (CSTH) foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas por Speit e Hartmann (2006) e Tice e colaboradores (2000), a partir do trabalho original de Singh e colaboradores (1988) e das modificações introduzidas por Olive (1989) e Klaude e colaboradores em 1996. A metodologia do EC *in vitro* em CSTH empregada no estudo foi objeto de artigos publicados pelo SCG (CARVALHO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014; BOECHAT *et al.*, 2015; BERGSTEN-TORRALBA *et al.*, 2016; TROMPOWSKY *et al.*, 2019).

O EMnBC em CSTH foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OECD 487 (OECD, 2016a) empregando o procedimento experimental relatado por TROMPOWSKY e colaboradores (2019).

##### 3.1.1 Amostra teste: extrato de *Cannabis sativa*

O extrato de *C. sativa*, em TCM, utilizado no presente estudo foi elaborado e analisado pelo LATox, sob responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dra. Virgínia Martins Carvalho, coordenadora do projeto de Pesquisa e Extensão "Farmacannabis: avaliação preliminar de segurança do tratamento de enfermidades neurológicas da infância com extratos de *Cannabis*" da UFRJ. A amostra de extrato de *C. sativa* estudada foi obtida através do projeto Farmacannabis, aprovado no Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/HUCFF – UFRJ, **CAAE**: 82021817.0.0000.5257 em 08/02/2018.

O extrato foi elaborado a partir de planta do gênero *Cannabis*, variedade Harle-Tsu, cultivada com autorização judicial, através do Processo Nº. 0393224-52.2016.8.19.0001 por pai de paciente portador de epilepsia refratária, de forma a atender à necessidade farmacoterapêutica do paciente no âmbito do projeto Farmacannabis.

Após colheita e separação, as flores foram secas em estufa de ventilação forçada sob temperatura de 40°C por 15 horas, trituradas e descarboxiladas sob temperatura de 120°C durante 5 horas. A matéria-prima foi submetida à extração com CO<sub>2</sub> em equipamento de extração por fluidos em estado supercrítico (Supercritical Fluid Equipment, Model: SFE 100 mL, Top Industrie).

Após a extração, a resina resultante rica em fitocanabinóides foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CARVALHO *et al.*, 2020) e dissolvida em volume adequado de veículo oleoso, TCM (triglicerídeo de cadeia média ultrapurificado de óleo de coco) da Marca Lótus (lote: 180807), para obter o extrato oleoso padronizado com teor de 25 mg/mL de CBD e 1 mg/mL de THC para administração oral. O cromatograma da amostra consta no Anexo 1.

A amostra de extrato (11 mL) fornecida para a realização dos ensaios foi dividida em alíquotas, em volumes adequados para cada ensaio (6 alíquotas de 500 µL para o EC e 8 alíquotas de 1 mL para o EMnBC). As alíquotas foram mantidas em freezer a -20°C até o início dos ensaios.

As diluições dos extratos de *C. sativa* realizadas em CSTH heparinizado (400 UI/mL de heparina) foram determinadas a partir da concentração de CBD (C<sub>f1</sub> = 25 mg/mL) nos extratos de *C. sativa* em TCM e da definição como concentração máxima final de tratamento a concentração de C<sub>f1</sub> = 5,0 mg/mL de CBD em sangue (TICE *et al.*, 2000; OECD, 2016; ICH, 2011).

No EC, para as concentrações finais de CBD em CSTH heparinizado (400 UI/mL): 5,0 mg/mL (C<sub>f1</sub>); 2,0 mg/mL (C<sub>f2</sub>); 1,0 mg/mL (C<sub>f3</sub>) e 0,3 mg/mL (C<sub>f4</sub>) foram realizadas diluições de 1:5; 1:12,5; 1:25 e 1:80 dos extratos em sangue, respectivamente, a partir da C<sub>f1</sub> = 25 mg/mL. Foi realizado o tratamento das CSTH com TCM como controle solvente (C<sub>s</sub>) para cada C<sub>f</sub>, utilizando as mesmas diluições do extrato, assim, as concentrações finais de TCM por concentração foram de 20% para C<sub>f1</sub>, 8% de TCM para C<sub>f2</sub>, 4% de TCM para C<sub>f3</sub> e 1,25% de TCM para C<sub>f4</sub>, como mostrado no Quadro 3 abaixo.

Quadro 3 - Diluições dos extratos de *C. sativa* em TCM e do TCM em sangue total humano heparinizado para obtenção das concentrações finais em CBD ( $C_f$ 1 a  $C_f$ 4) no ensaio Cometa *in vitro* sob condições alcalinas

	C1	C2	C3	C4
Concentração de CBD no extrato ( $C_i$ )	<b>25 mg/mL</b>			
Diluição no tratamento:	1:5	1:12,5	1:25	1:80
Concentração final de CBD ( $C_f$ )	<b>5,0 mg/mL</b>	<b>2,0 mg/mL</b>	<b>1,0 mg/mL</b>	<b>0,3 mg/mL</b>
Concentração de TCM como Cs para cada $C_f$ de CBD no tratamento	<b>20%</b>	<b>8%</b>	<b>4%</b>	<b>1,3%</b>

$C_i$ : Concentração inicial.  $C_f$ : Concentração final. TCM: Triglicerídeo de cadeia média. Cs: Controle solvente. CBD: canabidiol.

No EMnBC, para as concentrações finais de CBD no tratamento das culturas de CSTH heparinizado (400 UI/mL): 5,0 mg/mL ( $C_f$ 1); 2,5 mg/mL ( $C_f$ 2); 1,3 mg/mL ( $C_f$ 3); 0,6 mg/mL ( $C_f$ 4) e 0,3 mg/mL ( $C_f$ 5) foram realizadas diluições de 1:5; 1:10; 1:20; 1:40 e 1:80 dos extratos, respectivamente, a partir da  $C_i = 25$  mg/mL. Foi realizado o tratamento das culturas com TCM como Cs para cada  $C_f$ , utilizando as mesmas diluições do extrato, com exceção da  $C_f$ 5 (0,3 mg/mL de CBD). Logo, as concentrações finais de TCM por concentração foram de 20% para  $C_f$ 1; 10% de TCM para  $C_f$ 2; 5% de TCM para  $C_f$ 3; 2,5% de TCM para  $C_f$ 4 e  $C_f$ 5, como mostrado no Quadro 4 abaixo.

Quadro 4 – Diluições dos extratos de *C. sativa* em TCM no protocolo de tratamento em sangue total humano heparinizado para obtenção das concentrações finais em CBD ( $C_f$ 1 a  $C_f$ 5) no EMnBC

	C1	C2	C3	C4	C5
Concentração inicial do extrato ( $C_i$ )	<b>25 mg/mL</b>				
Diluição no tratamento	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
Concentração final de CBD ( $C_f$ )	<b>5,0 mg/mL</b>	<b>2,5 mg/mL</b>	<b>1,3 mg/mL</b>	<b>0,6 mg/mL</b>	<b>0,3 mg/mL</b>
Concentração de TCM como Cs para cada $C_f$ de CBD no tratamento	<b>20%</b>	<b>10%</b>	<b>5%</b>	<b>2,5%</b>	

$C_i$ : concentração inicial.  $C_f$ : concentração final. TCM: triglicerídeo de cadeia média. Cs: Controle solvente CBD: canabidiol. EMnBC: ensaio *in vitro* de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese.

### 3.1.2 Participantes da pesquisa

Os participantes da pesquisa foram recrutados entre colaboradores do INCQS, através de fixação de convite para participação do estudo nos corredores internos da unidade. O estudo necessitou de 6 participantes. Os participantes foram de ambos os sexos, com idade entre 26 e 34 anos, saudáveis, que não tinham sido expostos a raios-X nos últimos 3 meses, não fumantes, que preferencialmente não consumiram bebidas alcoólicas, que não estivessem fazendo uso de medicamentos no momento da coleta de sangue e que não faziam uso medicinal ou recreativo de derivados de *C. sativa*. O participante preencheu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aplicado por um membro da equipe, em sala reservada no INCQS, respondeu ao questionário sobre o seu estado de saúde e, em seguida, submetido ao procedimento de coleta de sangue (2,5 a 13 mL) por profissional habilitado e também membro da equipe de pesquisa. O volume sanguíneo coletado foi em torno de 2,5 mL para avaliação de citotoxicidade do extrato e do seu veículo TCM através da determinação de letalidade celular pelo ensaio DAF/BrEt realizado previamente ao EC (HARTMANN; SPEIT, 1997); cerca de 6 mL para o ensaio de genotoxicidade, EC *in vitro*, que detecta quebras de fita de DNA (SINGH *et al.*, 1988; TICE *et al.*, 2000; SPEIT; HARTMANN, 2006); e cerca de 13 mL na avaliação simultânea de citotoxicidade pelos índices de replicação (IR) e de proliferação pelo bloqueio da citocinese (IPBC) e do ensaio de mutagenicidade, EMnBC que detecta danos cromossômicos, como quebras a perdas de cromossomos causados por substâncias (OECD, 2016a).

O Projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz (CAAE n°: 42792921.6.1001.5248), conforme Comprovante de envio do Projeto n° 8855/2021 (Anexo 2) e Parecer Consubstanciado do CEP n° 4.576.325 (Anexo 3). O convite para participação do estudo, o TCLE e o Questionário para participação do doador nos ensaios encontram-se nos Apêndices A, B e C, respectivamente.

### 3.1.3 Ensaio *in vitro*

O EC e o EMnBC *in vitro* foram realizados em CSH heparinizadas (400 UI/mL) obtido dos participantes por punção venosa antes de cada ensaio, na ausência e na presença de ativação metabólica (mistura S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254).

#### 3.1.3.1 Preparo da Mistura S9

A fração S9 (MOLTOX<sup>®</sup> 11-01L.2), Lote n° 4185, sob a forma liofilizada em KCl 0,154M foi obtida a partir de fígado de rato Sprague-Dawley, induzido pelo Aroclor 1254. A fração S9 foi reconstituída em 2,1 mL de água desionizada estéril, segundo as recomendações do fabricante resultando na concentração final de proteína de 38,4 mg/mL. Após reconstituição, a fração S9 foi dividida em alíquotas (1 alíquota de 120 µL, 3 alíquotas de 220 µL, 1 alíquota de 720 µL e 2 alíquotas de 1320 µL, em tubos criogênicos de 1 ou 2 mL) que foram congeladas imediatamente em banho de gelo seco e em seguida estocadas a -80°C até o dia de uso nos experimentos.

O preparo da mistura S9 foi realizado de acordo com Maron e Ames (1983), imediatamente antes do uso, segundo a fórmula constante no Apêndice F.

#### 3.1.3.2 Ensaio Cometa *in vitro*

O EC *in vitro* sob condições alcalinas foi realizado na ausência e na presença da mistura S9.

Inicialmente ao EC foi realizado um ensaio de citotoxicidade em CSH heparinizadas na ausência e presença da mistura S9 empregando-se o teste de viabilidade celular mediado pelo DAF e BrEt– DAF/BrEt (HARTMANN; SPEIT, 1997).

No ensaio DAF/BrEt, as CSH heparinizadas foram tratadas com as 4 concentrações finais de CBD no extrato de *C. sativa* (0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL) em TCM 1,3; 4; 8 e 20%, respectivamente, como mostrado no Quadro 3. O TCM, nas quatro diferentes concentrações finais (1,3; 4; 8 e 20%) foi utilizado como Cs dos grupos tratados com as concentrações finais de 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL de CBD no extrato, respectivamente. O período de tratamento foi de 2h a 37°C. Após o

período de tratamento (200 µL de C<sub>STH</sub>; 160 µL de C<sub>STH</sub> + 40 µL de extrato ou TCM para C<sub>f1</sub>; 184 µL de C<sub>STH</sub> + 16 µL de extrato ou TCM para C<sub>f2</sub>; 192 µL de C<sub>STH</sub> + 8 µL de extrato ou TCM para C<sub>f3</sub> e 197,5 µL de C<sub>STH</sub> + 2,5 µL de extrato ou TCM para C<sub>f4</sub>), duzentas células foram analisadas por grupo experimental quanto à viabilidade celular. A viabilidade celular foi determinada adicionando-se o volume de 50 µL de C<sub>STH</sub> a 50 µL de solução corante contendo DAF (30 µg/mL) e BrEt (8 µg/mL) em solução salina tamponada de fosfato (PBS). As amostras (50 µL) foram colocadas em lâminas de microscopia cobertas com lamínulas e observadas ao microscópio de fluorescência. As células viáveis ficam coradas em verde, enquanto células mortas mostram núcleos laranja. Somente foram utilizadas no EC diluições da amostra de *C. sativa* causando no máximo 30% de morte celular quando comparado ao Cs TCM (HENDERSON *et al.*, 1998).

No teste DAF/BrEt, na presença da mistura S9, foram adicionados 61 µL da mistura S9 (3,84 mg de proteína/mL) para o volume final de tratamento de 200 µL para os 4 grupos-teste com o extrato de *C. sativa* e do Cs (TCM), ou seja, 99 µL de C<sub>STH</sub> + 40 µL de extrato ou TCM 20% para C<sub>f1</sub> + 61 µL da mistura S9; 123 µL de C<sub>STH</sub> + 16 µL de extrato ou TCM 8% para C<sub>f2</sub> + 61 µL da mistura S9; 131 µL de C<sub>STH</sub> + 8 µL de extrato ou TCM 4% para C<sub>f3</sub> + 61 µL da mistura S9 e 136,5 µL de C<sub>STH</sub> + 2,5 µL de extrato ou TCM 1,25% para C<sub>f4</sub> + 61 µL da mistura S9. No grupo controle sem tratamento, as C<sub>STH</sub> foram tratadas com o mesmo volume de mistura S9 no volume final de 200 µL, ou seja, 139 µL de C<sub>STH</sub> + 61 µL da mistura S9. O período de tratamento foi idêntico ao empregado nos ensaios de DAF/BrEt sem mistura S9. A mesma proporção de mistura S9 por cultura no ensaio DAF/BrEt e tempo de tratamento foram empregadas para o EC.

No EC, as C<sub>STH</sub> foram tratadas em duplicata, por 2h a 37°C, com as mesmas diluições das amostras de extratos de *C. sativa* na ausência e presença da mistura S9 (caso induzam letalidade celular igual ou inferior a 30% em relação ao Cs no ensaio DAF/BrEt), bem como, com os respectivos Cs. Na ausência de mistura S9, foi empregado o controle positivo (C<sub>p</sub> –S9) metanosulfonato de metila (MMS) 160 µM (Sigma-Aldrich) em PBS, a partir do tratamento de 160 µL de C<sub>STH</sub> + 40 µL de MMS 800 µM em PBS). As C<sub>STH</sub> sem tratamento também foram empregadas em cada ensaio.

No EC, na presença da mistura S9, antes da realização dos ensaios com os extratos, foram testados para uso como controle positivo na presença da mistura S9

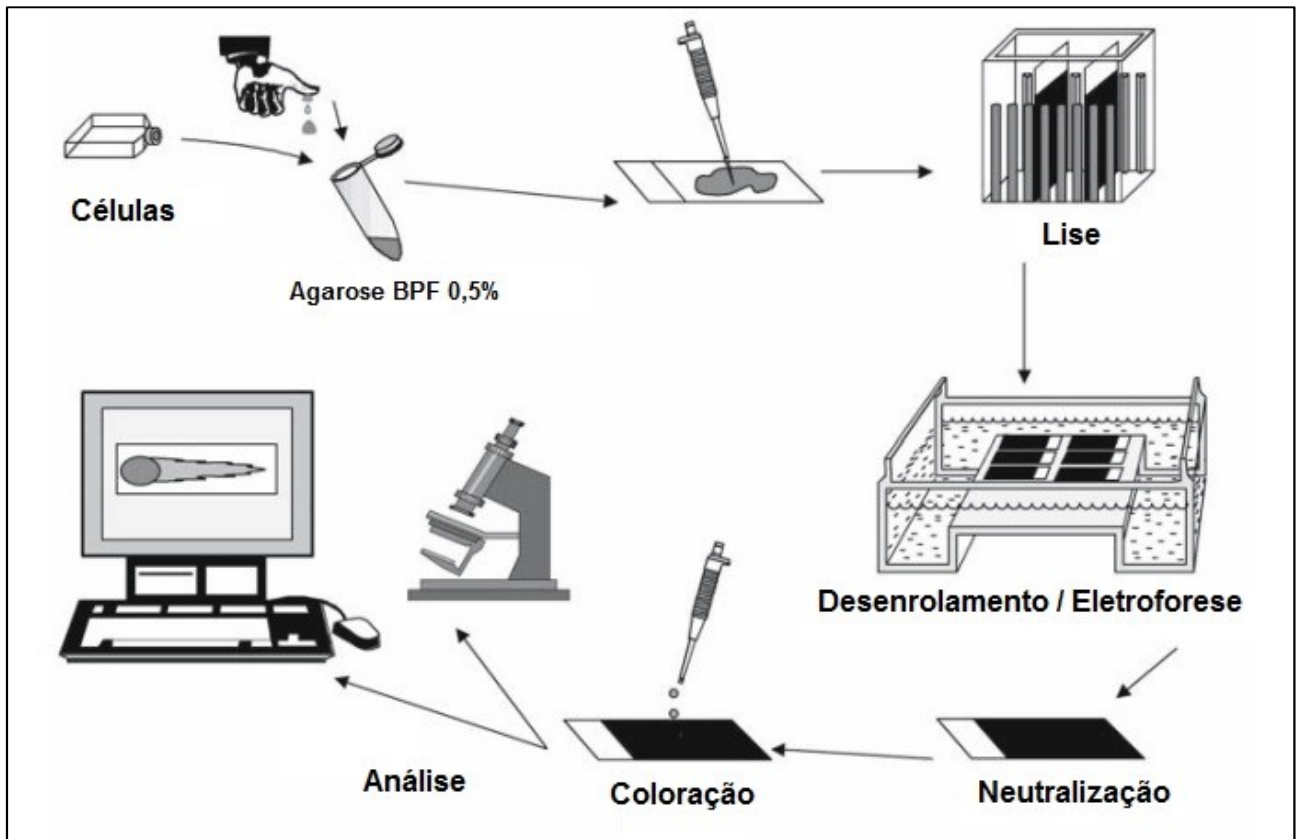
(Cp+S9) em CSTD, o BrEt (Sigma-Aldrich: PM 394,3) em PBS (10, 20 e 50 µg/mL), benzo[a]pireno (BaP), Sigma-Aldrich: PM 252,3 em 1% de DMSO (10, 20 e 50 µg/mL) e ciclofosfamida (CP), Sigma-Aldrich: PM 279,1 em PBS (139,6; 279,1 e 558,2 µg/mL). Testes foram também conduzidos com os respectivos Cs, tais como, PBS, Cs para BrEt e CP e 1% de DMSO para BaP. Como no ensaio DAF/BrEt, o mesmo volume (61 µL) de mistura S9 (3,84 mg de proteína/mL) em CSTD foi empregado no volume final de tratamento de 200 µL em todos os ensaios. A partir dos resultados com BrEt, BaP e CP, foi escolhida uma única substância e concentração para uso como Cp+S9.

Após o tratamento, conforme esquematizado na Figura 2, alíquotas de 5 µL da suspensão celular foram homogeneizadas em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (agarose BPF) 0,5% (Sigma-Aldrich) em PBS a 37°C, colocadas em lâminas para microscopia previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Sigma-Aldrich) em PBS, cobertas com lamínula e mantidas em geladeira (4 a 7°C) por cerca de 5 min. para solidificar a agarose BPF. Duas lâminas foram preparadas por cultura, totalizando 4 lâminas por concentração-teste. Após solidificação da agarose BPF, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em solução de lise (sarcosinato de lauroilo sódico 1%, NaCl 2,5M, EDTA dissódico 100mM, Tris 10mM, pH 10, Triton X-100 1%) e mantidas em geladeira, 4 a 7°C, *overnight*. Após a lise, as lâminas foram mantidas em tampão alcalino (EDTA dissódico 1 mM, NaOH 300 mM) por 20 min. para desnaturação do DNA e, em seguida, a eletroforese foi realizada a 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA, por 20 min. Posteriormente, foram submetidas à neutralização com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5), fixação com etanol absoluto e, após secagem, coloração com brometo de etídio (20 µg/mL) para análise microscópica.

Três ensaios independentes foram realizados para cada diluição de extrato de *C. sativa*, *Cp* e *Cs* e seus resultados combinados, na ausência e presença de ativação metabólica.



Figura 2 – Esquema da realização das etapas do ensaio Cometa

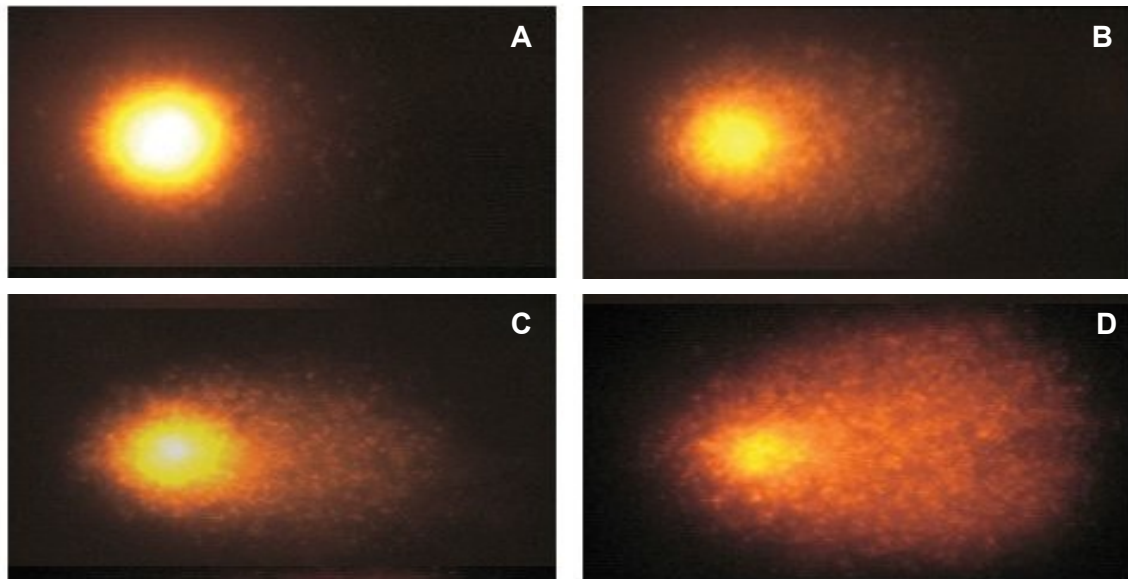


Fonte: Adaptado de SPEIT; HARTMANN (2006).

A avaliação de dano ao DNA foi realizada em microscópio de fluorescência, analisando-se 50 células em cada lâmina, avaliando-se a extensão de migração de DNA, de acordo com a intensidade ou tamanho da cauda dos cometas em 4 diferentes classes (0 a 3), como ilustrado na Figura 3, da seguinte forma:

- classe 0: ausência de cauda;
- classe 1: pequena cauda;
- classe 2: grande cauda;
- classe 3: totalmente danificado (cabeça do cometa muito pequena com praticamente todo o DNA na cauda).

Figura 3 – Fotomicrografias de diferentes classes de danos ao DNA em células sanguíneas humanas



A: Classe de dano 0; B: Classe de dano 1; C: Classe de dano 2; D: Classe de dano 3  
 Fonte: (Adaptado de TROMPOWSKY, 2016).

O dano ao DNA foi expresso em percentagem de células nas diferentes classes e em número de unidades arbitrárias (UA) calculadas a partir da seguinte fórmula:  $UA = [(M_0 \times 0) + (M_1 \times 1) + (M_2 \times 2) + (M_3 \times 3)]$ , onde  $M_0$  = número de células com classe de dano 0;  $M_1$  = número de células com classe de dano 1;  $M_2$  = número de células com classe de dano 2;  $M_3$  = número de células com classe de dano 3 (CARVALHO *et al.*, 2014).

Os resultados do EC foram analisados estatisticamente comparando-se os valores médios de unidades arbitrárias totais (UAT) obtidos das 4 lâminas de cada um dos três ensaios realizados para cada diluição de extrato de *C. sativa* (expressa em concentração de CBD/mL) em relação aos valores médios de UAT dos respectivos Cs, TCM, empregando-se o teste t de *Student* de dados agrupados monocaudal aos níveis de significância de  $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,01$  (CARVALHO *et al.*, 2013). Os ensaios com as diluições de extrato, na ausência e presença da mistura S9, foram considerados válidos, se o dano ao DNA induzido pelos respectivos Cp mostrar um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos respectivos Cs. O extrato de *C. sativa* pode ser considerado genotóxico na ocorrência de um aumento significativo na migração do DNA em pelo menos uma diluição do extrato em relação ao Cs. A repetibilidade de resultados em experimentos independentes é considerada a mais forte evidência para resultados positivos (TICE *et al.*, 2000).

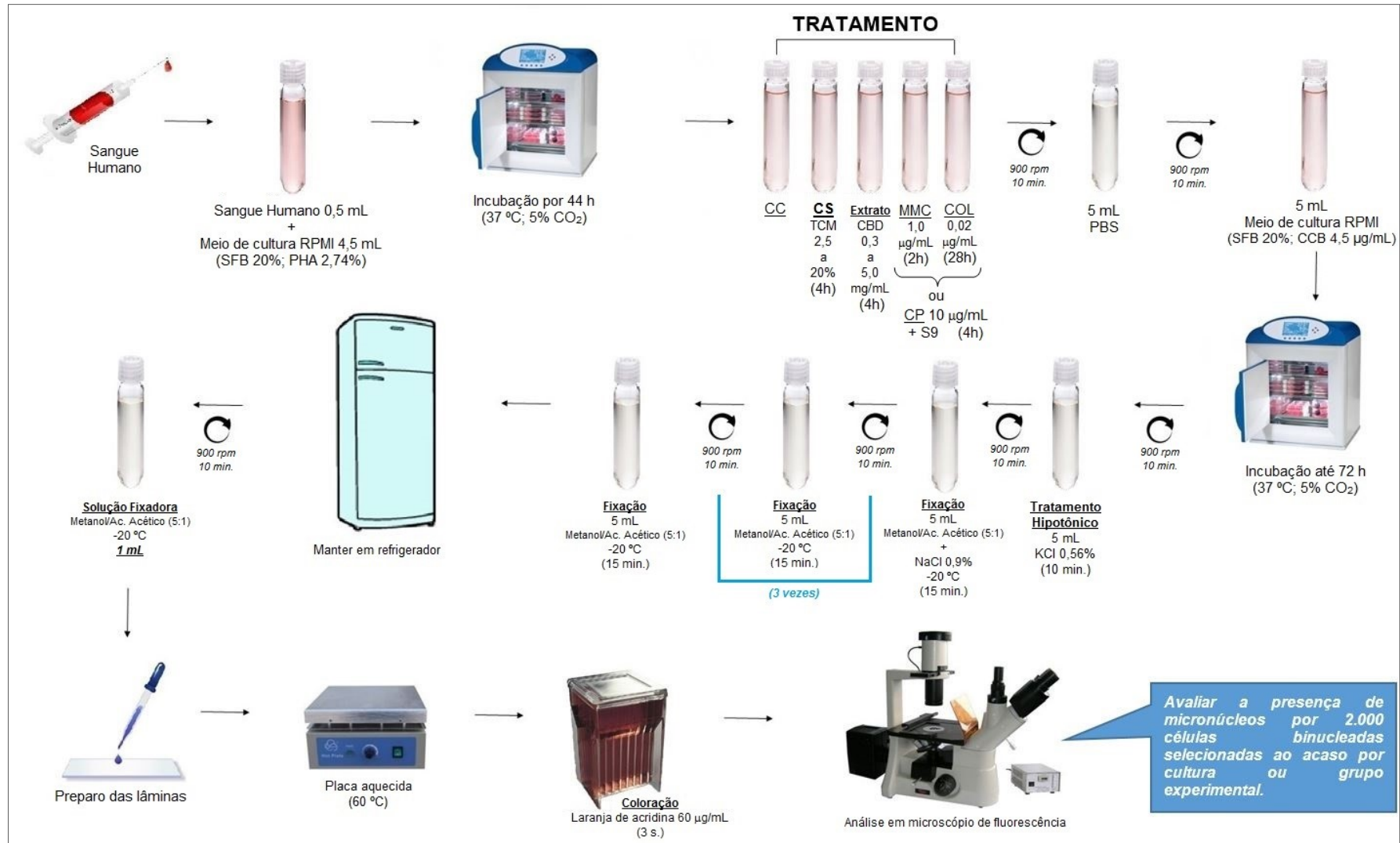
### 3.1.3.3 Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese

As etapas do EMnBC em CSTH estão descritas no esquema constante da Figura 4.

Para estabelecimento das culturas, 0,5 mL de sangue heparinizado foi adicionado a 4,5 mL de meio RPMI 1640 com HEPES 25 mM (Gibco, USA) com L-glutamina (Gibco, USA) 2 mM, 20% de soro fetal bovino (SFB: Gibco, USA), fitohemaglutinina A (PHA: Sigma, USA) 2,74% v/v e antibióticos ( $10^2$  UI/mL de penicilina G potássica e  $10^2$  µg/mL de sulfato de estreptomicina). Após 44 h de incubação, o tratamento foi realizado a 37°C com 5 diluições do extrato de *C. sativa* em TCM expressas em concentrações finais de CBD (0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL, como mostrado no Quadro 4) e com Cs (TCM 2,5; 5; 10 e 20%) por 4h, e Cp: mitomicina C (MMC: Sigma Aldrich, USA) 1 µg/mL, por 2 h, e N-desacetil-N-metilcolchicina (COL: Sigma, USA) 0,02 µg/mL, por 28 h (TROMPOWSKY *et al.*, 2019). Culturas controle sem tratamento também foram empregadas em cada ensaio. No EMnBC na presença da mistura S9, foi adicionado 1,044 mL da mistura S9 (3,84 mg de proteína/mL) por 5 mL de meio de cultura durante o tratamento. Como no EC, antes da realização do EMnBC com o extrato, na presença da mistura S9, foram testadas para uso como Cp+S9 nas culturas, a CP em PBS nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. O período de tratamento de todas as culturas na presença de mistura S9 foi de 4 h. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido pela centrifugação (900 rpm por 10 min.) e adicionado 5 mL de novo meio de cultura completo porém, sem PHA e com citocalasina B (CCB: Sigma-Aldrich, USA) 4,5 µg/mL que possui atividade bloqueadora da citocinese levando à formação de células binucleadas (TROMPOWSKY *et al.*, 2019).

Ao final do período total de cultura de 72 h, as CSTH foram centrifugadas a 900 rpm por 10 min, e ao *pellet* adicionado 5 mL de solução hipotônica (KCl 0,56%, 4-6°C) por 10 min, seguido de centrifugação a 900 rpm por 10 min; primeira fixação por 10 min à temperatura ambiente com 5 mL de solução metanol/ácido acético glacial (5:1, -20°C) misturado com igual volume de NaCl 0,9%, centrifugação e seguida de pelo menos 3 etapas de fixação com adição de 5 mL de solução metanol/ácido acético glacial (5:1, -20°C) por 15 min à temperatura ambiente. Nesta etapa, as suspensões celulares foram mantidas em geladeira na solução fixadora antes de preparar as lâminas (TROMPOWSKY *et al.*, 2019).

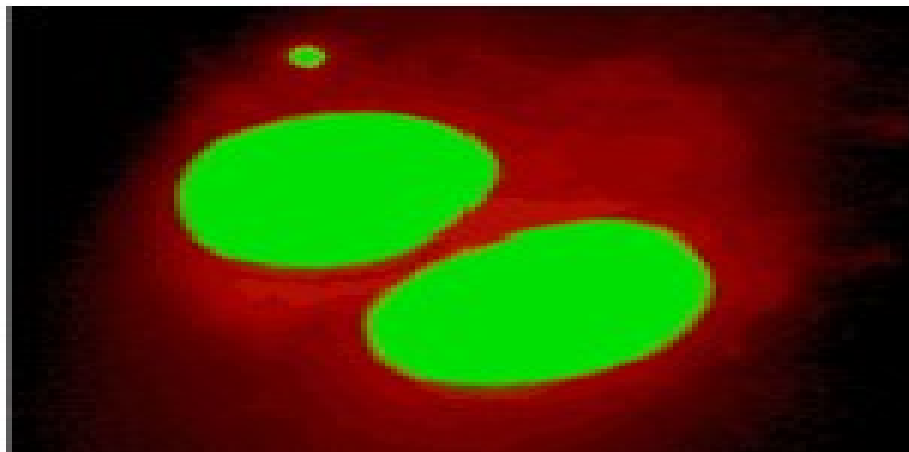
Figura 4 – Esquema da realização das etapas do ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese



SFB: Soro fetal bovino. PHA: Fitohemaglutinina A. Cs: Controle solvente (TCM 20; 10; 5 e 2,5%). MMC: Mitomicina C. COL: Colcemid®. CCB: Citocalasina B.  
Fonte: (Própria autora).

Para o preparo das lâminas, os tubos foram centrifugados e o *pellet* ressuspensão em 1 mL da solução fixadora e gotejado sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram secas em placa quente (cerca de 60°C), a fim de obter células com o citoplasma volumoso. Posteriormente foram coradas por 3 s com solução corante de laranja de acridina (60 µg/mL) em tampão Sörensen (0,03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 0,03 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), enxaguadas em água destilada e cobertas por lamínula. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (aumento de 400x), quanto à presença de micronúcleos (Mn) por 2.000 células binucleadas, por cultura, como ilustrado na Figura 5. O resultado foi expresso como o número total de células binucleadas com Mn por grupo experimental (TROMPOWSKY *et al.*, 2019). No grupo COL, além da análise de micronúcleos em células binucleadas realizou-se esta análise em células mononucleadas.

Figura 5 – Célula binucleada de linfócito humano com a presença de um micronúcleo no citoplasma



Presença de um micronúcleo corado em verde no citoplasma de célula binucleada em intérfase. Coloração pela laranja de acridina 60µg/mL (Aumento de 400 x).  
Fonte: (TROMPOWSKY, 2016).

Simultaneamente ao EMnBC, a citotoxicidade das diferentes diluições de extrato de *C. sativa* no meio de cultura com sangue total foi determinada em relação ao Cs TCM calculando-se o Índice de Proliferação pelo Bloqueio da Citocinese (IPBC) e o Índice de Replicação (IR), a partir da análise de 500 células por cultura quanto à incidência de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas.

O IPBC indica o número médio de núcleos por célula. O IPBC foi determinado em culturas tratadas (IPBC<sub>T</sub>) e em culturas controle (IPBC<sub>C</sub>) e foi usado para se

calcular a proliferação celular e o percentual de inibição do crescimento celular (% de atividade citostática) induzido pelo tratamento, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IPBC} = \frac{(\text{N}^\circ \text{de células mononucleadas}) + 2(\text{N}^\circ \text{de células binucleadas}) + 3(\text{N}^\circ \text{de células multinucleadas})}{\text{Número total de células}} \quad (1)$$

$$\text{Atividade citostática (\%)} = 100 - 100 \left[ \frac{(\text{IPBC}_T - 1)}{(\text{IPBC}_C - 1)} \right] \quad (2)$$

Onde, T = culturas tratadas com substância-teste e C = culturas controle

O IR indica a proporção de ciclos de divisão celular completos em culturas tratadas com as diluições de extrato de *C. sativa* em relação à cultura Cs tratada com TCM. O IR é calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{IR} = \frac{[(\text{N}^\circ \text{de células binucleadas}) + 2 \times (\text{N}^\circ \text{de células multinucleadas})] \div (\text{número total de células})_T}{[(\text{N}^\circ \text{de células binucleadas}) + (2 \times \text{N}^\circ \text{de células multinucleadas})] \div (\text{número total de células})_C} \times 100 \quad (3)$$

Onde, T = culturas tratadas com preparação/substância sob teste e C = culturas controle.

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = 100 - \text{IR} \quad (4)$$

A citotoxicidade foi evidenciada pela ocorrência de redução do IR ou do IPBC das culturas tratadas pelas diluições de extratos de amostra de *C. sativa* quando comparadas às culturas Cs (TCM). A concentração máxima das diluições da amostra empregadas na análise de Mn recomendada pela ICH S2 (R1) para cultura de linfócitos na presença de CCB é a que causa no máximo 50% de redução de IR ou IPBC quando comparado ao Cs (ICH, 2011).

Para a determinação de Mn foram analisadas somente culturas que induzam no máximo 50% de citotoxicidade quando comparadas aos Cs. O extrato de *C. sativa* foi considerado mutagênico quando o número de células com Mn/2000 células binucleadas for significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao Cs pelo teste estatístico do Qui-Quadrado utilizando-se tabelas de contingência (OECD, 2016a). O programa computacional GraphPad Prism foi empregado na análise estatística dos resultados.

Apesar da diretriz OECD 487 (OECD, 2016a) estabelecer que no caso de resultados claramente positivos ou negativos, na ausência e presença de mistura S9, não ser necessária a repetição do EMnBC, procedemos a repetição para verificar a repetibilidade dos resultados.

## 3.2 Resultados

A seguir são apresentados os resultados dos testes DAF/BrEt para avaliação de citotoxicidade e dos EC e EMnBC em C57BL/6 *in vitro* realizados com o veículo TCM e com o extrato de *C. sativa* fornecido pela UFRJ, sem e com ativação metabólica

### 3.2.1 Ensaio Cometa (EC)

#### 3.2.1.1 Citotoxicidade e ensaio Cometa do veículo TCM

Os resultados dos 2 ensaios DAF/BrEt (DAF/BrEt 1 e DAF/BrEt 2) em C57BL/6, e dos 2 EC preliminares (EC1 e EC2) em C57BL/6, para avaliar os efeitos do tratamento por 2h a 37°C com 5 proporções (2,5%; 5%; 10%; 20% e 50%) do veículo oleoso TCM, empregado no extrato de *C. sativa* estão nas Tabelas G1 a G4 no Apêndice G.

A Tabela 1 abaixo mostra a combinação dos resultados dos 2 ensaios DAF/BrEt realizados com o TCM (Tabelas G1 e G3 do Apêndice G) expressos como percentual médio de letalidade celular  $\pm$  erro padrão da média. O controle celular não foi citotóxico nos 2 ensaios, não induzindo decréscimo de viabilidade celular. O TCM nas 5 proporções testadas (2,5%; 5%; 10%; 20% e 50%) causou percentual médio de citotoxicidade reduzido, variando de 0,5 a 3,25%.

Tabela 1 – Citotoxicidade do veículo triglicéridos de cadeia média (TCM) em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios DAF/BrEt realizados

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR (%) <sup>1</sup>		MÉDIA $\pm$ EPM (%) <sup>3</sup>
	Ensaio DAF/BrEt 1 <sup>2</sup>	Ensaio DAF/BrEt 2	
Controle celular	0,0	0,0	0,000 $\pm$ 0,000
<b>Concentrações de TCM<sup>2</sup></b>			
TCM 2,5%	0,0	1,0	0,500 $\pm$ 0,500
TCM 5%	1,0	1,5	1,250 $\pm$ 0,250
TCM 10%	0,0	6,5	3,250 $\pm$ 3,250
TCM 20%	1,0	3,0	2,000 $\pm$ 1,000
TCM 50%	0,5	2,0	1,250 $\pm$ 0,750

<sup>1</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento e experimento para a determinação do percentual de células não viáveis. <sup>2</sup>Ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>3</sup>Resultados expressos como percentual médio de letalidade celular ± erro padrão da média de n=2 ensaios independentemente realizados.

Ao se combinar os resultados de dano ao DNA em UAT dos 2 EC (EC1 e EC2) independentemente realizados com o veículo TCM (2,5 a 50%) mostrados nas Tabelas G2 e G4 (Apêndice G) verificou-se que o tratamento das C57BL/6 com o TCM não induziu dano significativo ao DNA ( $p > 0,1$ ) nas cinco concentrações testadas quando comparado ao controle celular. O controle positivo (MMS 160 µM) induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle celular.

A Tabela 2 e a Figura 6 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média para os dois EC (EC1 e EC2) realizados com as cinco concentrações do TCM (2,5 a 50%), para os controles negativo (controle celular) e positivo (MMS 160 µM).

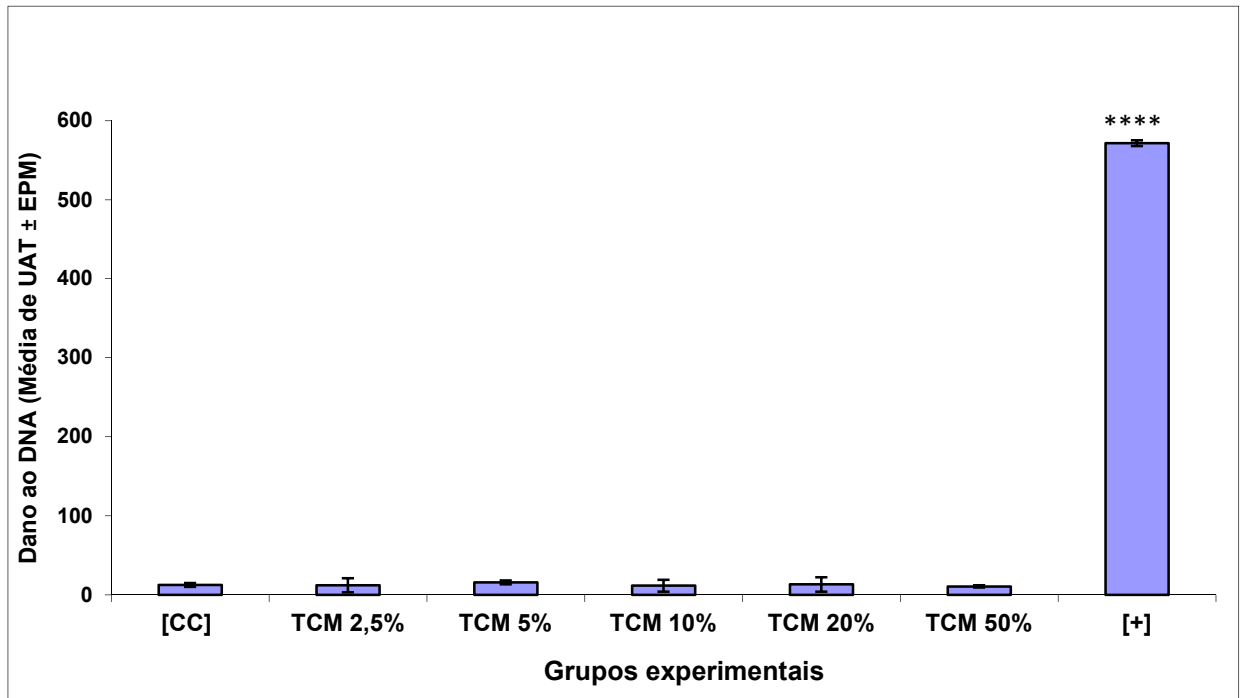
Tabela 2 – Ensaio Cometa do veículo TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Dano ao DNA em valores médios ± erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios independentemente realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) <sup>1</sup>
<b><u>Controle:</u></b>			
Controle celular	12,50	2,50	-
<b><u>TCM</u><sup>2</sup></b>			
TCM 2,5%	12,00	9,00	0,48109
TCM 5%	15,50	2,50	0,24275
TCM 10%	11,50	7,50	0,45546
TCM 20%	13,00	9,00	0,48109
TCM 50%	10,50	1,50	0,28178
<b><u>Controle positivo:</u></b>			
MMS 160 µM <sup>3</sup>	571,50	3,50	0,00003****

<sup>1</sup>Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. <sup>2</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>3</sup>Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \*\*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle celular.



Figura 6 – Efeito do TCM na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica



TCM: Triglicerídeos de cadeia média. [CC] Controle celular. [+] Metanosulfonato de metila 160  $\mu$ M. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados independentemente. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \*\*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

### 3.2.1.2 Citotoxicidade e ensaio Cometa do extrato de *Cannabis sativa* sem ativação metabólica

Os resultados dos três ensaios de citotoxicidade (DAF/BrEt 1, DAF/BrEt 2 e DAF/BrEt 3) e dos três EC (EC1, EC2 e EC3) do extrato de *C. sativa* em TCM expressa em função da concentração de CBD (0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL) e do TCM (1,3; 4; 8 e 20%) respectivamente, correspondentes ao controle solvente de cada diluição de extrato estão nas Tabelas H1 a H6 no Apêndice H.

Inicialmente haviam sido definidas quatro concentrações de TCM (1,3; 4; 8 e 20%), que foram empregadas no DAF/BrEt 1 e DAF/BrEt 2, mas no DAF/BrEt 3 optou-se por excluir o TCM 1,3% visando utilizar a concentração mais diluída do extrato de *C. sativa* (0,3 mg/mL) na proporção de 4% em CSHT.

Ao se combinar os resultados dos 3 ensaios de citotoxicidade DAF/BrEt do extrato de *C. sativa* em TCM (Tabelas H1, H3 e H5 do Apêndice H), o controle celular TCM 1,3% e o extrato nas concentrações de CBD 0,3 mg/mL nas duas proporções de TCM utilizadas (1,3 e 4%) não foram citotóxicas nos 3 ensaios, não

induzindo decréscimo de viabilidade celular. As demais diluições de extrato de *C. sativa* correspondentes às concentrações de CBD 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL, bem como seus respectivos controles, TCM 4, 8 e 20% causaram percentual médio de citotoxicidade reduzido, abaixo de 1% que não foram significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ), conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 3 ensaios DAF/BrEt realizados

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR (%) <sup>6</sup>			MÉDIA ± EPM (%) <sup>7</sup>	Teste <i>t</i> (p) <sup>8</sup>
	Ensaio DAF/BrEt 1 <sup>1</sup>	Ensaio DAF/BrEt 2	Ensaio DAF/BrEt 3		
Controle celular	0,0	0,0	0,0	0,000 ± 0,000	-
<b>Concentrações de TCM<sup>2</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>3</sup></b>					
TCM 1,3%	0,0	0,0	-	0,000 ± 0,000	-
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	0,0	0,0	-	0,000 ± 0,000	-
TCM 4%	0,0	0,5	0,0	0,167 ± 0,002	-
CBD 0,3 mg/mL <sup>5</sup>	-	0,0	0,0	0,000 ± 0,000	-
CBD 1,0 mg/mL	1,0	1,0	0,0	0,667 ± 0,003	p = 0,1254
TCM 8%	1,5	0,5	0,0	0,667 ± 0,004	-
CBD 2,0 mg/mL	2,0	0,0	0,0	0,667 ± 0,007	p = 0,5000
TCM 20%	1,5	0,5	0,0	0,667 ± 0,004	-
CBD 5,0 mg/mL	1,5	0,5	0,5	0,833 ± 0,003	p = 0,3890

<sup>1</sup>Ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>2</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>3</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>4,5</sup>Concentração final de canabidiol de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 1,3% e em TCM 4%. <sup>6</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento e experimento para a determinação do percentual de células não viáveis. <sup>7</sup>Resultados expressos como percentual médio de letalidade celular ± erro padrão da média de n=3 ensaios independentemente realizados, com exceção de TCM 1,3%, CBD 0,3 mg/mL em TCM 1,3% e CBD 0,3 mg/mL em TCM 4% com n=2. <sup>8</sup>Valores de p no teste t de *Student* monocaudal.

Ao se combinar os resultados de dano ao DNA em UAT dos 3 EC independentemente realizados (Tabelas H2, H4 e H6 do Apêndice H) com o controle celular, o veículo TCM (1,3 a 20%) e com extrato de *C. sativa*, com concentrações de CBD 0,3 a 5 mg/mL verificou-se que o tratamento das CSHT com o TCM e o extrato de *C. sativa* em TCM não induziu dano significativo ao DNA ( $p > 0,05$ ) nas concentrações testadas quando comparadas aos controles celular e veículo TCM correspondente, respectivamente. O controle positivo MMS 80 µM induziu efeito genotóxico significativo ( $p < 0,05$ ) e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) para MMS 160 µM em relação ao controle celular (Tabela 4 e Figura 7).

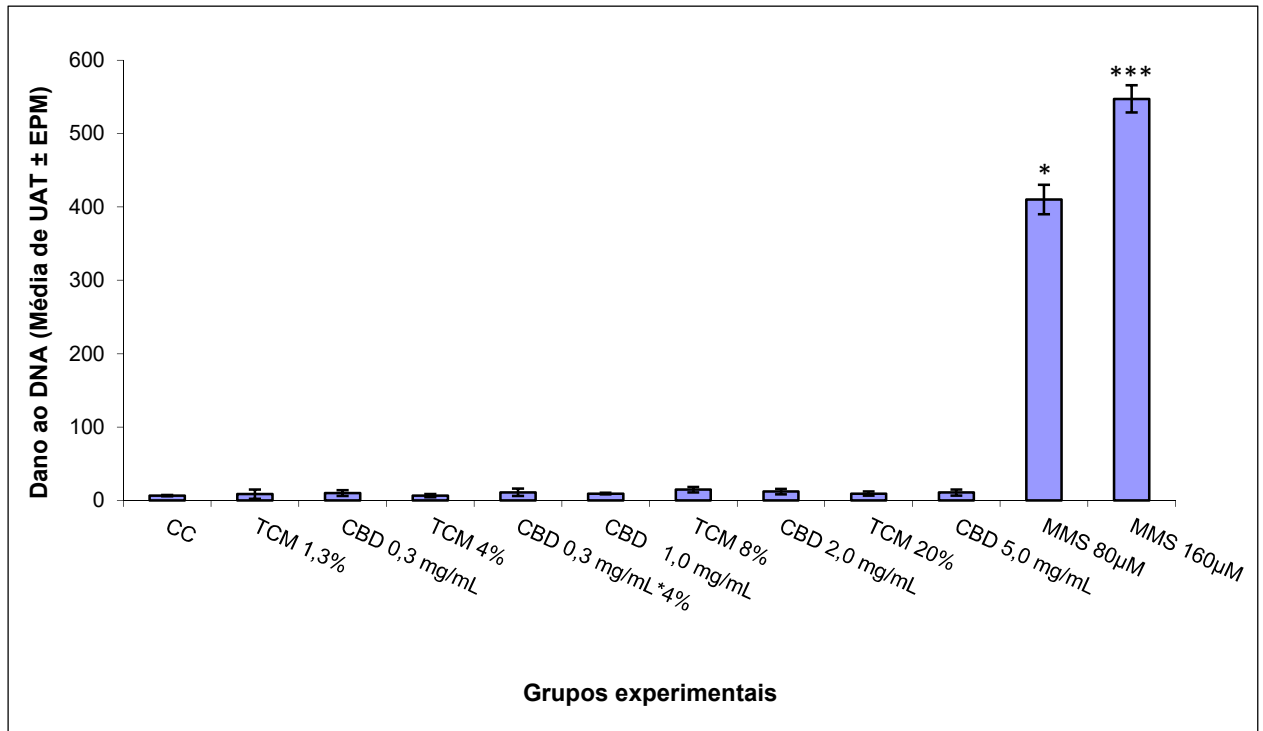
A Tabela 4 e a Figura 7 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média para os n = 3 ensaios realizados com o controle celular, com as quatro concentrações do TCM, excetuando TCM 1,3% (n = 2), as quatro diluições do extrato de *C. sativa* e com MMS 160 µM (n = 3), diferentemente de MMS 80 µM (n=2).

Tabela 4 – Ensaio Cometa do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Dano ao DNA em valores médios de Unidades Arbitrárias Totais (UAT) ± erro padrão da média (EPM). Combinação dos resultados dos 3 ensaios independentemente realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) <sup>1</sup>
<b><u>Controle:</u></b>			
Controle celular	6,33	0,88	-
<b><u>Concentrações: TCM<sup>2</sup> e extrato de Cannabis<sup>3</sup></u></b>			
TCM 1,3%	8,50	6,50	0,34636
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	10,00	4,00	0,43118
TCM 4%	6,67	2,19	0,44719
CBD 0,3 mg/mL <sup>5</sup>	11,00	5,00	0,21115
CBD 1,0 mg/mL	9,33	1,20	0,17264
TCM 8%	14,67	3,84	0,05108
CBD 2,0 mg/mL	12,00	3,61	0,31975
TCM 20%	9,33	2,85	0,18562
CBD 5,0 mg/mL	10,67	4,18	0,40250
<b><u>Controle positivo:</u></b>			
MMS 80 µM <sup>6</sup>	410,00	20,00	0,01560 *
MMS 160 µM <sup>2</sup>	547,33	18,35	0,00056***

<sup>1</sup>Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. <sup>2</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol no extrato de *C. sativa*. <sup>4</sup> Concentração final de canabidiol de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 1,3%. <sup>5</sup>Concentração final de CBD de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 4%. <sup>6</sup>Metanosulfonato de metila. Resultados expressos como valores médios de UAT ± erro padrão da média de n=3 ensaios independentemente realizados, com exceção de TCM 1,3%, CBD 0,3 mg/mL em TCM 1,3% e CBD 0,3 mg/mL em TCM 4% e MMS 80 µM (n=2). Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \* e \*\*\* indicam aumento de migração de DNA estatisticamente significativo (p<0,05) e extremamente significativo (p<0,001), respectivamente, em relação ao controle celular.

Figura 7 – Efeito do TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica



TCM: Triglicerídeos de cadeia média. CC: Controle celular. CBD: Concentração final de canabidiol no extrato de *C. sativa*. MMS: Metanosulfonato de metila. Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) de 3 ensaios Cometa realizados independentemente para todos os grupos, com exceção de TCM 1,3%, CBD 0,3 mg/mL em TCM 1,3% e CBD 0,3 mg/mL em TCM 4% e MMS 80 µM (n=2). Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \* e \*\*\* indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ), respectivamente, em relação ao controle celular.

### 3.2.1.3 Citotoxicidade e ensaio Cometa do extrato de *Cannabis sativa* com ativação metabólica

Os resultados dos ensaios DAF/BrEt e Cometa para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade de 3 substâncias, BrEt, benzo[a]pireno (BaP) e ciclofosfamida (CP) em C57BL/6, na presença da mistura S9, realizados para a definição do controle positivo a ser utilizado nos EC com o extrato de *C. sativa* na presença de ativação metabólica são mostrados nas Tabelas I1 e I2 no Apêndice I.

A partir destes ensaios escolheu-se como controle positivo, a CP 2,0 mM, que foi empregada nos 3 EC independentes do TCM e extrato de *C. sativa* na presença da mistura S9. A menor concentração de CP 1,0 mM foi também empregada nos próximos EC, pois no EC prévio mostrou uma tendência de aumento de migração do DNA em relação ao controle.

Os resultados dos três ensaios de citotoxicidade (DAF/BrEt 1, DAF/BrEt 2 e DAF/BrEt 3) e dos três EC (EC1, EC2 e EC3) do extrato de *C. sativa* e do veículo TCM em CSHT *in vitro* na presença da mistura S9, realizados com as mesmas concentrações correspondentes de CBD (0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL) e de TCM (4; 8 e 20%) dos ensaios anteriores são mostrados nas Tabelas J1 a J6 no Apêndice J.

A mistura S9 empregada como sistema exógeno de ativação metabólica foi preparada a partir da fração S9 obtida de fígado de ratos Wistar tratados pelo Aroclor 1254 adicionada dos cofatores D-glicose-6-fosfato e  $\beta$ -NADP, segundo a fórmula constante no Apêndice F. Em todos os ensaios, a concentração final de proteína da fração S9 em CSTH foi 1,16 mg/mL.

A Tabela 5 abaixo mostra a combinação dos resultados dos 3 ensaios DAF/BrEt realizados com o extrato de *C. sativa* na presença da mistura S9.

Tabela 5 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Combinação dos resultados dos 3 ensaios DAF/BrEt realizados.

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>6</sup> (%)			MÉDIA±EPM (%) <sup>7</sup>	Teste t (p) <sup>8</sup>
	Ensaio DAF/BrEt 1 <sup>1</sup>	Ensaio DAF/BrEt 2	Ensaio DAF/BrEt 3		
<b>Controle sem S9</b>					
Controle celular	0,0	0,0	0,0	0,000 ± 0,000	-
PBS	0,0	0,5	0,0	0,167 ± 0,002	
<b>Concentrações de TCM<sup>2</sup> sem S9</b>					
TCM 4%	2,0	1,0	0,5	1,167 ± 0,004	
TCM 8%	2,5	1,5	0,0	1,333 ± 0,007	
TCM 20%	4,0	2,5	0,5	2,333 ± 0,010	
<b>Controle positivo sem S9</b>					
CP <sup>3</sup> 1,0 mM	1,0	1,0	0,5	0,833 ± 0,002	0,0237 <sup>*</sup>
CP 2,0 mM	1,0	0,5	0,5	0,667 ± 0,002	0,0506
<b>Controle com S9</b>					
Controle celular	1,5	2,5	0,0	1,333 ± 0,007	
PBS	2,5	2,5	0,0	1,667 ± 0,008	0,0762
<b>Concentrações de TCM e extrato de <i>C. sativa</i><sup>4</sup> com S9</b>					
TCM 4%	1,5	0,5	1,0	1,000 ± 0,003	0,3838
CBD 0,3 mg/mL <sup>5</sup>	0,5	0,5	2,5	1,167 ± 0,007	0,4149
CBD 1,0 mg/mL	0,5	1,5	1,0	1,000 ± 0,003	0,5000
TCM 8%	3,0	1,5	2,0	2,167 ± 0,004	0,1912
CBD 2,0 mg/mL	2,0	2,5	1,5	2,000 ± 0,003	0,3838
TCM 20%	4,5	2,0	3,5	3,333 ± 0,007	0,2338
CBD 5,0 mg/mL	3,0	6,5	3,0	4,167 ± 0,012	0,2915
<b>Controle positivo com S9</b>					
CP 1,0 mM	1,5	0,0	1,0	0,833 ± 0,004	0,2133
CP 2,0 mM	1,5	0,0	0,0	0,500 ± 0,005	0,1481

<sup>1</sup>Ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>2</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>3</sup>Ciclofosfamida. <sup>4</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Molttox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>5</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>6</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento e experimento para a determinação do percentual de células não viáveis. <sup>7</sup>Resultados expressos como percentual médio de letalidade celular ± erro padrão da média de n=3 ensaios independentemente realizados. <sup>8</sup>Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. Pelo teste t de *Student*, o asterisco \* indica aumento de letalidade celular (p < 0,05) em relação ao controle solvente PBS sem S9.

Ao se combinar os resultados dos 3 ensaios DAF/BrEt para avaliação de citotoxicidade (Tabelas J1, J3 e J5 do Apêndice J), o controle celular sem S9 não foi citotóxico nos 3 ensaios não induzindo decréscimo de viabilidade celular. O controle solvente PBS sem S9 e o controle positivo (CP 1,0 e 2,0 mM) sem e com S9 causaram percentual médio de letalidade celular reduzido, abaixo de 1%. A concentração de CP 1,0 mM em C57BL/6J sem S9 foi a única considerada de reduzida citotoxicidade, pois o valor médio de letalidade celular causado foi significativamente maior do que o observado pelo controle PBS (p < 0,05). Diferentemente, CP 1,0 mM com S9 e CP 2,0 mM sem e com S9 não foram consideradas citotóxicas, pois os valores médios de letalidade não diferiram significativamente dos respectivos controles PBS (p > 0,05), conforme mostrado na Tabela 5.

As concentrações de TCM 4, 8 e 20% na ausência da mistura S9 apresentaram baixo percentual médio de letalidade (1,167 ± 0,004; 1,333 ± 0,007 e 2,333 ± 0,010).

Na presença da mistura S9, os controles (celular e PBS) apresentaram baixo percentual médio de letalidade celular, 1,333±0,007 e 1,667±0,008, respectivamente. O controle PBS com S9 não foi citotóxico em C57BL/6J (p > 0,05) quando comparado ao controle celular com S9.

As culturas tratadas com TCM 4, 8 e 20% com S9 apresentaram percentual médio de letalidade de 1,000 ± 0,003; 2,167 ± 0,004 e 3,333 ± 0,007 respectivamente. As três concentrações de TCM não foram citotóxicas quando comparadas aos respectivos controles (p > 0,1).

Os tratamentos com extrato de *C. sativa* com CBD 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL com S9, causaram percentual médio de letalidade celular de 1,167 ± 0,007; 1,000 ± 0,003; 2,000 ± 0,004 e 4,167 ± 0,012, respectivamente. As quatro diluições de extrato de *C. sativa* não foram citotóxicas em C57BL/6J quando comparadas aos respectivos controles TCM (Tabela 5).

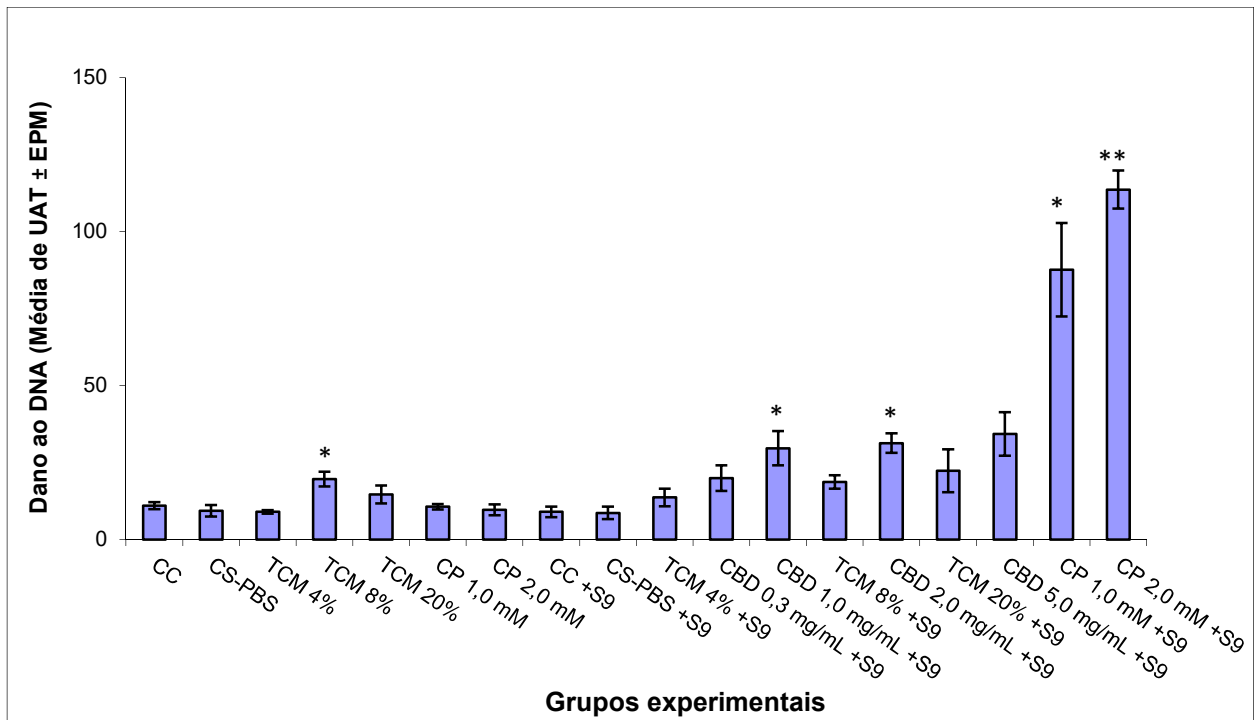
A Tabela 6 e a Figura 8 abaixo mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média para os três ensaios realizados com os controles celular e solvente PBS sem e com S9, com as três concentrações do TCM sem e com S9, as quatro diluições do extrato de *C. sativa* com S9 e com o controle positivo CP 1,0 e 2,0 mM sem e com S9.

Tabela 6 – Ensaio Cometa do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios  $\pm$  erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 3 ensaios realizados.

GRUPOS	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) <sup>1</sup>
<b>Controle sem S9</b>			
Controle celular	11,00	1,15	-
PBS	9,33	1,86	0,2441
<b>Concentrações de TCM <sup>2</sup> sem S9</b>			
TCM 4%	9,00	0,58	0,0981
TCM 8%	19,67	2,40	0,0157 *
TCM 20%	14,67	2,91	0,1530
<b>Controle positivo sem S9</b>			
CP <sup>3</sup> 1,0 mM	10,67	0,88	0,2759
CP 2,0 mM	9,67	1,76	0,4514
<b>Controle com S9 <sup>4</sup></b>			
Controle celular	9,00	1,73	0,1955
PBS	8,67	2,03	0,4101
<b>Concentrações de TCM e extrato de <i>C. sativa</i> <sup>5</sup> com S9</b>			
TCM 4%	13,67	2,85	0,0918
CBD 0,3 mg/mL	20,00	4,16	0,1388
CBD 1,0 mg/mL	29,67	5,55	0,0311 *
TCM 8%	18,67	2,19	0,3868
CBD 2,0 mg/mL	31,33	3,18	0,0152 *
TCM 20%	22,33	6,98	0,1841
CBD 5,0 mg/mL	34,33	7,06	0,1467
<b>Controle positivo com S9</b>			
CP 1,0 mM	87,67	15,19	0,0166 *
CP 2,0 mM	113,67	6,23	0,0029 **

<sup>1</sup>Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. <sup>2</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>3</sup>Ciclofosfamida. <sup>4</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Molttox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>5</sup> Extrato de *C. sativa* em TCM Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \* indica aumento de migração de DNA estatisticamente significativo (p<0,05) em relação ao controle celular sem S9 para TCM, em relação ao TCM com S9 para CBD, em relação ao PBS com S9 para CP, \*\* indicam aumento de migração de DNA altamente significativo (p<0,01) em relação ao controle PBS com S9.

Figura 8 – Efeito do TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas *in vitro* na presença de ativação metabólica



UAT: Unidades arbitrárias totais. EPM: Erro padrão da média. CC: Controle celular. CS: Controle solvente. TCM: Triglicerídeos de cadeia média. CP: Ciclofosfamida. S9: Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltax (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). CBD: Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) de três ensaios Cometa realizados independentemente. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \* indica aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle celular sem S9 para TCM, em relação ao TCM com S9 para CBD, em relação ao PBS com S9 para CP, \*\* indicam aumento de migração de DNA altamente significativo ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle PBS com S9.

Ao se combinar os resultados de dano ao DNA em UAT dos 3 EC independentemente realizados na presença da mistura S9 (Tabelas J2, J4 e J6 do Apêndice J) obtidos com os controles celular, o PBS e o veículo TCM (4, 8 e 20%) sem e com S9, apenas TCM 8% sem S9 induziu dano significativo ao DNA ( $p < 0,05$ ) em C57BL/6, quando comparado ao controle celular sem S9.

O extrato de *C. sativa* em TCM, com concentrações de CBD 0,3 a 5,0 mg/mL na presença de S9 induziu dano significativo ao DNA ( $p < 0,05$ ) em C57BL/6 nas concentrações de CBD 1,0 e 2,0 mg/mL testadas quando comparadas ao controle veículo TCM correspondente com S9.

A CP (1,0 mM e 2,0 mM) sem S9 não foi genotóxica ( $p > 0,1$ ). Na presença da mistura S9 CP 1,0 mM induziu efeito genotóxico significativo ( $p < 0,05$ ) e altamente



significativo ( $p < 0,01$ ) em C57BL/6 para CP 2,0 mM quando comparado ao controle solvente PBS com S9.

### 3.2.2 Ensaio de Micronúcleo pelo Bloqueio da Citocinese (EMnBC)

#### 3.2.2.1 *Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese sem ativação metabólica*

Os resultados do EMnBC-01 preliminar, com 3 substâncias, MMC 1,0 µg/mL, COL 0,02 µg/mL e MMS 80 µM em culturas de C57BL/6 na ausência da mistura S9, realizados para definir os controles positivos a serem utilizados nos EMnBC posteriores com o extrato de *C. sativa* em culturas de C57BL/6 sem ativação metabólica são mostrados na Tabela K1 no Apêndice K. Na Tabela K1 constam também os resultados da maior concentração do veículo do extrato (TCM 20%). O tratamento foi realizado em culturas em duplicata e as culturas sem tratamento foram empregadas como controle celular (CC). A cultura CC1 foi empregada como CC de COL e CC2 como CC para MMC, MMS e TCM.

Os resultados dos dois EMnBC (EMnBC-02 e EMnBC-03) realizados na ausência de ativação metabólica em C57BL/6, com cinco diluições do extrato de *C. sativa* em TCM expressas em concentrações de CBD (0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL) e com quatro concentrações do veículo TCM (2,5; 5; 10 e 20%), respectivamente, correspondentes ao controle solvente de cada diluição de extrato estão descritos nos itens 3.2.2.1.1 e 3.2.2.1.2, a seguir.

##### 3.2.2.1.1 EMnBC-02 com o extrato de *C. sativa* sem ativação metabólica

Os resultados do EMnBC-02 *in vitro*, em C57BL/6, na ausência de mistura S9, com o extrato de *C. sativa* em TCM, em 5 concentrações finais em termos de CBD (0,3, 0,6, 1,3, 2,5 e 5,0 mg/mL) ou com as 4 diferentes concentrações de TCM como controle solvente para CBD 0,3 e 0,6 mg/mL (TCM 2,5%), CBD 1,3 mg/mL (TCM 5%), CBD 2,5 mg/mL (TCM 10%) e CBD 5,0 mg/mL (TCM 20%) são mostrados na Tabela 7 a seguir. Além das culturas controle solvente foram empregadas como culturas controle negativas, a CC sem tratamento (CC1), como controle para TCM e para o controle positivo MMC 1,0 µg/mL, enquanto a cultura CC2 foi empregada como controle do controle positivo COL 0,02 µg/mL.

Tabela 7 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-02) do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas sem ativação metabólica

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS / 500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC <sup>1</sup>	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR <sup>2</sup> (%)	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)		TESTE QUI-QUADRADO (p) <sup>3</sup>
<b>Controle celular</b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
CC1 <sup>4</sup>	328	136	36	1,416	-	-	-	-	31	-
CC2 <sup>5</sup>	289	155	58	1,540	-29,76	129,76	-29,76	15	33	0,8010
<b>Concentrações de TCM<sup>6</sup> (%) e de extrato de <i>C. sativa</i><sup>7</sup> (mg/mL)</b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
TCM 2,5%	318	156	26	1,416	0	100	0	34		0,7075
CBD <sup>8</sup> 0,3 mg/mL	326	143	32	1,413	0,67	99,32	0,68	29		0,5255
CBD 0,6 mg/mL	323	143	34	1,422	- 1,44	101,44	- 1,44	31		0,7075
TCM 5% mg/mL	322	139	39	1,434	- 4,33	104,33	- 4,33	28		0,6940
CBD 1,3 mg/mL	314	159	27	1,426	1,84	98,16	1,84	35		0,3740
TCM 10%	331	138	31	1,400	3,85	96,15	3,85	31		1,000
CBD 2,5 mg/mL	336	133	31	1,390	6,25	93,75	6,25	47		0,0673
TCM 20%	347	124	29	1,364	12,5	87,5	12,5	34		0,7075
CBD 5,0 mg/mL	331	133	36	1,410	1,44	98,56	1,44	42		0,3542
<b>Controle positivo (µg/mL)</b>										
MMC <sup>9</sup> 1,0	356	115	29	1,346	16,83	83,17	16,83	91		< 0,0001****
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL <sup>10</sup> 0,02	355	100	45	1,380	29,63	70,40	29,6	45	145	< 0,0001**** (MONONUCLEADAS) < 0,0001**** (BINUCLEADAS)

<sup>1</sup>Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese: indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. <sup>2</sup>Índice de replicação: indica a proporção de ciclos de divisão celular completos por célula durante o período de exposição à citocalasina B em culturas tratadas quando comparadas às culturas controle. <sup>3</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>4</sup>Controle celular sem tratamento empregado para TCM (2,5; 5; 10 e 20%) e MMC (Mitomicina C). <sup>5</sup>Controle celular sem tratamento empregado para COL (Colcemid). <sup>6</sup>Triglicérides de cadeia média. <sup>7</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>8</sup>Concentração de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>9</sup>Mitomicina C. <sup>10</sup>Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao controle CC1 para MMC e em relação ao controle CC2 para COL.

Ausência de citotoxicidade foi evidenciada em CC2 em relação a CC1, em duas concentrações de TCM (2,5 e 5%) em relação ao CC1 e na diluição do extrato de *C. sativa* correspondente à concentração de CBD de 0,6 mg/mL em relação ao TCM 2,5% por apresentarem valores de IPBC e de %IR superiores aos dos respectivos controles.

Valores de citotoxicidade inferiores a 50%, medidos pelas reduções de IPBC e %IR em relação às culturas controle, na faixa de 0,67 a 6,25%, foram observados para as quatro concentrações de CBD 0,3 mg/mL (0,67%), CBD 1,3 mg/mL (1,84%) e CBD 2,5 mg/mL (6,25%) e CBD 5,0 mg/mL (1,44%). Citotoxicidade foi também observada para TCM 10% (3,85%), TCM 20% (12,5 %), como para os controles positivos, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL causando redução respectivamente de 16,83% e de 29,6% nos IPBC e %IR.

Pelo teste de Qui-Quadrado, não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,1$ ) no número de células micronucleadas em C57BL/6J nas culturas TCM (2,5 a 20%) em relação à CC1 e em culturas tratadas pelo CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) em relação aos respectivos controles solvente TCM ( $p > 0,05$ ). Os controles positivos, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL induziram aumentos extremamente significativos ( $p < 0,0001$ ) de células micronucleadas em células binucleadas e para ambas as células binucleadas e mononucleadas para a COL.

#### 3.2.2.1.2 EMnBC-03 com o extrato de *C. sativa* sem ativação metabólica

Baseado nos resultados de citotoxicidade do EMnBC-02 na ausência da mistura S9, no EMnBC-03 foram testadas as mesmas concentrações dos diferentes grupos empregadas no primeiro ensaio extrato de *C. sativa* sem ativação metabólica (EMnBC-02). Como não houve diferença significativa de CC2 com relação a CC1, a cultura CC2 foi excluída deste ensaio. Os resultados do EMnBC-03 são mostrados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-03) do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas na ausência de ativação metabólica

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS / 500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC <sup>1</sup>	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR <sup>2</sup> (%)	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)		TESTE QUI-QUADRADO (p) <sup>3</sup>
<b>Controle celular</b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
CC <sup>4</sup>	260	195	45	1,570	-		-	15	30	-
<b>Concentrações de TCM<sup>5</sup> (%) e de extrato de <i>C. sativa</i><sup>6</sup> (mg/mL)</b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
TCM 2,5%	269	173	58	1,578	-1,40	101,40	-1,40	29		0,8956
CBD <sup>7</sup> 0,3 mg/mL	309	145	46	1,474	17,99	82,01	17,99	31		0,4893
CBD 0,6 mg/mL	275	167	58	1,566	2,08	97,92	2,08	24		0,7947
TCM 5%	295	159	46	1,502	11,93	88,07	11,93	35		0,5318
CBD 1,3 mg/mL	255	166	79	1,648	-29,08	129,08	-29,08	29		0,4496
TCM 10%	256	189	55	1,598	-4,91	104,91	-4,91	27		0,6890
CBD 2,5 mg/mL	306	144	50	1,488	18,39	81,61	18,39	35		0,3059
TCM 20%	307	159	34	1,454	20,35	79,65	20,35	24		0,4110
CBD 5,0 mg/mL	330	139	31	1,402	11,45	88,55	11,45	37		0,1491
<b>Controle positivo (µg/mL)</b>										
MMC <sup>8</sup> 1,0	348	120	32	1,368	35,44	64,56	35,44	150		< 0,0001****
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL <sup>9</sup> 0,02	311	125	64	1,506	11,23	88,77	11,23	62	74	< 0,0001**** (MONONUCLEADAS) < 0,0001**** (BINUCLEADAS)

<sup>1</sup>Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese: indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. <sup>2</sup>Índice de replicação: indica a proporção de ciclos de divisão celular completos por célula durante o período de exposição à citocalasina B em culturas tratadas quando comparadas às culturas controle. <sup>3</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>4</sup>Controle celular sem tratamento empregado para TCM (2,5; 5; 10 e 20%), MMC (Mitomicina C) e COL (Colcemid). <sup>5</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>6</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>7</sup>Concentração de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>8</sup>Mitomicina C. <sup>9</sup>Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao controle CC para MMC 1,0 µg/mL e para COL 0,02 µg/mL.

No EMnBC-03, ausência de citotoxicidade foi evidenciada em duas concentrações de TCM (2,5 e 10%) e na diluição do extrato de *C. sativa* correspondente à concentração de CBD de 1,3 mg/mL por apresentarem valores de IPBC e de IR superiores aos dos seus respectivos controles.

Valores de citotoxicidade inferiores a 50%, medidos pelas reduções de IPBC e IR em relação às culturas controle, na faixa de 2,08 a 18,39 %, foram observados para as quatro concentrações de CBD no extrato de *C. sativa* 0,3 mg/mL (17,99%), CBD 0,6 mg/mL (2,08%) e CBD 2,5 mg/mL (18,39%) e CBD 5,0 mg/mL (11,45%). Citotoxicidade foi também observada para TCM 5% (11,93%) e TCM 20% (20,35%), como para os controles positivos, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL causando reduções respectivamente de 35,44% e de 11,23% nos IPBC e IR em relação ao CC sem tratamento.

Pelo teste de Qui-Quadrado não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,1$ ) no número de células micronucleadas em células sanguíneas humanas nas culturas TCM (2,5 a 10%) em relação ao CC1 sem tratamento e em culturas tratadas pelas 5 diferentes diluições de extrato de *C. sativa* correspondentes às 5 concentrações de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) em relação ao respectivo controle solvente TCM. Os controles positivos, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL induziram aumentos extremamente significativos ( $p < 0,0001$ ) de células micronucleadas em células binucleadas e também em células mononucleadas para a COL 0,02 µg/mL quando comparados aos resultados de MN em CC para células binucleadas e mononucleadas como mostrado na Tabela 8.

Neste segundo ensaio (EMnBC-03) confirmou-se o resultado negativo obtido no primeiro ensaio (EMnBC-02), quanto à mutagenicidade do extrato de *C. sativa* em TCM, na faixa de concentrações finais de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) em CSTH na ausência da mistura S9.

#### 3.2.2.1.3 Combinação dos EMnBC-02 e EMnBC-03 com o extrato de *C. sativa* sem ativação metabólica

A Tabela 9 e a Figura 9 abaixo mostram a combinação dos resultados dos 2 EMnBC na ausência de ativação metabólica, expressos como a frequência média de MN/2000 células binucleadas e o erro padrão da média.

Pelo teste de Qui-Quadrado não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,1$ ) na frequência média de MN / 2000 células binucleadas em C5TH nas culturas TCM (2,5 a 10%) em relação ao CC sem tratamento e em culturas tratadas pelas 5 diferentes diluições de extrato de *C. sativa* e correspondentes às 5 concentrações de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) em relação aos respectivos controles solvente TCM. Os controles positivos, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL induziram aumentos extremamente significativos ( $p < 0,0001$ ) da frequência média de MN em células binucleadas.

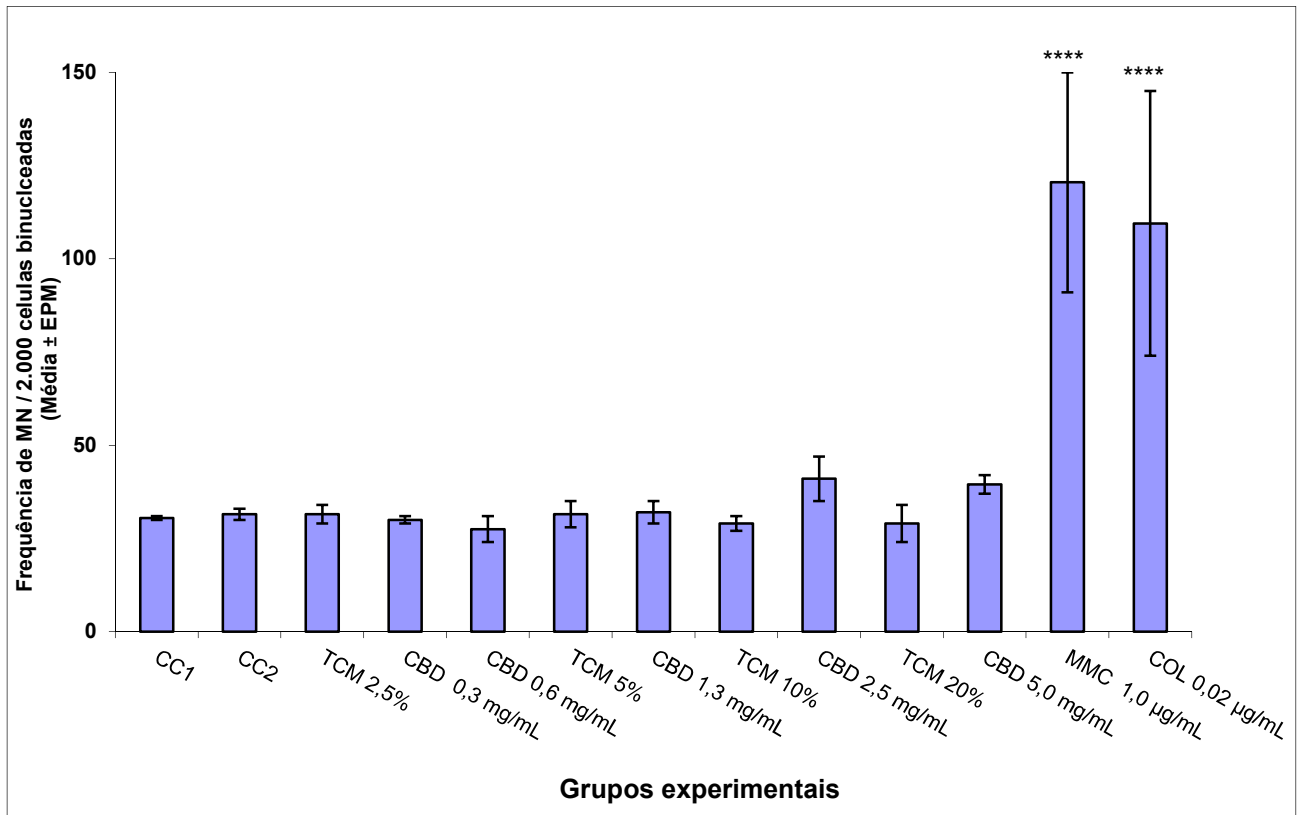
A combinação dos resultados dos dois EMnBC ((EMnBC-02 e EMnBC-03 em Tabelas 7 e 8, respectivamente) realizados *in vitro* em culturas de C5TH (Tabela 9) mostrou que o tratamento por 4h com o extrato de *C. sativa* em TCM, na faixa de concentrações finais de CBD de 0,3 a 5,0 mg/mL, na ausência de mistura S9, não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em linfócitos humanos sendo, portanto, não clastogênico e/ou aneugênico nas condições experimentais descritas.

Tabela 9 – Ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Frequência de micronúcleos (FMN) / 2000 células binucleadas (CBN)		Média FMN / 2000 CBN	Erro padrão da média FMN / 2000 CBN	Teste Qui-Quadrado (p) <sup>1</sup>
	EMnBC-02	EMnBC-03			
<b><u>Controle celular</u></b>					
CC1 <sup>2</sup>	31	30	30,5	0,50	-
CC2 <sup>3</sup>	33	30	31,5	1,50	0,4694
<b><u>Concentrações de TCM<sup>4</sup> (%) e de extrato de <i>C. sativa</i><sup>5</sup> (mg/mL)</u></b>					
TCM 2,5%	34	29	31,5	2,50	0,4694
CBD <sup>6</sup> 0,3 mg/mL	29	31	30,0	1,00	0,5120
CBD 0,6 mg/mL	31	24	27,5	3,50	0,8989
TCM 5%	28	35	31,5	3,50	0,4694
CBD 1,3 mg/mL	35	29	32,0	3,00	1,000
TCM 10%	31	27	29,0	2,00	0,2675
CBD 2,5 mg/mL	47	35	41,0	6,00	0,1479
TCM 20%	34	24	29,0	5,00	0,2675
CBD 5,0 mg/mL	42	37	39,5	2,50	0,1816
<b><u>Controle positivo (µg/mL)</u></b>					
MMC <sup>7</sup> 1,0	91	150	120,5	29,50	< 0,0001****
COL <sup>8</sup> 0,02	145	74	109,5	35,50	< 0,0001****

<sup>1</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>2</sup>Controle celular sem tratamento empregado para TCM (2,5; 5; 10 e 20%) e MMC (Mitomicina C). <sup>3</sup>Controle celular sem tratamento empregado para COL (Colcemid®) no EMnBC-02, no EMnBC-03 corresponde à repetição do valor de CC1 <sup>4</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>5</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>6</sup>Concentração de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>7</sup>Mitomicina C. <sup>8</sup>Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de frequência de micronúcleos (MN) extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle CC1 para MMC e em relação ao controle CC2 para COL.

Figura 9 – Efeito do TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na frequência de formação de micronúcleos no ensaio *in vitro* de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) em células sanguíneas humanas na ausência de ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados



TCM: Triglicerídeos de cadeia média. CC: Controle celular. CBD: Concentração final de canabidiol no extrato de *C. sativa*. MMC: Mitomicina C. COL: Colcemid 0,02 µg/ML. Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das frequências de micronúcleos (MN) / 2000 células binucleadas de dois EMnBC realizados independentemente. Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de frequência de MN extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) em relação ao CC1 e CC2 para MMC e COL, respectivamente.

### 3.2.2.2 Ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese com ativação metabólica

Os resultados do EMnBC-04 preliminar, com a CP em 2 concentrações (5 e 10 µg/mL) com mistura S9, para definição do controle positivo a ser utilizado nos EMnBC com ativação metabólica, bem como, com as culturas tratadas com CC1, CP

(5 e 10 µg/mL), MMC (1,0 µg/mL) e COL (0,02 µg/mL) sem mistura S9 são mostrados na Tabela L1, no Apêndice L.

Os resultados dos dois EMnBC (EMnBC-05 e EMnBC-06) realizados na presença de mistura S9 em C57BL/6, com as cinco diluições do extrato de *C. sativa* em TCM expressas em concentrações de CBD (0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL) e com as quatro concentrações do veículo TCM (2,5; 5; 10 e 20%), respectivamente, correspondentes ao controle solvente de cada diluição de extrato estão descritos nos itens 3.2.2.2.1 e 3.2.2.2.2, a seguir.

A composição da mistura S9, preparada a partir da fração S9 de fígado de ratos Wistar tratados pelo Aroclor 1254 e adicionada dos cofatores D-glicose-6-fosfato (5 mM) e β-NADP (4 mM) e contendo 3,84 mg de proteína/mL está descrita no Apêndice F. Em todos os EMnBC, na presença de ativação metabólica, a concentração final de proteína da fração S9 em culturas de C57BL/6 foi 0,66 mg/mL.

#### 3.2.2.2.1 EMnBC-05 com o extrato de *C. sativa* com ativação metabólica

Os resultados do EMnBC-05 *in vitro*, em C57BL/6, na presença de mistura S9, com as cinco diluições do extrato de *C. sativa* em TCM, correspondentes às concentrações finais de CBD no extrato de 0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL, ou com as 4 diferentes concentrações de TCM (2,5, 5, 10 e 20%) como controle solvente para o extrato, ou com as culturas sem tratamento e sem S9 (CC1), ou com S9 (CC2 +S9), como controles para CC2 e para TCM e CP, respectivamente, ou com o controle positivo CP (10 µg/mL) são mostrados na Tabela 10 abaixo.

Ausência de citotoxicidade foi evidenciada na CC2 + S9 em relação a CC1 e nas 2 concentrações de CBD no extrato (0,3 e 2,5 mg/mL) + S9 em relação aos respectivos controles (TCM 2,5 e 10%) +S9.

Valores de citotoxicidade inferiores a 50%, medidos pelas reduções de IPBC e %IR em relação às culturas controle foram observados para as concentrações de CBD no extrato, de 0,6 mg/mL (14,29%), 1,3 mg/mL (17,99%) e 5,0 mg/mL (4,33%), para os controles solvente TCM 2,5 % (10,33%), TCM 5,0% (1,24%), TCM 10% (15,70%) e TCM 20% (14,05%) e para a CP 10 µg/mL (11,98%) em relação à cultura CC2 sem tratamento com mistura S9.

Neste primeiro ensaio do extrato de *C. sativa* na presença da mistura S9, pelo teste de Qui-Quadrado, não foram detectadas diferenças significativas ( $p = 0,1$ ) no



número de células micronucleadas em CC2 + S9 em relação ao CC1 sem S9, nas culturas TCM (2,5; 5; 10; 20%) com S9 em relação ao CC2 + S9 e nas culturas tratadas com CBD no extrato (0,3 a 5,0 mg/mL) com S9 em relação aos correspondentes controles TCM (2,5 a 20%) com S9 ( $p > 0,1$ ). O controle positivo CP (10  $\mu\text{g/mL}$ ) induziu aumento extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) de células micronucleadas em relação ao CC2 +S9.

Baseado nos resultados de citotoxicidade obtidos no EMnBC-05 na presença de S9, todos os grupos nas mesmas concentrações foram testados no segundo ensaio com S9 (EMnBC-06).

Tabela 10 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-05) do extrato de *Cannabis sativa* na presença de ativação metabólica em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS / 500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS	
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC <sup>1</sup>	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR <sup>2</sup> (%)	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN) / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	TESTE QUI-QUADRADO (p) <sup>3</sup>
<b>Controle celular</b>									
CC1 <sup>4</sup>	342	138	20	1,356	-	-	-	21	-
CC2 <sup>5</sup> + S9 <sup>6</sup>	313	132	55	1,484	-35,96	135,96	-35,96	33	0,1001
<b>Concentrações de TCM <sup>7</sup> (%) e de extrato de <i>C. sativa</i> <sup>8</sup> (mg/mL) com S9</b>									
TCM 2,5%	326	131	43	1,434	10,33	89,67	10,33	32	0,9005
CBD <sup>9</sup> 0,3 mg/mL	318	142	40	1,444	-2,30	102,30	-2,30	31	0,8989
CBD 0,6 mg/mL	352	110	38	1,372	14,29	85,71	14,29	39	0,4019
TCM 5%	312	137	51	1,478	1,24	98,76	1,24	40	0,4083
CBD 1,3 mg/mL	336	132	32	1,392	17,99	82,01	17,99	37	0,7299
TCM 10%	329	138	33	1,408	15,70	84,30	15,70	30	0,7032
CBD 2,5 mg/mL	333	120	47	1,428	-4,90	104,90	-4,90	40	0,2279
TCM 20%	330	132	38	1,416	14,05	85,95	14,05	30	0,7032
CBD 5,0 mg/mL	342	117	41	1,398	4,33	95,67	4,33	25	0,4972
<b>Controle positivo (µg/mL) com S9</b>									
CP <sup>10</sup> 10	332	123	45	1,426	11,98	88,02	11,98	116	< 0,0001****

<sup>1</sup>Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese: indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. <sup>2</sup>Índice de replicação: indica a proporção de ciclos de divisão celular completos por célula durante o período de exposição à citocalasina B em culturas tratadas quando comparadas às culturas controle. <sup>3</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>4</sup>Controle celular sem tratamento empregado para CC2 + S9. <sup>5</sup>Controle celular sem tratamento com S9 empregado para TCM e CP. <sup>6</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltax (concentração final de proteína: 0,66 mg/mL). <sup>7</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>8</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>9</sup>Concentração final de canabidiol (CBD) no extrato de *C. sativa*. <sup>10</sup>Ciclofosfamida. Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao CC2 +S9.

### 3.2.2.2.2 EMnBC-06 com o extrato de *C. sativa* com ativação metabólica

Os resultados do EMnBC-06 são mostrados na Tabela 11 abaixo.

Ausência de citotoxicidade foi evidenciada nas diluições de extrato de *C. sativa* correspondentes às concentrações de CBD de 0,6; 2,5 e 5,0 mg/mL em relação aos respectivos controles de TCM 2,5%, TCM 10% e TCM 20% na presença da mistura S9. O controle positivo CP 10 µg/mL também não foi citotóxico em C57BL/6 quando comparado ao CC2 na presença da mistura S9.

Valores de citotoxicidade inferiores a 50%, medidos pelas reduções de IPBC e %IR em relação às respectivas culturas controle foram observados para as diluições de extrato de *C. sativa* correspondentes às concentrações de CBD 0,3 mg/mL (1,79%), CBD 1,3 mg/mL (0,60%), para o controle solvente TCM 2,5 e 5% (10,16%), TCM 10% (18,18%), TCM 20% (18,72%) e para a cultura CC2 na presença da mistura S9 (4,59%).

Como no primeiro ensaio com S9 (EMnBC-05), não foram detectadas diferenças significativas pelo teste Qui-Quadrado ( $p > 0,1$ ) neste segundo ensaio com S9 (EMnBC-06), no número de células micronucleadas em CC2 em relação a CC1, nas 4 culturas de TCM (2,5 a 20%) em relação à CC2+S9 e nas 5 diluições do extrato de *C. sativa* correspondendo às concentrações de CBD de 0,3 a 5,0 mg/mL no extrato de *C. sativa* em relação à TCM+S9. O controle positivo CP (10 µg/mL) também induziu aumento extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) de células micronucleadas em relação ao CC2 +S9.

Logo, neste segundo ensaio (EMnBC-06) confirmou-se o resultado negativo obtido no primeiro ensaio (EMnBC-05), quanto à genotoxicidade do extrato de *C. sativa* em TCM, na faixa de concentrações finais de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) em C57BL/6 na presença da mistura S9.

Tabela 11 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-06) do extrato de *Cannabis sativa* na presença de ativação metabólica em células sanguíneas humanas

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS / 500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS	
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC <sup>1</sup>	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR <sup>2</sup> (%)	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN) / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	TESTE QUI-QUADRADO (p) <sup>3</sup>
<b>Controle celular</b>									
CC1 <sup>4</sup>	329	146	25	1,392				29	-
CC2 <sup>5</sup> + S9 <sup>6</sup>	341	131	28	1,374	4,59	95,41	4,59	40	0,1816
<b>Concentrações de TCM <sup>7</sup> (%) e de extrato de <i>C. sativa</i> <sup>8</sup> (mg/mL) com S9</b>									
TCM 2,5%	350	132	18	1,336	10,16	89,84	10,16	39	0,9095
CBD <sup>9</sup> 0,3 mg/mL	368	99	33	1,330	1,79	98,21	1,79	36	0,7266
CBD 0,6 mg/mL	360	105	35	1,350	-4,17	104,17	-4,17	37	0,8168
TCM 5%	355	122	23	1,336	10,16	89,84	10,16	32	0,3414
CBD 1,3 mg/mL	363	107	30	1,334	0,60	99,40	0,60	30	0,7980
TCM 10%	371	105	24	1,306	18,18	81,82	18,18	28	0,1422
CBD 2,5 mg/mL	332	143	25	1,386	-26,14	126,14	-26,14	31	0,6940
TCM 20%	364	120	16	1,304	18,72	81,28	18,72	28	0,1422
CBD 5,0 mg/mL	355	110	35	1,360	-18,42	118,42	-18,42	40	0,1422
<b>Controle positivo (µg/mL)</b>									
CP <sup>10</sup> 10 + S9	354	95	51	1,394	-5,35	105,35	-5,35	84	< 0,0001****

<sup>1</sup>Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese: indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. <sup>2</sup>Índice de replicação: indica a proporção de ciclos de divisão celular completos por célula durante o período de exposição à citocalasina B em culturas tratadas quando comparadas às culturas controle. <sup>3</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>4</sup>Controle celular sem tratamento empregado para CC2 + S9. <sup>5</sup>Controle celular sem tratamento com S9 empregado para TCM e CP (ciclofosfamida) <sup>6</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 0,66 mg/mL). <sup>7</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>8</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>9</sup>Concentração final de canabidiol (CBD) no extrato de *C. sativa*. <sup>10</sup>Ciclofosfamida. Pelo teste de Qui-Quadrado. \*\*\*\* indica aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao CC2 +S9.

### 3.2.2.2.3 Combinação dos EMnBC-05 e EMnBC-06 com o extrato de *C. sativa* com ativação metabólica

A Tabela 12 e a Figura 10 abaixo mostram a combinação dos resultados dos 2 EMnBC na presença da mistura S9, expressos como a frequência média de MN/2000 células binucleadas e o erro padrão da média.

Pelo teste de Qui-Quadrado não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,1$ ) na frequência média de MN em C57H nas culturas TCM (2,5 a 10%) em relação ao CC sem tratamento com S9 (CC2) e em culturas tratadas pelas 5 diferentes diluições de extrato de *C. sativa* e correspondentes às 5 concentrações de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) em relação ao respectivo controle solvente TCM com a fração S9. O controle positivo, CP (10 µg/mL) com S9 induziu aumento extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) na frequência média de MN em relação ao CC2 + S9.

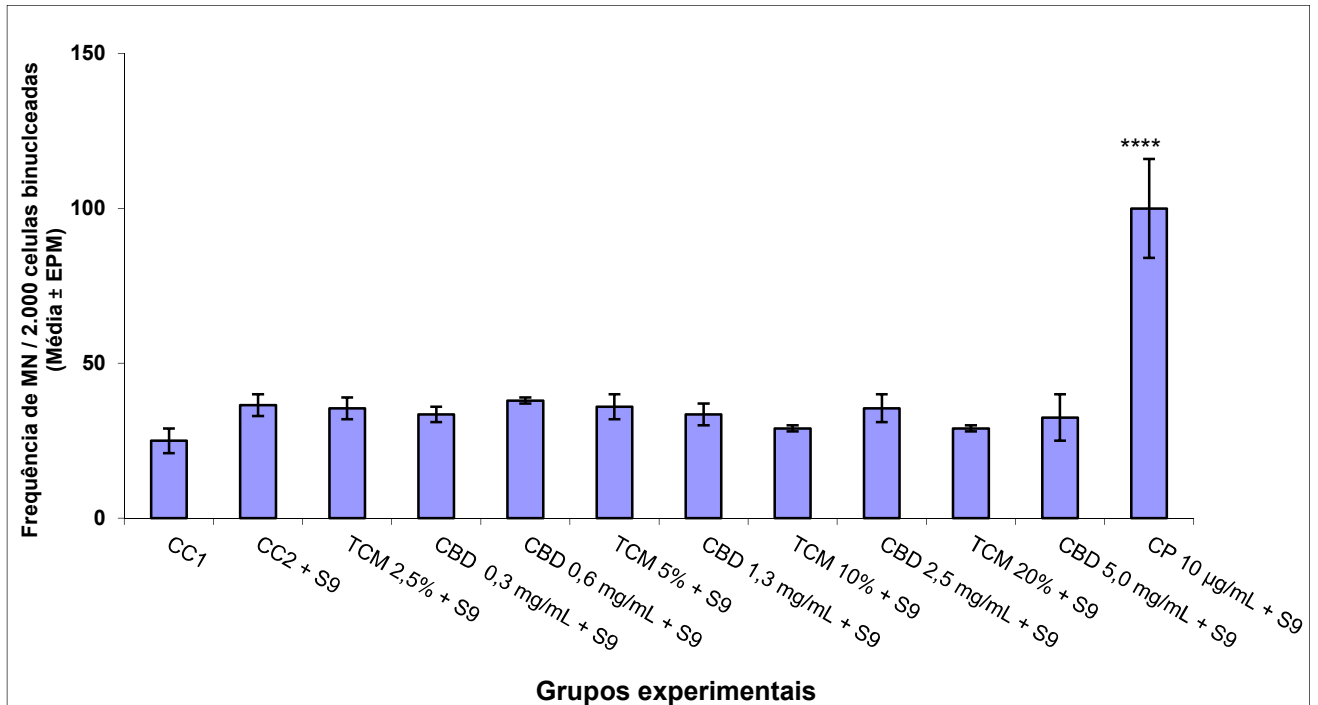
A combinação dos resultados dos dois EMnBC com S9 (EMnBC-05 e EMnBC-06) e dos dois EMnBC sem S9 (EMnBC-02 e EMnBC-03) realizados *in vitro* em culturas de C57H mostrou que o tratamento por 4h com o extrato de *C. sativa* em TCM, na faixa de concentrações finais de CBD correspondentes, de 0,3 a 5,0 mg/mL, na presença e ausência de ativação metabólica (mistura S9), não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em linfócitos humanos. Logo, concluiu-se que o extrato de *C. sativa* em TCM, nas 5 diluições testadas foi considerado não mutagênico em C57H não induzindo efeitos clastogênico e/ou aneugênico em linfócitos humanos, na presença e ausência da mistura S9 e nas condições experimentais descritas neste trabalho.

Tabela 12 – Ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na presença de ativação metabólica em células sanguíneas humanas *in vitro*. Combinação dos resultados dos 2 EMnBC realizados.

GRUPOS	Frequência de micronúcleos (FMN) / 2000 células binucleadas (CBN)		Média FMN / 2000 CBN	Erro padrão da média FMN / 2000 CBN	Teste Qui-Quadrado (p) <sup>1</sup>
	EMnBC-05	EMnBC-06			
<b>Controle celular</b>					
CC1 <sup>2</sup>	21	29	<b>25,0</b>	<b>4,00</b>	-
CC2 <sup>3</sup> + S9	33	40	<b>36,5</b>	<b>3,50</b>	0,1246
<b>Concentrações de TCM<sup>4</sup> (%) e de extrato de <i>C. sativa</i><sup>5</sup> (mg/mL) com S9<sup>6</sup></b>					
TCM 2,5%	32	39	<b>35,5</b>	<b>3,50</b>	0,9060
CBD <sup>7</sup> 0,3 mg/mL	31	36	<b>33,5</b>	<b>2,50</b>	0,8094
CBD 0,6 mg/mL	39	37	<b>38,0</b>	<b>1,00</b>	0,8145
TCM 5%	40	32	<b>36,0</b>	<b>4,00</b>	0,9060
CBD 1,3 mg/mL	37	30	<b>33,5</b>	<b>3,50</b>	0,8094
TCM 10%	30	28	<b>29,0</b>	<b>1,00</b>	0,3207
CBD 2,5 mg/mL	40	31	<b>35,5</b>	<b>4,50</b>	0,3814
TCM 20%	30	28	<b>29,0</b>	<b>1,00</b>	0,3207
CBD 5,0 mg/mL	25	40	<b>32,5</b>	<b>7,50</b>	0,6087
<b>Controle positivo (µg/mL) com S9</b>					
CP <sup>8</sup> 10µg/mL + S9	116	84	<b>100,0</b>	<b>16,00</b>	< 0,0001****

<sup>1</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>2</sup>Controle celular sem tratamento empregado para CC2 + S9. <sup>3</sup>Controle celular sem tratamento com S9 empregado para TCM e CP (ciclofosfamida). <sup>4</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>5</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>6</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 0,66 mg/mL). <sup>7</sup>Concentração final de canabidiol (CBD) no extrato de *C. sativa*. <sup>8</sup>Ciclofosfamida. Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de frequência média de micronúcleos extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao CC2 +S9.

Figura 10 – Efeito do TCM e do extrato de *Cannabis sativa* na frequência de formação de micronúcleos no ensaio *in vitro* de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (EMnBC) em células sanguíneas humanas *in vitro* na presença de ativação metabólica. Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.



TCM: Triglicerídeos de cadeia média. CC: Controle celular. CBD: Concentração final de canabidiol no extrato de *C. sativa*. CP: Ciclofosfamida. S9: Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Molttox (concentração final de proteína: 0,66 mg/mL). Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das frequências de micronúcleos (MN) / 2000 células binucleadas de dois EMnBC realizados independentemente. Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\*\* indica aumento de frequência de MN extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) em relação ao CC2 + S9.

### 3.3 Discussão

#### 3.3.1 Citotoxicidade e genotoxicidade do triglicerídeos de cadeia média (TCM)

Os extratos de *C. sativa* utilizados no Brasil para tratamento de epilepsias refratárias consistem em produtos importados e registrados no país de origem como suplementos alimentares ou de extratos artesanais elaborados pelas famílias de pacientes, incluindo-se as preparações elaboradas através do projeto Farmacannabis (CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017). Os extratos preparados na UFRJ através deste projeto utilizam como veículo oleoso, o TCM, por ser o mais empregado nos produtos importados, conforme descrito em seus rótulos (CARVALHO *et al.*, 2020).

Os TCMs são triglicerídeos compostos principalmente por ácidos graxos caprílico (C<sub>8</sub>: 50-80%), cáprico (C<sub>10</sub>: 20-50%) e em menores quantidades pelos ácidos graxos capríco (C<sub>6</sub>: 1-2%) e láurico (C<sub>12</sub>: 1-2%) (BACH; BABAYAN, 1982). Os TCMs passaram a ser utilizados na área médica, em substituição aos triglicerídeos de cadeia longa (TCL), em distúrbios de absorção de lipídios, além de serem usados como um “placebo” em testes clínicos de lipídios. Desde então, os TCMs, derivados de óleos de coco e de palmiste, têm sido empregados nas áreas alimentícia e de nutrição. O principal uso é como emulsificante em preparações farmacêuticas, humanas e veterinárias, e em cosméticos; e ainda, em um número crescente de aplicações alimentícias. A partir de 1994 foi aprovado o uso de TCMs em produtos alimentícios pela Agência de Alimentos e Drogas dos EUA (FDA) *Food and Drug Administration* (TRAUL *et al.*, 2000; FERGUSON *et al.*, 2016).

O menor peso molecular de TCM em relação ao TCL facilita a ação da lipase pancreática que cliva o TCM em ácidos graxos e diglicerídeo (OOI *et al.*, 2015). Conseqüentemente, TCMs são hidrolisados mais rapidamente e completamente do que os TCLs e tão rapidamente como a glicose (OOI *et al.*, 2015). A vida média dos TCMs foi estimada ser de 11 min. (MINGRONE *et al.*, 1995). Após a absorção, TCMs são secretados diretamente na circulação portal sem sofrer esterificação no enterócito. Devido a sua solubilidade em água, TCMs não necessitam de ligação às albuminas plasmáticas para serem transportados dos capilares aos tecidos periféricos. Semelhantemente aos TCL, também sofrem oxidação na mitocôndria, mas não requerem carnitina para o transporte mitocondrial. Todos estes fatores



resultam no rápido metabolismo de TCMs o que justifica o seu uso na nutrição clínica e nutrição parenteral, bem como o seu emergente papel no controle de peso (MUMME; STONEHOUSE, 2015).

No presente estudo, o TCM ultrapurificado obtido de óleo de coco foi empregado como veículo do extrato de *C. sativa*, nas diluições do extrato e como controle solvente em todos os ensaios realizados. De acordo com as informações do fabricante, o TCM utilizado contém 80% de ácido graxo caprílico e 20% de ácido cáprico. Em dois ensaios realizados, o TCM nas 5 concentrações testadas (2,5; 5; 10; 20 e 50%) causaram no máximo 6,5% de letalidade em C57BL/6J (TCM 10%). Este valor de citotoxicidade não foi concentração-dependente, pois nas duas maiores concentrações de 20% e 50% de TCM induziram no máximo, 3 e 2% de letalidade celular, respectivamente. Na mesma faixa de concentrações, o TCM não foi genotóxico não causando quebras de fita de DNA.

Nos 3 ensaios com o extrato de *C. sativa* em TCM, o TCM como controle solvente (1,3; 4,0; 8,0 e 20%) sem a mistura S9, não foi citotóxico na menor concentração de TCM (1,3%) em C57BL/6J e nas concentrações superiores causou valores médios de letalidade muito reduzidos, inferiores a 1%, como  $0,167 \pm 0,002\%$  (TCM 4%) e de  $0,667 \pm 0,004$  para TCM 8 e 20%. Na presença da mistura S9, em 3 ensaios, o TCM (4, 8 e 20%) não foi citotóxico ( $p > 0,1$ ) quando comparado ao controle celular com S9. Nas faixas de concentrações de TCM acima mencionadas, o TCM, na ausência e presença da mistura S9, não foi genotóxico não causando quebras de fita de DNA em C57BL/6J.

Durante o bloqueio da citocinese, na ausência da mistura S9, em 2 ensaios o TCM (2,5; 5,0; 10 e 20%), não foi citotóxico na concentração de 2,5% não causando reduções do IPBC e do % de IR dos linfócitos humanos quando comparados ao controle celular. O valor máximo de citotoxicidade (20,35%) ocorreu na maior concentração de TCM (20%). Na presença da mistura S9, todas as concentrações de TCM (2,5 a 20%) foram citotóxicas sendo a maior citotoxicidade (18,72%) causada por TCM 20%. Os valores máximos de citotoxicidade (20,35% e 18,72%) causados por 20% de TCM, foram cerca de 2,5 vezes inferiores ao limite de 50% de citotoxicidade recomendada para a análise de MN pelo ICHS2(R1), logo foram empregadas nos EMnBC (ICH, 2011). O TCM (2,5 a 20%), na ausência e presença de mistura S9 não foi mutagênico (clastogênico e/ou aneugênico) não causando respectivamente, quebras e/ou perda de cromossomos em linfócitos humanos.

Ausência de mutagenicidade foi também observada em 3 cepas de *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537 e TA1538) e em cepa D4 de *Sacharomyces cerevisiae*, com e sem ativação metabólica, para o ácido caprílico, ácido graxo predominante (80%) no TCM empregado no presente estudo (BRUSICK, 1976).

O óleo TCM tem um perfil de segurança adequado e uma longa utilização em ensaios clínicos (TSAI *et al.*, 1999; TRAU *et al.*, 2000; MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMIR, 2006; OZTURK *et al.*, 2015).

TRAU e colaboradores (2000) revisaram os dados de segurança de vários estudos com TCM em animais e em humanos. Um grande número de estudos em animais e humanos examinaram vários aspectos metabólicos e de saúde geral relativos ao consumo de TCM. Embora a maioria desses estudos não avalie diretamente a segurança toxicológica dos TCMs, documentam o consumo histórico seguro e generalizado de TCMs. O perfil toxicológico para o TCM foi obtido a partir de estudos que utilizaram os ácidos graxos caprílico ou cáprico purificados, além de estudos envolvendo vários TCMs de ésteres mistos.

Segundo TRAU e colaboradores (2000), os TCMs não foram tóxicos em testes de toxicidade aguda em várias espécies de animais. A administração intravenosa (iv) ou na dieta de TCM não afetou o desempenho reprodutivo de ratos ou resultou em toxicidade materna, toxicidade fetal ou efeitos teratogênicos em doses de até 4,28 g/kg de peso corporal / dia (iv) ou 12,5 g/kg de peso corporal / dia (dieta). A dieta com TCM também não alterou o desempenho reprodutivo de suínos ou resultou em toxicidade materna, toxicidade fetal ou efeitos teratogênicos em doses de até 4 g/kg de peso corporal /dia na dieta. Em coelhos, após a administração iv, os níveis maternos e fetais de efeitos adversos não observados (NOAELs) foram 1,0 e 4,28 g/kg de peso corporal /dia.

Um estudo de 2 anos em ratos F344/N, com um componente do TCM, a tricaprilina, um triglicerídeo no qual todos os três ácidos graxos são o ácido caprílico (C<sub>8</sub>), não mostrou efeito carcinogênico quando administrado por via oral (gavagem) em níveis de até 10 mL/kg (9,54 g/kg) por dia. No teste de Ames, no método de incorporação em placa, tricaprilina não foi mutagênica em cepas TA97, TA98 e TA100 de *S. typhimurium* com e sem ativação metabólica, não mutagênica em TA 1535 sem S9, porém mutagênica em TA1535 com S9 (NTP, 1994). Apesar de tricaprilina ser positiva em TA1535 com S9, este dado não parece sugerir que deva ser classificada como mutagênica. Dados adicionais em outros ensaios de

genotoxicidade *in vitro* ou *in vivo* são necessários para confirmar esta hipótese (TRAUL *et al.*, 2000). O teste de carcinogenicidade com tricaprilina e os testes de mutagenicidade com ácido caprílico indicam que os TCMs não têm potencial cancerígeno ou mutagênico. O consumo alimentar de TCM foi seguro até níveis de 1 g/kg para humanos, o que foi confirmado em vários ensaios clínicos (TRAUL *et al.*, 2000).

Concluindo, os TCMS apresentam níveis muito baixos de toxicidade em animais de laboratório e em humanos quando administrados por via oral, parenteral ou dérmica. De acordo com os estudos mostrados por Traul e colaboradores (2000), os TCMs apresentam pouco ou nenhum risco de toxicidade quando consumidos como um suplemento alimentar. Os nossos resultados de citotoxicidade e de genotoxicidade de TCM estão de acordo com os dados apresentados.

Em estudo duplo-cego, randomizado com um total de 30 voluntários sadios (15 de cada sexo) com idades entre 20 e 65 anos de idade, Ferguson e colaboradores (2016) compararam os efeitos da ingestão de TCM como placebo com a ingestão de suplemento de omega-3 quanto aos perfis de ácidos graxos, colesterol HDL e LDL e proteína C-reativa (PCR) como marcador de inflamação. Os resultados mostraram que não houve alterações significativas no colesterol HDL ou LDL e na PCR. No entanto, verificou-se um efeito adverso inesperado do óleo TCM como placebo, uma vez que não foi neutro em seu efeito sobre os biomarcadores lipídicos do sangue decrescendo os níveis dos ácidos eicosapentaenóico e ácido docosapentaenóico. Porém neste estudo foi utilizado um TCM contendo 0,0 - 2,0% de ácido capróico, 50,0 - 80,0% de ácido caprílico, 20,0 - 50,0% de ácido cáprico e 0,0 - 3,0% de ácido láurico, com composição diferente do TCM empregado no presente trabalho.

### 3.3.2 Projeto Farmacannabis

O projeto Farmacannabis da Faculdade de Farmácia da UFRJ analisou dez variedades de plantas do gênero *Cannabis* (*Amnesia Haze*, *Cannatonic*, *Northern Light*, *Caetano Veloso*, *OG Kush*, *24K Gold*, *Cinderella*, *Tolomelli*, *Harle-Tsu* e *Medikit CBD*). Apenas duas variedades de *Cannabis*, (*Harle-Tsu* e *Medikit CBD*) apresentaram teores de CBD superiores ao de THC (*Cannabis* tipo cânhamo) e vêm sendo cultivadas por responsáveis de pacientes para obtenção do extrato rico em

CBD. Neste projeto são monitorados e estudados alguns cultivos de *C. sativa*, assim como a produção de extratos em colaboração com os responsáveis pelo cultivo. A partir deste projeto, tornou-se possível a produção de extratos padronizados com teores de CBD semelhantes aos extratos importados, contendo de 20 a 40 mg/mL, e o planejamento dos tratamentos aos pacientes variando-se os teores de CBD e THC em conjunto com os médicos assistentes (CARVALHO, 2019).

Até o ano de 2016, as famílias dos pacientes não tinham conhecimento da composição dos extratos artesanais. Apesar de ser um tema já sujeito à discussão com base em estudos científicos, muito pouco se conhecia a respeito da composição química das plantas de *Cannabis* e seus derivados utilizados por pacientes no Brasil. Com a finalidade de se avaliar a segurança dos tratamentos com os extratos foi idealizado o projeto Farmacannabis. Entre 2017 e 2018, foram determinados os teores de canabinóides em 118 amostras de extratos de *Cannabis* artesanais oleosos (n = 82) e importados (n = 36). As análises mostraram que 48% dos extratos artesanais apresentavam predominantemente o THC e baixos teores de CBD, 35% foram negativos ou tinham traços de CBD e THC e apenas 16% continham principalmente CBD e baixos teores de THC (CARVALHO, 2019).

Na preparação do extrato, os métodos de extração e de concentração empregados influenciam os perfis químicos dos extratos de *C. sativa* medicinal (PEGORARO *et al.*, 2021). O método analítico empregado no controle do conteúdo de canabinóides nos extratos oleosos de *Cannabis* deve ser padronizado (DEIDDA *et al.*, 2019). A padronização de métodos para o controle da qualidade de insumos farmacêuticos ativos vegetais e de extratos medicinais de *C. sativa* formulados em veículos oleosos é essencial na regulamentação sanitária de seu uso no país e como requisito na fiscalização e monitoramento em termos de saúde pública (CARVALHO *et al.*, 2020).

Carvalho e colaboradores (2020) desenvolveram e validaram um método de controle de qualidade aplicável aos extratos medicinais de *Cannabis* pela quantificação de canabinóides nesses extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Assim, o perfil cromatográfico dos extratos analisados pode nortear o planejamento da diluição a ser na fase final de preparo da amostra (CARVALHO, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020).

No presente estudo, a amostra de extrato de *C. sativa* em TCM foi obtida através da parceria INCQS e UFRJ a partir do projeto Farmacannabis. A amostra de

*Cannabis* foi recebida como doação de família de paciente para análise de citotoxicidade e genotoxicidade no INCQS. A amostra foi obtida a partir do cultivo da planta *Cannabis sativa*, variedade Harle-Tsu pela família de paciente. A preparação do extrato da planta, a análise da resina resultante rica em fitocanabinóides por CLAE e a dissolução da resina em volume adequado do veículo TCM foi realizado na UFRJ para obter o extrato oleoso padronizado com teor de 25 mg/mL de CBD e 1 mg/mL de THC (CARVALHO *et al.*, 2020).

### 3.3.3 Citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* do extrato de *Cannabis sativa*

O extrato de *C. sativa* em TCM foi obtido a partir da extração das sumidades floridas de espécimes pistiladas (fêmeas) com CO<sub>2</sub> em equipamento de extração por fluidos em estado supercrítico (LEWIS *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020). O método de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para o controle da qualidade do extrato de *C. sativa* em TCM e da resina após extração, para a quantificação dos ácidos tetrahydrocannabinólico (THCA) e canabidiólico (CBDA), de THC, CBD e canabinol (CBN) (CARVALHO *et al.*, 2020). O método validado empregou o mesmo tipo de extrato quanto ao processo de obtenção e o mesmo TCM que foi utilizado neste trabalho. Adicionalmente, a partir deste método foram determinadas as concentrações de CBD e de THC utilizadas no extrato estudado.

As diluições do extrato de *C. sativa* em CSTM em todos os ensaios realizados levou em consideração as concentrações de CBD (25 mg/mL) e THC (1 mg/mL) determinadas por CLAE (CARVALHO *et al.*, 2020). Os dois canabinóides são marcadores farmacológicos empregados no controle de qualidade dos extratos de *Cannabis* medicinal. Todos os resultados do extrato foram expressos em CBD por ser a substância predominante em relação ao THC.

#### 3.3.3.1 Citotoxicidade e ensaio Cometa do extrato de *C. sativa* na ausência e presença de mistura S9.

Na ausência e presença da mistura S9, o extrato de *C. sativa* foi testado na mesma faixa de concentrações de CBD (0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL) por 2h em CSTM.

O extrato de *C. sativa* em TCM, em todas as concentrações de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL), na ausência da mistura S9 foi claramente não genotóxico não causando quebras de fita de DNA nos 3 EC realizados. Diferentemente, o controle positivo MMS (80 e 160) foi genotóxico. A concentração mais alta empregada (5,0 mg/mL) de CBD no extrato corresponde à concentração máxima recomendada por Tice e colaboradores (2000) para compostos relativamente não citotóxicos. Nos 3 ensaios realizados, o extrato não foi citotóxico em todas as concentrações de CBD quando comparados aos respectivos controles.

A ausência de genotoxicidade do extrato em C57BL/6J, no EC, na ausência de S9 até a concentração final de 1,0 mg de CBD/microtubo no presente estudo, foi constatada também por Marx e colaboradores (2018), no extrato supercrítico de CO<sub>2</sub> das partes aéreas de *C. sativa* fornecido por CV Sciences, Inc. (San Diego, CA), até a concentração final de 1,248 mg de CBD/placa no teste de mutação reversa em 4 cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 e TA1537) e em uma cepa de *Escherichia coli* WP2 *uvrA* na ausência e na presença de mistura S9.

Dziwenka e colaboradores (2020) investigaram a segurança de um extrato patenteado de *C. sativa* (Charlotte's Web Inc.) composto por uma mistura de 9% de extrato de cânhamo (com 6,27% de CBD) e 91% de azeite de oliva extra virgem. O potencial mutagênico do extrato de cânhamo foi avaliado com o teste de mutação reversa bacteriana empregando-se 4 cepas de *S. typhimurim* (TA98, TA100, TA1535 e TA1537) e em cepa de *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) na ausência e na presença de mistura S9. O extrato não foi mutagênico nos métodos de incorporação em placa e de pré-incubação. O extrato diluído com óleo de oliva, bem como o extrato produzido pelos métodos de extração com isopropanol e de CO<sub>2</sub> supercrítico não foram mutagênicos em bactérias no teste de Ames. Concentrações de até 76,355 µg/placa do extrato diluído não foram mutagênicas com e sem mistura S9. Os extratos produzidos pelos dois métodos de extração não foram mutagênicos com e sem ativação metabólica pelo S9 até a concentração de 5000 µg/placa.

Dziwenka e colaboradores (2020) realizaram testes de toxicidade em doses repetidas de 14 e 90 dias em ratos Sprague Dawley de ambos os sexos com o mesmo extrato empregado no teste de mutação reversa bacteriana. No estudo de 14 dias, as doses de tratamento foram de 0, 1000, 2000 e 4000 mg de extrato/kg pc/dia. Não houve um decréscimo significativo de pesos de ratos machos e fêmeas que

receberam o extrato. Hipoatividade, hiperatividade, redução do consumo de alimentos e piloereção foram observadas nos ratos que receberam 4000 mg de extrato/kg pc/dia. No teste de 90 dias, os ratos receberam doses de 0, 200, 400 e 800 mg de extrato / kg pc / dia. Não houve alteração relacionada ao tratamento com o extrato nas observações clínicas, exames físicos, na bateria de testes de observação funcional, exame oftalmológico, atividade motora, nos parâmetros hematológicos, de química clínica e no exame anatomopatológico (todos os grupos). Com exceção do fígado e das glândulas suprarrenais, não foi observada nenhuma patologia relacionada ao extrato. Em todos os ratos que receberam o extrato, a histopatologia mostrou hipertrofia das células do fígado ao redor da veia central. A hipertrofia hepatocelular foi completamente revertida em 28 dias e não foi considerada ser um efeito adverso. Aumentos na razão de peso de adrenal/peso corpóreo significativos ( $p < 0,05$ ) foram observados em ratos machos recebendo a dose de 800 mg/kg pc/dia do extrato, porém não houve uma correlação entre este aumento e achados patológicos. O NOAEL no estudo de 90 dias foi 800 mg/kg pc/dia e de 400 mg/kg pc/dia para ratos machos e fêmeas Sprague Dawley, respectivamente.

Na presença da mistura S9, o extrato de *C. sativa* foi genotóxico em duas concentrações de CBD (1,0 e 2,0 mg/mL) causando quebras de fita de DNA em leucócitos que foram detectadas no EC em C57BL/6. A genotoxicidade nas duas concentrações de CBD na presença de S9 não está associada à citotoxicidade, pois o extrato em todas as concentrações não foi citotóxico em C57BL/6 nos 3 ensaios realizados. O controle positivo (CP 1,0 e 2,0 mM) na presença da mistura S9, mostrou efeito genotóxico bem evidente comprovando a atividade metabólica da fração S9 e ausência de citotoxicidade em ambas as concentrações de CP nos 3 EC realizados.

O EC é muito sensível detectando danos iniciais no DNA como quebras de fita única, quebras de fita dupla, quebras resultantes de hidrólise espontânea de adutos no DNA e de intermediários de reparo associados aos sítios básicos e de incisões no DNA (SINGH *et al.*, 1988). Através do EC é possível a detecção de dano clastogênico ao DNA, bem como de lesões que podem dar origem a mutações gênicas (OECD, 2016b).

As quebras de fita de DNA detectadas no EC ocorrem durante o reparo do DNA, durante a apoptose e antes da necrose, desta forma, as quebras de fita podem

não estar sempre relacionadas diretamente à formação de mutações ou aberrações cromossômicas (MAC GREGOR *et al.*, 2014).

As quebras de fita de DNA causadas pelo extrato de *C. sativa* com S9 em C57BL/6J podem ser reparadas antes de serem convertidas a uma alteração genética permanente, resultando em efeito não persistente e podem ser letais às células (OECD, 2016). A hipótese de reparo das quebras de fita de DNA antes da conversão ao dano permanente cromossômico foi sugerida pela não ocorrência de efeito clastogênico e/ou aneugênico em linfócitos humanos nos dois EMnBC realizados com o extrato de *C. sativa* na presença de ativação metabólica.

Resultados mostrando efeitos genotóxicos e mutagênicos do CBD e canabidivarina (CBDV) como substâncias isoladas, em células metabolicamente competentes de hepatoma humano (HepG2) e em células derivadas de tecido epitelial bucal humano (TR146) foram relatados por RUSSO e colaboradores (2019). A CBDV é um análogo propílico de CBD também presente em plantas *C. sativa* e *C. indica*. Ambas as substâncias, CBD e CBDV induziram danos ao DNA nos EC realizados com as células HepG2 e em células TR146 em dois períodos de exposição (3 h e 24 h). Em células HepG2, ambas as substâncias foram genotóxicas, em concentrações  $\geq 6 \mu\text{M}$ , após 3 h de tratamento e em concentrações  $\geq 2,0 \mu\text{M}$  após 24 h de tratamento. O mecanismo de dano ao DNA causado por CBD e CBDV em células HepG2 foi por oxidação de bases purínicas e pirimidínicas em concentrações mais baixas ( $0,66 \mu\text{M}$ ). Em células TR146, CBD e CBDV foram genotóxicas em concentrações  $\geq 6 \mu\text{M}$ , após 3 h de tratamento na ausência de mistura S9 e em concentrações  $\geq 2 \mu\text{M}$  na presença de mistura S9. Já é bem documentado na literatura, que as diferentes enzimas do citocromo P-450 do homogenato de fígado de rato da mistura S9 (CYP1A1, 1A2 e 3A4) catalisam a formação de derivados hidroxilados de CBD (UJVARY; HANUS, 2016). Os resultados do EMnBC de CBD e CBDV em células HepG2 mostraram que os danos detectados no EC levaram à formação de MN em concentrações mais baixas ( $\geq 0,22 \mu\text{M}$ ) no EMnBC (RUSSO *et al.*, 2019).

No presente estudo, na presença da mistura S9, o extrato de *C. sativa* foi genotóxico aos linfócitos humanos após 2 h de tratamento com as concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL de CBD no extrato (equivalente a 3180 e 6360  $\mu\text{M}$ ), concentrações bem superiores às concentrações genotóxicas de CBD detectadas pelo EC em HepG2 ( $\geq 6 \mu\text{M}$ ) por RUSSO e colaboradores (2019). Diferentemente dos nossos



resultados, as quebras de fita de DNA induzidas por CBD em células HepG2 no EC levaram à formação de mutações cromossômicas persistentes em HepG2 que foram detectadas como MN no EMnBC.

Estudo de toxicidade e genotoxicidade *in vivo* do THC foi realizado por Kopjar e colaboradores (2019), pois diferentemente dos produtos farmacêuticos aprovados com concentrações conhecidas e definidas de THC, existem preparações ilícitas que usualmente contem quantidades de THC muito altas, algumas vezes acima de 80%. Os autores justificaram o estudo devido à ausência de estudos sobre os efeitos nocivos do THC.

Kopjar e colaboradores (2019) avaliaram a toxicidade e genotoxicidade do THC em óleo de gergelim *in vivo* em ratos Wistar machos administrados com uma dose oral diária de 7 mg/kg pc, por 1, 3 e 7 dias. O dano ao DNA foi avaliado em leucócitos e em células do cérebro de ratos tratados por via oral com THC em óleo de gergelim e controle solvente (óleo de gergelim) usando o EC alcalino *in vivo*. A exposição ao THC em uma dose diária de 7 mg/kg não resultou em nenhuma morte de ratos tratados ou em sinais de toxicidade sistêmica em qualquer momento. Os ratos expostos apresentaram apenas uma ligeira redução no ganho de peso corpóreo em comparação com os controles. Os níveis de dano primário ao DNA em ambos os tecidos foram baixos após uma dose de 7 mg/kg pc de THC. Após os tratamentos de 3 e 7 dias com THC, os ratos mostraram um aumento significativo de dano ao DNA em comparação com os controles correspondentes. Uma tendência maior de quebras de fitas de DNA ocorreu em células cerebrais após o tratamento com THC em comparação com o DNA dos leucócitos, sendo o aumento de dano dependente do tempo. A extensão do dano ao DNA em células do cérebro de ratos tratados com THC por um e três dias consecutivos foi significativamente maior em comparação com os respectivos controles.

Embora o dano ao DNA detectado pelo EC alcalino esteja sujeito a reparo, seu nível elevado nas células cerebrais de ratos tratados com THC é preocupante. Como os neurônios não proliferam, níveis aumentados de dano ao DNA são mais nocivos a essas células em termos de viabilidade e estabilidade do genoma, enquanto o reparo ineficiente do DNA pode levar à sua perda progressiva (KOPJAR *et al.*, 2019).

Souza e colaboradores (2020) avaliaram os efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos de usuários de maconha e tabaco, através do teste do micronúcleo

usando células da mucosa bucal e do EC utilizando células do sangue periférico. Apesar de não ser o nosso objeto, o uso da *Cannabis* por via inalatória, este estudo mostra o amplo emprego da combinação dos dois ensaio (EC e ensaio de micronúcleo) também em estudos *in vivo* visando o biomonitoramento de pessoas expostas a riscos genotóxicos. Neste estudo, 45 voluntários foram selecionados e divididos em quatro grupos: (1) Grupo controle, indivíduos que não fumavam maconha ou tabaco (n = 11); (2) Grupo M, fumantes de maconha (n = 13); (3) Grupo T, fumantes de tabaco (n = 13); (4) Grupo M + T, fumantes de maconha e tabaco (n = 08).

Os resultados deste estudo mostraram que a maconha quando inalada não foi citotóxica e não aumentou o número total de células micronucleadas da mucosa bucal. O grupo M+T apresentou um aumento de células micronucleadas quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os dados do EC revelaram que todos os grupos experimentais apresentaram danos ao DNA em células do sangue periférico. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas com fumantes de maconha e/ou tabaco quando comparados ao grupo controle (SOUZA *et al.*, 2020).

### 3.3.3.2 Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese na ausência e presença de mistura S9.

Na ausência e presença da mistura S9, o extrato de *C. sativa* em TCM foi testado na mesma faixa de concentrações de CBD (0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL) durante 4 h no EMnBC em C57BL/6J.

As concentrações empregadas nos EMnBC em termos de CBD no extrato de *C. sativa* foram definidas considerando a diretriz da OECD 487 referente ao ensaio de micronúcleo em células de mamífero *in vitro* (OECD, 2016). Como o uso proposto da substância CBD no extrato de *C. sativa* é como medicamento a ser administrado em humanos, a diretriz OECD recomenda que seja adotada a concentração limite indicada pela ICH S2(R1) de 1 mM ou 0,5 mg/mL, escolhendo-se o que for menor (ICH, 2011). Assim, considerando que, o PM do CBD é 314,5 g/mol, logo, 1 mM corresponde a 0,3 mg/mL. Desta forma, adotando este critério, a concentração de CBD de 0,3 mg/mL foi incluída na faixa de concentrações a serem testadas no EMnBC (ICH, 2011). Devido a não observação de precipitado ou de citotoxicidade limitante em culturas de C57BL/6J durante o tratamento pelo extrato de *C. sativa*, nesta

condição, a diretriz OECD também recomenda que, a mais alta concentração de CBD como substância isolada deve ser 10 mM ou 2,0 mg/mL escolhendo-se a que for menor. Desta forma, definiu-se como concentração de CBD, o valor de 2,0 mg/mL, por ser menor do que a concentração de 10 mM (3,145 mg/mL). Finalmente, ao considerarmos o extrato como material biológico, o uso de concentração máxima de 5,0 mg/mL é prevista pela diretriz para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Conseqüentemente, a concentração máxima de 5 mg/mL em CBD foi utilizada em todos os ensaios, pois o CBD no extrato da planta está presente com outras substâncias (OECD, 2016).

A partir desta análise, foram definidas em termos de CBD no extrato de *Cannabis*, as três concentrações de 0,3 mg/mL, 2,0 mg/mL e 5,0 mg/mL. Como no EMnBC foi proposto trabalhar com 5 concentrações, para manter o fator de diluição 2 constante entre as concentrações, 2,0 mg/mL foi ajustado a 2,5 mg/mL e as concentrações 0,6 mg/mL e 1,3 mg/mL foram incluídas. O fator constante de 2 ou 3 entre as concentrações consecutivas é considerado apropriado de acordo com a OECD 487 (OECD, 2016).

Durante o bloqueio da citocinese, na ausência da mistura S9, em 2 ensaios, o extrato (CBD 0,3; 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL), apresentou baixa citotoxicidade, em linfócitos humanos, na faixa de 0,68 a 11,45%, causando no máximo 17,99% e 18,39% de reduções no IPBC e no % de IR nas concentrações de CBD 0,3 e 2,5 mg/mL, respectivamente quando comparados ao controle TCM. Na presença da mistura S9, todas as concentrações de extrato (CBD 0,3 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL) foram citotóxicas na faixa de 0,60 a 4,3%, sendo a maior citotoxicidade (17,99%) causada por CBD 1,3 mg/mL. Os valores máximos de citotoxicidade (cerca de 18%), foram cerca de 2,5 vezes inferiores ao valor limite de 50% de citotoxicidade recomendado pelo ICHS2(R1) para a análise de MN nos EMnBC (ICH, 2011).

No presente estudo, o extrato, nas concentrações testadas durante 4 h de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL) na ausência e presença de mistura S9 não foi mutagênico (clastogênico e/ou aneugênico) não causando respectivamente, quebras e/ou perda de cromossomos em linfócitos humanos nos 2 EMnBC realizados na ausência e presença de ativação metabólica. Os controles positivos MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL nos dois ensaios sem mistura S9 mostraram efeitos mutagênicos bem evidentes de clastogenicidade e aneugenicidade, respectivamente, bem como o controle positivo CP 10 µg/mL na presença de S9.

Marx e colaboradores (2018) relataram também ausência de efeito clastogênico *in vitro* ao testarem o extrato supercrítico de CO<sub>2</sub> das partes aéreas de *C. sativa* (CV Sciences, Inc) em células de pulmão de hamster chinês (V79), na ausência e presença da mistura S9, nas concentrações de CBD 12,48; 17,472 e 22,464 µg/mL (tratamento por 20 h) e nas concentrações de CBD 0,312; 0,624 e 1,248 µg/mL por 3h, respectivamente. O extrato não causou aumento de células metafásicas com aberrações cromossômicas estruturais em todas as concentrações testadas quando comparadas aos controles.

O extrato de *C. sativa* (CV Sciences, Inc) dissolvido em óleo de girassol, não foi mutagênico *in vivo* no teste de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos machos Crl: NMRI BR com 8 semanas de idade (32,6-36,4 g) quando administrado por via oral em doses únicas de 500, 1000 e 2000 mg/kg de peso corpóreo (pc). Não ocorreu mortalidade e não foram observadas reações adversas nos animais decorrentes do tratamento com o controle positivo (CP 60 mg/kg pc, por via intraperitoneal), com o controle negativo (óleo de girassol) ou no grupo de 500 mg/kg pc do extrato. Uma diminuição moderada na atividade, uma inquietação moderada e irritabilidade leve a moderada foram observadas nos 10 camundongos tratados com 1000 e 2000 mg/kg pc do extrato de *Cannabis* no dia do tratamento. Os camundongos não apresentaram quaisquer sintomas 24 e 48 h após o tratamento. Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados da medula óssea dos fêmures dos camundongos machos nos três grupos de dose, em comparação com o controle negativo (MARX *et al.*, 2018). Baseado nos dados de composição do extrato de *C. sativa* (CV Sciences, Inc) empregado por MARX e colaboradores (2018), as doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg do extrato corresponderam às doses de 124,8; 249,6 e 499,2 mg/kg de CBD e às doses inferiores a 1,3; 2,6 e 5,2 mg/kg de THC. Considerando-se o peso médio dos camundongos no estudo (34,5 g), as doses administradas por peso médio de camundongos foram 4,30; 8,60 e 17,22 mg de CBD e 0,045; 0,090 e 0,18 mg de THC.

Um estudo de toxicidade oral em doses repetidas de 90 dias foi realizado em ratos Wistar Hsd.Han, machos e fêmeas (idade: 42 a 52 dias), empregou doses de 100, 360 e 720 mg/kg pc /dia, no volume de 5 mL/kg pc do extrato de *C. sativa* (CV Sciences, Inc) dissolvido em óleo de girassol. Dez animais/sexo/grupo foram

administrados com as doses baixa e média do extrato e 15/sexo/grupo com o controle e com a alta dose (MARX *et al.*, 2018).

O estudo de 90 dias foi acompanhado por um período de recuperação de 28 dias para os ratos machos e fêmeas dos grupos controle (óleo de girassol) e da mais alta dose do extrato (720 mg/kg pc/dia) para avaliação de reversibilidade, persistência ou ocorrência de potenciais efeitos tóxicos. Sinais clínicos anormais não foram observados em ratos de ambos os sexos do grupo controle ou em machos na dose de 100 mg/kg pc/dia. Em uma fêmea, na dose de 100 mg/kg pc/dia observou-se sangue em pelo ao redor dos olhos entre os dias 39 e 42 do estudo. Sinais clínicos foram observados em todos os animais nos grupos de 360 e 720 mg/kg pc/dia. Aninhamento dos animais no material da cama ocorreu no grupo de 360 mg/kg pc/dia nos dias 20 ou 21 até o final do período de tratamento. Nos grupos 720 mg/kg pc/dia aninhamento e inquietação foram observados durante o estudo. Salivação ocorreu em machos (n=7) e fêmeas (n=4) logo após a administração da dose de 720 mg/kg pc/dia do extrato durante as quatro primeiras semanas do estudo. Nenhum outro sinal foi encontrado na detalhada observação clínica em qualquer outro grupo de dose do extrato. Não foram observadas alterações no comportamento ou reações a vários estímulos. Nenhum sinal clínico foi observado nos grupos satélites durante o período de recuperação. Houve um reduzido ganho de peso somente em machos no grupo de 360 e em machos e fêmeas no grupo de 720 mg/kg pc/dia, que foi considerado relacionado ao extrato. O reduzido consumo de alimento observado em machos e fêmeas nos grupos 360 e 720 mg/kg pc/dia pode explicar a diminuição do ganho de peso corpóreo. Para o grupo satélite de alta dose, em machos e fêmeas a diminuição do consumo de alimento e de ganho de peso persistiu durante o período de recuperação. O nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) para o extrato de *C. sativa* determinado neste estudo de 90 dias foi de 100 mg/kg pc/dia e 360 mg/kg pc/dia para ratos Wistar Hsd. Han machos e fêmeas, respectivamente. Estes valores de NOAEL correspondem às doses de 24,96 mg/kg pc de CBD e 0,26 mg/kg pc/dia de THC em machos e 89,86 mg/kg pc/dia de CBD e 0,936 mg/kg pc/dia de THC em fêmeas.

O extrato objeto deste estudo estava sendo administrado à paciente de 16 anos de idade, 55 kg, no volume total de 2 mL diários (1 mL pela manhã e 1 mL à noite), totalizando 50 mg de CBD/ dia e 2 mg de THC/dia correspondendo a 0,91 mg/kg pc de CBD e 0,036 mg/kg pc/dia O paciente é portador de epilepsia refratária

desde os 7 anos de idade. Além do extrato de *C. sativa* estava sendo administrado: lamotrigina 200 mg pela manhã e 250 mg à noite, clobazam 10 mg de 12 em 12 h, fenitoína 100 mg de 12 em 12h. Segundo os responsáveis, a administração do extrato melhorou a qualidade do sono e reduziu a ansiedade e impulsividade.

Segundo o estudo de Gherzi e colaboradores (2020), a primeira dose empregada da preparação galênica preparada por decocção foi de 1 mg/kg pc/dia de CBD com 0,5-0,7 mg/kg pc/dia de THC. A dose de CBD administrada do extrato sob estudo (0,91 mg/kg) foi próxima à dose administrada por Gherzi e colaboradores, porém a dose de THC foi 13,8 a 19,4 vezes inferior.

O estudo de Gherzi e colaboradores (2020) avaliou a segurança e os parâmetros farmacocinéticos de *C. sativa* medicinal em crianças e adultos, menores de 25 anos, com epilepsia resistente a medicamentos. Foram selecionados 10 pacientes, 4 mulheres e 6 homens com idades entre 2,5 e 23,2 anos, aos quais foram administrados com uma preparação galênica preparada por decocção de inflorescências de *C. sativa*, com a proporção THC:CBD = 3:5 (THC = 5,2-7,2% e CBD = 8,2-11,1%), na dose de CBD 1-4 mg/kg pc/dia. Os valores médios de THC e CBD foram  $6,58 \pm 0,43\%$  e  $10,22 \pm 0,69\%$ , respectivamente. As concentrações plasmáticas de THC e CBD foram determinadas em 10 pacientes iniciando-se a coleta das amostras 30 min após a administração da primeira dose (1 mg/kg pc/dia de CBD) e após 1h, 2h, 3h, 4h, 12h e 24h, sendo que a última amostra foi coletada imediatamente antes da dose do segundo dia de tratamento. A frequência das convulsões nos pacientes foi registrada antes do início do tratamento com *Cannabis* e durante o acompanhamento, com diários de convulsões preenchidos pelos pais. Em relação à eficácia na frequência de crises epiléticas, em 7/10 casos houve uma redução de pelo menos 50% avaliada através dos diários preenchidos pelos pais. Apesar das dificuldades relatadas na administração da decocção, confirmou-se sua boa tolerabilidade. Todos os eventos adversos relatados foram leves ou transitórios: não foram encontradas variações significativas entre traçados de EEG, eletrocardiograma, frequência cardíaca ou parâmetros sanguíneos, exceto redução do fibrinogênio após 6 meses de terapia, reversível e sem correlações clínicas.

As concentrações plasmáticas de THC e CBD mostraram uma considerável variabilidade entre os indivíduos e nos parâmetros farmacocinéticos. A correlação entre as concentrações sanguíneas de THC e CBD e as doses administradas com a variabilidade entre os indivíduos dos parâmetros farmacocinéticos reforçam a

necessidade do monitoramento terapêutico de *Cannabis* medicinal principalmente em pacientes epiléticos para otimizar o tratamento (GHERZI *et al.*, 2020).

Frassinetti e colaboradores (2020) investigaram o potencial antioxidante dos extratos de sementes e brotos de *C. sativa* L. *in vitro* considerando-se o teor total de polifenóis, flavonóides e flavonóis. As propriedades antioxidantes e anti-hemolíticas de sementes e brotos de *C. sativa* foram avaliadas em sistema-teste de eritrócitos *ex vivo* pelo ensaio antioxidante celular (CAA-RBC) e pelo teste de hemólise. Os efeitos antimutagênicos foram investigados na cepa D7. da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O efeito antimutagênico dos extratos de sementes e brotos de *C. sativa* evidenciou uma diminuição significativa da mutagênese induzida pelo peróxido de hidrogênio na cepa D7 de *S. cerevisiae*. Concluiu-se com esse estudo, que as sementes e brotos de *C. sativa* são ricos em compostos bioativos benéficos, que possuem atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, além de atividade antimutagênica sobre a *S. cerevisiae* e podem ser utilizados como um alimento funcional em potencial (FRASSINETTI *et al.*, 2020).

Componentes no extrato de *C. sativa* parecem contribuir para a diminuição ou mesmo a eliminação de efeitos tóxicos e genotóxicos quando os efeitos são comparados às substâncias testadas isoladamente como, por exemplo, para o CBD em alguns estudos mencionados acima.

Além dos polifenóis, flavonóides e flavonóis contribuem também para a atividade biológica do extrato de *C. sativa*, os terpenos.

Na preparação de extratos de *C. sativa* é necessário o desenvolvimento e o emprego de métodos com a finalidade de manutenção dos níveis altos de canabinóides e preservação da fração terpênica da planta o que contribui para atividade biológica do extrato (TERNELLI *et al.*, 2020). Terpenos apresentam muitos efeitos terapêuticos, tais como atividades antidepressora, relaxante, ansiolítica, antimicrobiana e antioxidante, que podem contribuir significativamente no possível efeito *entourage* de canabinóides e terpenos nos extratos medicinais de *Cannabis* (RUSSO, 2011).

Rocha e colaboradores (2020) desenvolveram um método HS-SPME GC-MS considerado simples, efetivo e não destrutivo para análise de terpenos em amostras de *Cannabis* medicinal como método complementar de identificação. Treze terpenos foram detectados, nove deles estavam presentes em todas as amostras:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, D-limoneno, terpinoleno, linalool, cariofileno,  $\alpha$ -bergamoteno e

humuleno. Os três encontrados em maior quantidade na maioria das amostras foram o cariofileno,  $\alpha$ -pineno e o  $\beta$ -mirceno.

Dentre os monoterpenos presentes na *C. sativa*, o mais abundante é o  $\beta$ -mirceno (MIR) (NUUTINEN, 2018; HANUS; HOD, 2020). O MIR tem propriedades antipsicótica, antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, sedativa, relaxante muscular e anticarcinogênicas (KOZIOL *et al.*, 2014; GULLUNI *et al.*, 2018; JANSEN *et al.*, 2019). Em *Cannabis* medicinal, preparações com baixo teor de THC e altos níveis de CBD conhecidas como *cannatonic*, o teor de MIR foi expresso principalmente, como  $63 \pm 11,5\%$  em relação ao total de terpenos obtido a partir de 15 amostras de 10 diferentes origens. Cepas de *Cannabis* com altas concentrações de MIR ( $> 0,5\%$  de mirceno) provavelmente induzem propriedades sedativas (*couch-lock-effect*) (PIOMELLI; RUSSO, 2016). Diferentemente, cepas com baixo conteúdo de MIR induzem um mais energético “alto” efeito (HANUS; HOD, 2020). MIR pode também ter um efeito facilitador para a absorção de canabinóides através da barreira hematoencefálica aumentando o transporte no cérebro e melhorando as respostas psicoativas (HARTSEL *et al.*, 2016). O ponto de ebulição do MIR é  $167,1^\circ\text{C}$  o que lhe confere uma maior estabilidade no extrato quando comparado ao  $\beta$ -cariofileno cujo ponto de ebulição é  $129-130^\circ\text{C}$  (SURENDRAN *et al.*, 2021).

Vários estudos mostram que o MIR não foi mutagênico em células bacterianas e de mamífero (SURENDRAN *et al.*, 2021). O *National Toxicology Program* dos EUA (NTP, 2010) e Gomes-Carneiro e colaboradores (2005) concluíram que o MIR não foi mutagênico no teste de Ames nas cepas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica. O MIR também foi negativo na cepa WP2 uvrApKM101 de *Escherichia coli* com e sem fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 ou de fígado de hamster (NTP, 2010). O MIR (1,5 e 3,0 %) inibiu 65 e 73%, respectivamente, o efeito mutagênico em cepa TA100 de *S. typhimurium* causado por  $1,0 \mu\text{g}$  de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)/placa na presença de ativação metabólica exógena (mistura S9 de fígado de rato) (KIM *et al.*, 1992).

O MIR não foi mutagênico em células de mamífero *in vitro* na presença e na ausência de mistura S9 quando testado até a concentração de  $1 \text{ mg/mL}$ , mas apresentou efeito antimutagênico (KAUDERER *et al.*, 1991). MIR não causou aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs em linfócitos humanos *in vitro*, não induziu aumento na frequência de mutações no *locus* hprt em células V79



de pulmão de hamster chinês. MIR reduziu o efeito indutor de troca de cromátides irmãs de CP em linfócitos humanos de maneira concentração-dependente e reduziu o efeito tóxico e mutagênico de CP em células V79. Diferentemente, o MIR não influenciou a genotoxicidade do metanosulfonato de etila (EMS) e BaP em linfócitos humanos *in vitro*. Os autores sugeriram que o MIR tem a capacidade de inibir as isoenzimas do citocromo P-450 que ativam compostos com propriedades mutagênicas e carcinogênicas (KAUDERER *et al.*, 1991).

O MIR, testado até a concentração de 0,5 mg/mL (cerca de  $3,5 \times 10^{-3}$  M) mostrou efeito antigenotóxico, inibindo de forma concentração dependente, as trocas de cromátides irmãs induzidas pela CP e AFB em células V79 de pulmão de hamster chinês na presença da mistura S9 e de CP em culturas de células HTC de hepatoma de ratos, Os resultados sugeriram que MC modula a genotoxicidade de mutágenos de ação indireta pela inibição de certas formas de enzimas microssomais P-450 do fígado de ratos necessárias para ativação de pré-mutágenos como CP e AFB (RÖSCHEISEN *et al.*, 1991). O MIR inibiu a atividade da pentoxirexiresorufin-O-depentilase (PROD), marcador seletivo da mono-oxigenase CYP2B1 necessária para a ativação de genotoxinas em ratos (DE-OLIVEIRA; RIBEIRO-PINTO; PAUMGARTTEN, 1997). Efeitos protetores contra a genotoxicidade induzida por hidroperóxido de t-butila em células linfóide B humana NC-NC foi demonstrada pelo MIR predominantemente mediada por sua atividade sequestradora de radicais (MITIC-CULAFIC, 2009).

Não houve evidência de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos Wistar de ambos os sexos administrados com MIR por via oral nas doses de 0,1; 0,5 ou 1,0g/kg de peso corpóreo. Embora não se tenha evidenciado a clastogenicidade do MIR observou-se um aumento do índice mitótico dose-dependente em células da medula óssea de ratos 24 h após a administração oral em ratos (ZAMITH *et al.*, 1993). Adicionalmente não houve aumento na frequência de eritrócitos normocromáticos micronucleados da medula óssea de camundongos B6C3F1 tratados por via oral com MIR (0,25 a 2 g/kg) por 3 meses (NTP, 2010).

O  $\beta$ -cariofileno (BCF) é também um importante terpeno presente em *C. sativa* com alta afinidade (150 nM) pelo receptor CB2 sendo um agonista seletivo total para este receptor (GERTSCH *et al.*, 2008). A atividade agonista de BCF no receptor CB2 pode ser a mais importante característica de BCF como anti-inflamatório. BCF produz uma forte atividade anti-inflamatória na dose de 5 mg/kg em camundongos

selvagens, mas não em camundongos *knockout* para o receptor CB2 (GERTSCH *et al.*, 2008). BCF possui atividades anticancerígenas afetando o crescimento e proliferação de numerosas células cancerosas. As propriedades anticancerígenas foram revistas em detalhe por FIDYT e colaboradores (2016). A mais importante função de BCF pode ser a indução da expressão de genes pró-apoptóticos e supressores de câncer que codificam as proteínas p53, proteína 4 como a bcl-2 (bax), bak, caspase 8, caspase 9 e ATM e a supressão de genes codificando genes anti-apoptóticos, tais como, o gene de células-B de linfoma 2 (bcl-2), mdm2, COX-2 e mieloblastose c (c-myb). Além disso, apesar de sua baixa citotoxicidade, BCF pode potencializar a eficácia de drogas clássicas contra o câncer aumentando suas concentrações dentro das células (DI GIACOMO *et al.*, 2017).

#### 4 CONCLUSÃO

- Os resultados deste estudo se aplicam à amostra do extrato obtido das sumidades floridas de espécimes pistiladas (fêmeas) de *Cannabis sativa* variedade Harle-Tsu em TCM preparado pela UFRJ conforme metodologia descrita.
- O veículo do extrato, TCM (1,3; 4,0; 8,0 e 20%) na ausência de ativação metabólica, em três ensaios, não foi citotóxico na menor concentração (1,3%) e nas demais concentrações, causou valores médios de letalidade inferiores a 1% em C57BL/6. Na presença de ativação metabólica, em três ensaios, TCM (4,0; 8,0 e 20%) não foi citotóxico não causando letalidade em C57BL/6.
- TCM (2,5; 5,0; 10 e 20%) na ausência de ativação metabólica, em dois ensaios, não foi citotóxico na menor concentração (2,5%), não causando reduções do IPBC e do % de IR dos linfócitos humanos. O valor máximo de citotoxicidade (20,35%) ocorreu na maior concentração de TCM (20%). Na presença de ativação metabólica, em dois ensaios, todas as concentrações foram citotóxicas sendo a maior citotoxicidade (18,72%) induzida por TCM 20%.
- TCM (1,3 a 20%) e TCM (4,0 a 20%) sem e com ativação metabólica extrínseca, respectivamente, não foi genotóxico, não causando quebras de fita de DNA em C57BL/6. TCM (2,5-20%) não foi mutagênico (clastogênico e/ou aneugênico), não causando quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em linfócitos humanos.
- O extrato de *C. sativa* em TCM, sem ativação metabólica, nas concentrações correspondentes de CBD 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL, em três ensaios, não induziu letalidade celular e não foi genotóxico, não causando quebras de fita de DNA. Na presença de ativação metabólica, o extrato de *C. sativa* em TCM não foi citotóxico, mas foi genotóxico induzindo quebras de fita de DNA em

1,0 e 2,0 mg/mL de CBD que não foram convertidas em aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas em linfócitos humanos *in vitro*.

- O extrato de *C. sativa* em TCM, nas concentrações de CBD, (0,3, 0,6; 1,3; 2,5 e 5,0 mg/mL), sem ativação metabólica, em dois ensaios, mostrou baixa citotoxicidade em linfócitos humanos, causando reduções de IPBC e de % de IR na faixa de 0,68 a 11,45%, e de no máximo 17,99% e 18,39%, nas concentrações de CBD 0,3 e 2,5 mg/mL, respectivamente. Na presença de ativação metabólica, em dois ensaios, o extrato de *C. sativa* foi citotóxico induzindo reduções de IPBC e do % de IR em linfócitos humanos, na faixa de 0,60 a 4,33% e de no máximo, 14,29% e 17,99%, nas concentrações de CBD 0,6 e 1,3 mg/mL, respectivamente.
- O extrato de *C. sativa* preparado e analisado pelo LATox da UFRJ, com teores de CBD 25 mg/mL e THC 1 mg/mL, foi considerado não clastogênico e/ou não aneugênico *in vitro*, na faixa de concentrações de CBD (0,3 a 5,0 mg/mL), na ausência e presença de ativação metabólica extrínseca, não causando quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em linfócitos humanos.
- Os resultados obtidos *in vitro* são promissores e um estímulo para o prosseguimento dos estudos em sistemas *in vivo*, como o ensaio de micronúcleo em eritrócitos imaturos da medula óssea de camundongos ou ratos para avaliação do metabolismo, farmacocinética e reparo de DNA. Como um segundo ensaio é recomendado o EC *in vivo*, especialmente no fígado ou estômago de ratos expostos por via oral.
- Os resultados obtidos em ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade do extrato de *C. sativa* em células de mamífero *in vitro* e *in vivo* permitirão a avaliação do risco genotóxico para os seres humanos.

## 5 PERSPECTIVAS

Através deste projeto, em parceria com o LATox-UFRJ, espera-se:

- Contribuir para o uso medicinal da *C. sativa* avaliando-se a genotoxicidade *in vitro* de diferentes extratos obtidos e utilizados no controle de convulsões em crianças com epilepsia refratária.
- Estabelecer uma melhor integração entre o INCQS, órgão de controle, as famílias que cultivam as plantas e a UFRJ, que através do projeto Farmacannabis orienta o preparo dos extratos e realiza a análise química, com a finalidade de um uso mais seguro e eficaz para as crianças e jovens portadores de epilepsia refratária.
- Contribuir com a ANVISA na elaboração de uma resolução para estabelecer os parâmetros de qualidade químicos, microbiológicos, de segurança e eficácia dos extratos de *C. sativa*.
- Prosseguir com os estudos de genotoxicidade *in vivo* do extrato de *C. sativa*.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Em cumprimento a ação judicial, ANVISA permite prescrição e importação de produtos com Canabidiol e THC.

**Assessoria de Imprensa da ANVISA**, 21 mar. 2016. 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=2645734&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=219201&\\_101\\_urlTitle=em-cumprimento-a-acao-judicial-anvisa-permite-prescricao-e-importacao-de-produtos-com-canabidiol-e-thc&inheritRedirect=true](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=2645734&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=em-cumprimento-a-acao-judicial-anvisa-permite-prescricao-e-importacao-de-produtos-com-canabidiol-e-thc&inheritRedirect=true)>. Acesso em: 02 nov. 2018 (**ANVISA, 2016a**).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Canabidiol e THC: norma permitirá registro de produto. **Assessoria de Imprensa da ANVISA**, 22 nov. 2016. Disponível em: <

[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/canabidiol-e-thc-norma-permitira-registro-de-produto/219201?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/canabidiol-e-thc-norma-permitira-registro-de-produto/219201?inheritRedirect=false)> Acesso em: 02 nov. 2018 (**ANVISA, 2016b**).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Registrado primeiro medicamento à base de *Cannabis sativa*. **Assessoria de Imprensa da ANVISA**, 16 jan. 2017.

Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agencia-aprova-primeiro-remedio-a-base-de-cannabis-sativa/219201](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agencia-aprova-primeiro-remedio-a-base-de-cannabis-sativa/219201)>. Acesso em: 02 nov. 2018 (**ANVISA, 2017**).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Senado e Câmara discutem regulação da Cannabis medicinal. **Assessoria de Imprensa da ANVISA**, 09 jul. 2019

(a). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/ultimas-noticias?tagsName=canabidiol>>. Acesso em: 02 ago. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cannabis medicinal: prazo para contribuições até 19/08. **Assessoria de Imprensa da ANVISA**, 16 ago. 2019 (b).

Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/cannabis-medicinal-aberto-prazo-para-contribuicoes/219201?p\\_p\\_auth=5Q9EsTTG&inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/cannabis-medicinal-aberto-prazo-para-contribuicoes/219201?p_p_auth=5Q9EsTTG&inheritRedirect=false)>. Acesso em: 25 set. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Conceitos e definições. **Acesso à Informação – Perguntas Frequentes – Medicamentos**, 20 set. 2020. Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acesoainformacao/perguntasfrequentes/medicamentos/conceitos-e-definicoes/conceitos-e-definicoes>> Acesso em: 31 jan. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Anvisa aprova dois novos produtos à base de Cannabis. **Assessoria de Imprensa da ANVISA**, 04 nov. 2021. Disponível em: <

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-aprova-dois-novos-produtos-de-cannabis>>. Acesso em: 31 jan. 2022

ALMEIDA PEREIRA, F.; TORRES, A. C.; PHILADELPHO, V. O.; ORNELLAS, L. I.; VELOSO, C. R.; ANDRADE FILHO, A. S. EFEITOS DO CANABIDIOL NA FREQUÊNCIA DAS CRISES EPILÉPTICAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 22, n.1, p. 86-100, Jan./Abr., 2018.

ALVARENGA, K. G.; GARCIA, G. C.; ULHÔA, A. C.; OLIVEIRA, A. J.; MENDES, M. F. S. G.; CESARINI, I. M.; SALGADO, J. V.; SIQUEIRA, J. M.; FONSECA, A. G. A. R. Epilepsia Refratária: A Experiência do Núcleo Avançado de Tratamento das Epilepsias do Hospital Felício Rocho (NATE) no período de março de 2003 a dezembro de 2006. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 13, n.2, p. 71-74, 2007.

AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA®. *Cannabis* Inflorescence. Scott's Valley, CA 95067 USA, ISSN1538-0297, USA, 2013. Disponível em: <[www.herbal.ahp.org](http://www.herbal.ahp.org)>. Acesso em: 31 jan. 2022.

ARALDI, R. P.; DE MELO, T. C.; MENDES, T. B.; DE SÁ JÚNIOR, P. L.; NOZIMA, B. H.; ITO, E. T.; DE CARVALHO, R. F.; DE SOUZA, E. B.; DE CASSIA STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother.**, v. 72, p. 74-82, mai. 2015.

AREMU, A.O., MOYO, M.; AMOO, S.O.; VAN STADEN, J. Mutagenic evaluation of 10 long-term stored medicinal plants commonly used in South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 87, p. 95-98, 2013.

BACH, A.C; BABAYAN, V.K Medium-chain triglycerides: An update. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.36, n. 5, p. 950-962, 1982.

BARON, E.P. Medicinal properties of cannabinoids, terpenes, and flavonoids in *cannabis*, and benefits in migraine, headache, and pain: an update on current evidence and cannabis science. **Headache**, v. 58, n. 7, p. 1139–1186, jul./ago. 2018.

BERGAMASCHI, M. M.; QUEIROZ, R. H.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A. Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent. **Curr Drug Saf.**, v. 6, n.4, p. 237-249, set. 2011.

BERGSTEN-TORRALBA, L. R.; ZAMITH, H. P.; CONDE, T. R.; AIUB, C. A.; FELZENSZWALB, I.; DA SILVA, M. Dye detoxification by *Lentinula edodes* INCQS 40220. **Vigil. Sanit. Debate**, v. 4, n.1, p. 92-99, 2016.

BITENCOURT, R. M.; TAKAHASHI, R. N.; CARLINI, E. A. From an Alternative Medicine to a New Treatment for Refractory Epilepsies: Can Cannabidiol Follow the Same Path to Treat Neuropsychiatric Disorders? **Front Psychiatry**, v. 12, 2021.

BOECHAT, N.; CARVALHO, A. S.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L.; ARAUJO-LIMA, C. F.; MELLO, F. V. C.; FELZENSZWALB, I.; AIUB C. A. F.; CONDE, T.R.; ZAMITH, H. P. S.; SKUPIN R.; HAUFE, G. Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifying this critical relationship with the nitro group. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 492-499, 2015.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; ... FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set, 1990. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L8080.htm)>. Acesso em: 28 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 15/05/1998. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%2814%29PRT\\_SVS\\_344\\_1998\\_COMP.pdf/51b97b33-a689-47ef-b4bb-29bd98219bec](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%2814%29PRT_SVS_344_1998_COMP.pdf/51b97b33-a689-47ef-b4bb-29bd98219bec)>. Acesso em: 13 out. 2018.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 11.343, de 23 de Agosto de 2006. Institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas - Sisnad; prescreve medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas; estabelece normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas; define crimes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 Ago. 2006. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/lei/l11343.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11343.htm)>. Acesso em: 13 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009. 140 p.: il. Disponível em: <[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/programa\\_nacional\\_plantas\\_medicinais\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em 02 nov. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. GESEF. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7?version=1.2>>. Acesso em: 13 outubro 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 26, de 13 de maio de 2014 (a). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 14 maio 2014. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/70247596/dou-secao-1-14-05-2014-pg-52>>. Acesso em: 18 out. 2019.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina. Resolução 2.113, de 16 de dezembro de 2014 (b). Aprova o uso compassivo do canabidiol para o tratamento de epilepsias da criança e do adolescente refratárias aos tratamentos convencionais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 16 dez. 2014. Disponível em: <<https://portal.cfm.org.br/canabidiol/index.php>>. Acesso em: 13 out. 2018.



BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 17, de 06 de maio de 2015 (a). Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 08 maio 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/29340>>. Acesso em: 13 out. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Gestão do Exercício 2014 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2015 (b). 404 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 66, de 16 de março de 2016 (a). 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, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 21 mar. 2016. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_66\\_2016\\_.pdf/e6f8f9cd-8046-4120-983c-42d3bf8c705e](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_66_2016_.pdf/e6f8f9cd-8046-4120-983c-42d3bf8c705e)>. Acesso em: 13 out. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 128, de 2 de dezembro de 2016(b). Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Produtos à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, dentre eles o THC, em conformidade com o capítulo I - seção II da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 6 de maio de 2015. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 05 dezembro 2016. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/%281%29RDC\\_128\\_2016\\_COMP.pdf/93f0fd2a-86ca-4ad0-8d28-751efd4b464e](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/%281%29RDC_128_2016_COMP.pdf/93f0fd2a-86ca-4ad0-8d28-751efd4b464e)>. Acesso em: 05.09.2021

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Atividades da Anvisa – 2015. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2016 (c). 112 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Gestão do Exercício 2015 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2016 (d). 359 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de atividades 2016 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2017. 200 p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. PORTARIA CONJUNTA Nº 17, DE 21 DE JUNHO DE 2018 (a). Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Epilepsia.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Atividades 2017 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2018 (b). 196 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 306, de 25 de setembro de 2019 (a). Dispõe sobre a revogação dos incisos II e III do § 2º do art. 7º, do art. 18 e do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 6 de maio de 2015. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 02 outubro 2019. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/RDC\\_306\\_2019\\_COMP.pdf/67529305-8510-4ceb-b81b-e481af9d45d8](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/RDC_306_2019_COMP.pdf/67529305-8510-4ceb-b81b-e481af9d45d8)>. Acesso em: 05 set. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019 (b). Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 11 dezembro 2019. Disponível em:<

[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5533192/RDC\\_327\\_2019\\_.pdf/db3ae185-6443-453d-805d-7fc174654edb](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5533192/RDC_327_2019_.pdf/db3ae185-6443-453d-805d-7fc174654edb)>. Acesso em: 05 set. 2021

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Gestão 2018 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2019 (c). 196 p.

BRASIL (a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 335, de 24 de janeiro de 2020 (a). Define os critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 27 janeiro 2020. Disponível em: <

[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/RDC\\_335\\_2020\\_.pdf/e4ca7e95-f5af-4212-9360-d662c50018e2](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/RDC_335_2020_.pdf/e4ca7e95-f5af-4212-9360-d662c50018e2)>. Acesso em: 05 set. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 570, de 06 de outubro de 2021 (a). Altera a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 335, de 24 de janeiro de 2020. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Brasil, de 06 outubro 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-570-de-6-de-outubro-de-2021-350923691>>. Acesso em: 29 jan. 2022

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Gestão 2019 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2020 (b). 157 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Gestão 2020 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2021 (b). 231 p.

BRUNO, M. ANVISA aprova 2 novos produtos de *Cannabis* nas farmácias. **Cannabis & Saúde**, 15 abr 2021. Disponível em: < <https://www.cannabisesaude.com.br/anvisa-nature-canabidiol/>>. Acesso em: 05 set. 2021.

BRUSICK, D. Mutagenic evaluation of compound. FDA 75-38. 000124-07-2, Caprylic acid, 98%. Litton Bionetics. Prepared for Food and Drug Administration, Washington, DC, **Bureau of Foods. NTIS Document PB -257 872**, 1976.

BUCHANAN-PEART, K. R.; ORIBHABOR, G. I.; KHOKALE, R. V.; NELSON, M. L.; IVAN CANCAREVIC, I. Cannabis, More Than the Euphoria: Its Therapeutic Use in Drug-Resistant Epilepsy. **Cureus**, v. 12, n. 7, e9299, jul., 2020.

CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **J. bras. psiquiatr.**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 314-317, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0047-20852006000400008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0047-20852006000400008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 05 out. 2018.

CARVALHO, A. S.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L.; CONDE, T. R.; ZAMITH, H. P.; CAFFARENA, E. R.; HALL, B. S.; WILKINSON, S. R.; BOECHAT, N. Megazol and its bioisostere 4*H*-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their *in vitro* and *in silico* interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 315-23, 2014.

CARVALHO, V.; FERNANDES, L.; CONDE, T. R.; ZAMITH, H.; SILVA, R.; SURRAGE, A.; FRUTUOSO, V.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; AMENDOEIRA, F. Antinociceptive Activity of *Stephanolepis hispidus* Skin Aqueous Extract Depends Partly on Opioid System Activation. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1221-1234, 2013.

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.; BRITO, M. S.; GANDRA, M. Mães pela *cannabis* medicinal em um Brasil aterrorizado entre luzes e fantasmas. **Forum Sociológico**, n.30, série II, p. 57-66, 2017.

CARVALHO, V. M. Cannabis: entre a padronização farmacêutica e o autocuidado. **BOLETIM DO IBCCRIM**, v. 27, p. 4-7, 2019.

CARVALHO, V. M.; AGUIAR, A. F. L.; BARATTO, L. C.; SOUZA, F. L. C.; ROCHA, E. D. Quantificação de canabinóides em extratos medicinais de *Cannabis* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 43, n.1, p. 90-97, 2020.

COLLINS, A. R. The comet assay: a heavenly method! **Mutagenesis**, v. 30. n. 1, p. 1-4, 2015.

CRIPPA, J.A.S.; ZUARDI, A.W.; HALLAK, J.E.C. Uso terapêutico dos canabinóides em psiquiatria. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 32, supl. 1, p. 556-566, mai. 2010.

DEIDDA, R.; AVOHOU, H. T.; BARONTI, R.; DAVOLIO, P. L.; PASQUINI, B.; DEL BUBBA, M.; HUBERT, C.; HUBERT, P.; ORLANDINI, S.; FURLANETTO, S. Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 166, p. 326-335, 2019.

DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by  $\beta$ -myrcene and other monoterpene compounds. **Toxicology Letters**, v. 92, n. 1, p. 39-46, 1997.

DI GIACOMO, S.; DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; WINK, M. Chemosensitizing Properties of  $\beta$ -Caryophyllene and  $\beta$ -Caryophyllene Oxide in Combination with Doxorubicin in Human Cancer Cells. **Anticancer Res.**, v. 37, n. 3, p. 1191-1196, 2017.

DZIWENKA, M.M.; COPPOCK, R.W.; ALEXANDER, M.; PALUMBO, E.; RAMÍREZ, C.V.; LERMER, S. Safety Assessment of a Hemp Extract using Genotoxicity and Oral Repeat-Dose Toxicity Studies in Sprague-Dawley Rats. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 376-385, 2020.

FARRELLY, A. M.; VLACHOU, S.; GRINTZALIS K. Efficacy of Phytocannabinoids in Epilepsy Treatment: Novel Approaches and Recent Advances. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 8, p. 3993, abr. 2021.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v.455, p.81-95, 2000.

FERGUSON, L. R.; LAING, B.; ELLETT, S.; MARLOW, G. Medium Chain Triglyceride Oil, an Intended Placebo with Unexpected Adverse. **Ann Clin Lab Res**, v. 4, n. 3, p. 105, 2016.

FIDYT, K.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide – natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Canc. Med.**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FONSECA, G. S.; MORORÓ, D.D.S.; MEDEIROS, Y. K. F.; MELO, A.N.; PINTO, J.T.J.M. Aspectos epidemiológicos da epilepsia refrataria em uma unidade hospitalar de pediatria. **Rev enferm UFPE on line**, Recife, n. 10, supl. 3, p. 1466-1473, abr. 2016.

FONTENELLE, L.; KREIMER, V. EPILEPSIA REFRATÁRIA NA INFÂNCIA. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 53, n.1, p. 23-25, 1995.

FRASSINETTI, S.; MOCCIA, E.; CALTAVUTURO, L.; GABRIELE, M.; LONGO, V.; BELLANI, L.; GIORGI, G.; GIORGETTI, L. Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 262, p. 56-66, 2018.

FRÖTSCHL. R. Experiences with the *in vivo* and the *in vitro* comet assay in regulatory testing. **Mutagenesis**, v. 30, n.1, p. 51-57, 2015.

GALLILY, R.; YEKHTIN, Z.; HANUŠ, L. O. Overcoming the Bell-Shaped Dose-Response of Cannabidiol by Using Cannabis Extract Enriched in Cannabidiol. **Pharmacology & Pharmacy**, v.6, n. 2, p. 75-85, fev. 2015.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Rev Bras Psiquiatr**, n. 27, v. 4, p. 323-328, 2005.

GARZON, E. Epilepsia Refratária: Conceito e Contribuição das Novas Drogas Antiepilépticas e de outras Modalidades Terapêuticas. **Rev. Neurociências**, n. 10, v. 2, p. 66-82, 2002.

GASTON, T. E.; SZAFLARSKI, J. P. Cannabis for the Treatment of Epilepsy: an Update. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 18, n. 11, SP. 73, 2018.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GHERZI, M.; MILANO, G.; FUCILE, C.; CALEVO, M. G.; MANCARDI, M. M.; NOBILI, L.; ASTUNI, P.; MARINI, V.; BARCO, S.; CANGEMI, G.; MANFREDINI, L.; MATTIOLI, F.; DE GRANDIS, E. Safety and pharmacokinetics of medical cannabis preparation in a monocentric series of young patients with drug resistant epilepsy. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 51, 2020.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; VIANA, M. E.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alpha-pinene in the Salmonella/microsome assay. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 2, p. 247-252, 2005.

GOTTSCHLING, S.; AYONRINDE, O.; BHASKAR, A.; BLOCKMAN, M.; D'AGNONE, O.; SCHECTER, D.; SUÁREZ RODRÍGUEZ, L. D.; YAFAI, S.; CYR, C. Safety Considerations in Cannabinoid-Based Medicine. **Int J Gen Med.**, v. 13, p. 1317-1333, 2020.

GULLUNI, N.; RE, T.; LOIACONO, I.; LANZO, G.; GORI, L.; MACCHI, C.; EPIFANI, F.; BRAGAZZI, N.; FIRENZUOLI, F. Cannabis Essential Oil: A Preliminary Study for the Evaluation of the Brain Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

HANUŠ, L. O.; HOD, Y. Terpenes/Terpenoids in *Cannabis*: Are They Important? **Med Cannabis Cannabinoids**, v. 3, n. 1, p. 25-60, 2020.

HARRIS, H. M.; ROUSSEAU, M. A.; WANAS, A. S.; RADWAN, M. M.; CALDWELL, S.; SUFKA, K. J.; ELSOHLY, M. A. Role of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis-Mediated Analgesia in Rats. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 4, n. 3, p. 177-182, 2019.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.; FJÄLLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 843–858, 2001.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA - effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v.90, p.183-188, 1997.

HARTSEL, J. A.; EADES, J.; HICKORY, B.; MAKRIYANNIS, A. Chapter 53 - Cannabis sativa and Hemp, IN:GUPTA, R. C. **Nutraceuticals - Efficacy, Safety and Toxicity**, 1.Ed., Academic Press, p. 735-754, 2016.

HAUSMAN-KEDEM, M.; MENASCU, S.; KRAMER, U. Efficacy of CBD-enriched medical cannabis for treatment of refractory epilepsy in children and adolescents - An observational, longitudinal study. **Brain & Development**, v. 40, n. 7, p. 544–551, 2018.

HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. **Mutagenesis**, v. 13, p. 89-94, 1998.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos Terapêuticos de Compostos da Planta Cannabis sativa. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 318-325, mar. /abr. 2006.

IBRAHIM, E. A.; WANG, M.; RADWAN, M. M.; WANAS, A. S.; MAJUMDAR, C. G.; AVULA, B.; WANG, Y. H.; KHAN, I. A.; CHANDRA, S.; LATA, H.; HADAD, G. M.; ABDEL SALAM, R. A.; IBRAHIM, A. K.; AHMED, S. A.; ELSOHLY, M. A. Analysis of Terpenes in Cannabis sativa L. Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. **Planta Med**, v. 85, p. 431–438, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3330.011**: Ensaio Cometa. Rev. 10. Rio de Janeiro, 2018. 77 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH) Guideline, Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2 (R1). Approval by the Steering Committee of S2 (R1) under Step 4 and recommendation for adoption to the three ICH regulatory bodies. 9 Nov.2011.

ISEPPI, R.; BRIGHENTI, V.; LICATA, M.; LAMBERTINI, A.; SABIA, C.; MESSI, P.; PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Chemical Characterization and Evaluation of the Antibacterial Activity of Essential Oils from Fibre-Type Cannabis sativa L. (Hemp). **Molecules**, v. 24, n. 2302, 2019.

JANSEN, C.; SHIMODA, L.; KAWAKAMI, J. K.; ANG, L.; BACANI, A. J.; BAKER, J. D.; BADOWSKI, C.; SPECK, M.; STOKES, A. J.; SMALL-HOWARD, A. L.; TURNER, H. Myrcene and terpene regulation of TRPV1. **Channels**, v. 13, n. 1, p. 344-366, 2019.

KAUDERER, B.; ZAMITH, H.; PAUMGARTTEN, F. J.; SPEIT, G. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 28-34, 1991.

KIM, J.; KIM, Y.; LEE, J.; KIM, M.; RHEE, S.; MOON, S.; PARK, K. Antimutagenic effect of major volatile compounds identified from mugwort (*Artemisia asiatica nakai*) leaves. **J. Korean Soc. Food Nutr.**, v. 21, p. 308-313, 1992.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; JR, KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat Res.**, v. 540, n. 2, p. 153-63, 2003.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, n. 2, p. 89-96, 1996.

KOPJAR, N.; FUCHS, N.; ŽUNEC, S.; MIKOLIĆ, A.; MICEK, V.; KOZINA, G.; LUCIĆ VRDOLJAK, A.; BRČIĆ KARAČONJI, I. DNA Damaging Effects, Oxidative Stress Responses and Cholinesterase Activity in Blood and Brain of Wistar Rats Exposed to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. **Molecules**, v. 24, n. 8, 2019.

KOZIOŁ, A.; STRYJEWSKA, A.; LIBROWSKI, T.; SAŁAT, K.; GAWEŁ, M.; MONICZEWSKI, A.; LOCHYŃSKI, S. An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes. **Mini reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156-1168, 2014.

LEUSSINK, V. I.; HUSSEINI, L.; WARNKE, C.; BROUSSALIS, E.; HARTUNG, H. P.; KIESEIER, B. C. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: the role of cannabinoids in treating spasticity. **Ther Adv Neurol Disord.**, v. 5, n. 5, p. 255-266, sep. 2012.

LEWIS, M. M.; YANG, Y.; WASILEWSKI, E.; CLARKE, H. A.; KOTRA, L. P. Chemical profiling of medical *Cannabis* extracts. **ACS Omega**, v.2, n. 9, p. 6091-6103, 2017.

LEWIS-BAKKER, M. M.; YANG, Y.; VYAWAHARE, R.; KOTRA, L. P. Extractions of Medical Cannabis Cultivars and the Role of Decarboxylation in Optimal Receptor Responses. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 4, n. 3, p. 184-194, 2019.

LIBERALESSO, P. B. N. Síndromes epilépticas na infância. Uma abordagem prática. **Residência Pediátrica**, n. 8, supl 1, p. 56-63, 2018.

LYNCH, A. M.; SASAKI, J. C.; ELESURU, R.; JACOBSON-KRAM, D.; THYBAUD, V.; DE BOECK, M.; AARDEMA, M. J.; AUBRECHT, J.; BENZ, R. D.; DERTINGER, S. D.; DOUGLAS, G. R.; WHITE, P. A.; ESCOBAR, P. A.; FORNACE, A. Jr.; HONMA, M.; NAVEN, R. T.; RUSLING, J. F.; SCHIESTL, R. H.; WALMSLEY, R. M.; YAMAMURA, E.; VAN BENTHEM, J.; KIM, J. H. New and emerging technologies for genetic toxicity testing. **Environ Mol Mutagen**. v.52, p.205-223, 2011.

MACGREGOR, J. T.; FRÖTSCHL, R.; WHITE, P. A.; CRUMP, K. S.; EASTMOND, D. A.; FUKUSHIMA, S.; GUÉRARD, M.; HAYASHI, M.; SOETEMAN-HERNÁNDEZ, L. G.; JOHNSON, G. E.; KASAMATSU, T.; LEVY, D. D.; MORITA, T.; MÜLLER, L.; SCHOENY, R.; SCHULER, M. J.; THYBAUD, V. IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure (PoD) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 783, p. 66-78, 2015.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. **Mutation Research**, n.113, p. 173-215, 1983.

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. **Int. Dairy J.**, v. 16, n. 11, p. 1374-1382, 2006.

MARX, T. K.; REDDEMAN, R.; CLEWELL, A. E.; ENDRES, J. R.; BÉRES, E., VÉRTESI, A.; GLÁVITS, R.; HIRKA, G.; SZAKONYINÉ, I. P. An Assessment of the Genotoxicity and Subchronic Toxicity of a Supercritical Fluid Extract of the Aerial Parts of Hemp. **Journal of Toxicology**, v. 2018, 2018.

MATOS, R. L. A.; SPINOLA, L. A.; BARBOZA, L. L.; GARCIA, D. R.; FRANÇA, T. C. C.; AFFONSO, R. S. O uso do canabidiol no tratamento da epilepsia. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 2, p. 786-814, 2017.

MELAS, P. A.; SCHERMA, M.; FRATTA, W.; CIFANI, C.; FADDA, P. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety and Mood Disorders: Molecular Targets and Epigenetic Insights from Preclinical Research. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 4, 2021.

MILLAR, S. A.; STONE, N. L.; BELLMAN, Z. D.; YATES, A. S.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. **Br J Clin Pharmacol**, v. 85, p.1888–1900, 2019.

MINGRONE, G.; DE GAETANO, A.; GRECO, A. V.; CAPRISTO, E.; CASTAGNETO, M.; GASBARRINI, G. Medium-chain triglycerides for parenteral nutrition: kinetic profile in humans. **Nutrition**, v. 11, n. 5, p. 418-422, 1995.

MITIĆ-CULAFIĆ, D.; ZEGURA, B.; NIKOLIĆ, B.; VUKOVIĆ-GACIĆ, B.; KNEZEVIĆ-VUKCEVIĆ, J.; FILIPIC, M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 1, p. 260-266, 2009.

MOREAU, R.L.M. Cannabis IN: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. Ed., São Paulo: Atheneu, 2014, p. 435-446.

MUMME, K.; STONEHOUSE, W. Effects of medium-chain triglycerides on weight loss and body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. **J. Acad. Nutr. Diet**, v. 115, n. 2, p. 249-263, 2015.

NASCIMENTO, A. G. T. P.; DALCIN, M. F. USO TERAPÊUTICO DA *Cannabis sativa*: UMA BREVE REVISÃO. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, v. 27, n.2, p.164-169, Jun-Ago, 2019.

National Toxicology Program (NTP). Comparative Toxicology Studies of Corn Oil, Safflower Oil, and Tricaprylin (CAS Nos. 8001-30-7, 8001-23-8, and 538-23-8) in Male F344/N Rats as Vehicles for Gavage. **Natl Toxicol Program Tech Rep Ser**, v. 426, p. 1-314, 1994.

NUUTINEN, T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 198-228, 2018.

OECD Guideline for the testing of chemicals. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. Adopted 29 July 2016. (OECD, 2016a)

OECD Guideline for the testing of chemicals. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Adopted 29 July 2016. (OECD, 2016b)

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat. Res.**, v.117, n. 1, p.79-92, 1989.

OLIVEIRA, B. Europa decide que canabidiol não é um narcótico. **CANNALIZE**, 30 nov. 2020. Disponível em: <<https://cannalize.com.br/europa-decide-que-canabidiol-nao-e-um-narcotico/>>. Acesso em: 05 set. 2021.

OOI, E. M.; WATTS, G. F.; NG, T. W.; BARRETT, P. H. Effect of Dietary Fatty Acids on Human Lipoprotein Metabolism: A Comprehensive Update. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4416-4425, 2015.

OZTURK, B.; ARGIN, S.; OZILGEN, M.; MCCLEMENTS, D.J. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. **Food Chem**. v.187, p. 499-506, 2015.

PAMPLONA, F.A.; SILVA, L. R.; COAN, A. C. Potential Clinical Benefits of CBD-Rich *Cannabis* Extracts over Purified CBD in Treatment-Resistant Epilepsy: Observational Data Meta-analysis. **Front Neurol**, v. 9, n. 759, 2018.

PASSOS, J. Mobilização pelo uso de remédios à base de canabidiol provoca mudanças na legislação. **Arquivo de Notícias FAPERJ**, 19 jun. 2019. Disponível em: <<http://www.faperj.br/?id=3779.2.9>>. Acesso em: 30 ago. 2019.



PATEL, S.; GRINSPOON, R.; FLEMING, B.; SKIRVIN, L. A.; WADE, C.; WOLPER, E.; BRUNO, P. L.; THIELE, E. A. The long-term efficacy of cannabidiol in the treatment of refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 62, n.7, p. 1594–1603, 2021.

PAVLOVIC, R.; NENNA, G.; CALVI, L.; PANSERI, S.; BORGONOVO, G.; GIUPPONI, L.; CANNAZZA, G.; GIORGI, A. Quality Traits of “Cannabidiol Oils”: Cannabinoids Content, Terpene Fingerprint and Oxidation Stability of European Commercially Available Preparations. **Molecules**, v. 23, n. 5, 1230, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6100014/pdf/molecules-23-01230.pdf>>. Acesso em: 02 de nov. de 2019.

PEGORARO, C. N.; NUTTER, D.; THEVENON, M.; RAMIREZ, C. L. Chemical profiles of cannabis sativa medicinal oil using different extraction and concentration methods. **Natural Product Research**, v. 35, n.13, p. 2249-2252, 2021.

PIOMELLI, D.; RUSSO, E. B. The *Cannabis sativa* Versus *Cannabis indica* Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. **Cannabis Cannabinoid Res.**, v. 1, n. 1, p. 44-46, 2016.

PRATI-DONADUZZI. Canabidiol brasileiro vira realidade com lançamento da Prati-Donaduzzi. **Notícias**, 22 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.pratidonaduzzi.com.br/noticias/item/1830-canabidiol-brasileiro-vira-realidade-com-lancamento-da-prati-donaduzzi>>. Acesso em: 05 set. 2021.

PRATI-DONADUZZI. Novas concentrações do Canabidiol Prati-Donaduzzi chegam às farmácias. **Notícias**, 19 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.pratidonaduzzi.com.br/imprensa/noticias/item/1930-novas-concentracoes-do-canabidiol-prati-donaduzzi-chegam-as-farmacias>>. Acesso em: 05 set. 2021.

RENARDIN, D.; SOARES, L. G.; HIGARASHI, I. H.; ABREU, I. S. Crianças com epilepsia: percepção e vivência de famílias. **Rev Fun Care Online**. n.11, v. 4, p. 1065-1071, jul/set, 2019.

ROBSON, P. J. Therapeutic potential of cannabinoid medicines. **Drug Test. Anal.**, v. 6, n. 1-2, p. 24-30, jan-fev, 2014.

ROCHA, E. D.; SILVA, V. E. A.; PEREIRA, F. C. S.; JEAN, V. M.; SOUZA, F. L. C. BARATTO, L. C.; VIEIRA, A.; CARVALHO, V. M. Qualitative terpene profiling of Cannabis varieties cultivated for medical purposes. **Pharmacognosy-Rodriguésia**, v. 71, e01192019, 2020.

RÖSCHEISEN, C.; ZAMITH, H.; PAUMGARTTEN, F. J.; SPEIT, G. Influence of  $\beta$ -myrcene on sister-chromatid exchanges induced by mutagens in V79 and HTC cells. **Mutation Research Letters**, v. 264, n. 1, p. 43-49, 1991.

RUSSO, C.; FERK, F.; MIŠÍK, M.; ROPEK, N.; NERSESYAN, A.; MEJRI, D.; HOLZMANN, K.; LAVORGNA, M.; ISIDORI, M.; KNASMÜLLER, S. Low doses of widely consumed cannabinoids (cannabidiol and cannabidivarin) cause DNA damage and chromosomal aberrations in human-derived cells. **Arch Toxicol**, v. 93, n. 1, p. 179–188, 2019.

RUSSO, E. B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 1344-1364, 2011.

SANTIAGO, M.; SACHDEV, S.; ARNOLD, J. C.; MCGREGOR, I. S.; CONNOR, M. Absence of entourage: terpenoids commonly found in *Cannabis sativa* do not modulate the functional activity of  $\Delta^9$ -THC at human CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 4, n. 3, p. 165–176, 2019.

SANTOS, A. B.; SCHERF, J. R.; MENDES, R. C. Eficácia do canabidiol no tratamento de convulsões e doenças do sistema nervoso central: revisão sistemática. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 1, p. 30-34, jan. 2019.

SCHAIQUEVICH, P.; RIVA, N.; MALDONADO, C.; VÁZQUEZ, M.; CÁCERES-GUIDO, P. Clinical pharmacology of cannabidiol in refractory epilepsy. Farmacología clínica de cannabidiol en epilepsias refractarias. **Farmacia hospitalaria: organo oficial de expresion cientifica de la Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria**, v. 44, n. 5, p. 222–229, 2020.

SERRA-PINHEIRO, M.; MEIRA, I.; ANGELIM, A.; FONSECA, F.; ZIMMERMANN, N. High prevalence of psychiatric comorbidities in children and adolescents at a tertiary epilepsy Center. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 79, p. 521- 526, 2021.

SHARMA, C.; AL KAABI, J. M.; NURULAIN, S. M.; GOYAL, S. N.; KAMAL, M. A.; OJHA, S. Poypharmacological properties and therapeutic potential of  $\beta$ -cayophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise. **Curr. Pharmaceut. Des.**, v. 22, n. 21, p. 3237-3264, 2016.

SILVA, S. A.; SARAIVA, A. L. L. USO DO CANABIDIOL EM PORTADORES DE CRISES CONVULSIVAS REFRATÁRIAS NO BRASIL. **Rev. UNINGÁ**, Maringá, v. 56, n. 1, p. 1-16, jan./mar. 2019

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v.175, n. 1, p.184-191, mar. 1988.

SMITH, A.; KAUFMAN, F.; SANDY, M.; CARDENAS, A. Cannabis Exposure During Critical Windows of Development: Epigenetic and Molecular Pathways Implicated in Neuropsychiatric Disease. **Curr Envir Health Rpt**, v. 7, p.325-342, 2020.

SOUZA, D. V.; CLAUDIO, S. R.; DA SILVA, C.; MARANGONI, K. P.; PERES, R. C.; RIBEIRO, D. A. Genomic Instability in Peripheral Blood and Buccal Mucosal Cells of Marijuana Smokers: The Impact of Tobacco Smoke. **Pac J Cancer Prev**, v. 21, n. 5, p. 1235-1239, 2020.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol Biol**, v. 314, p.275-286, 2006.

SULAK, D.; SANETO, R.; GOLDSTEIN, B. The current status of artisanal cannabis for the treatment of epilepsy in the United States. **Epilepsy & behavior: E&B**, v. 70, Pt B, p. 328–333, 2017.

SURAEV, A.; LINTZERIS, N.; STUART, J.; KEVIN, R. C.; BLACKBURN, R.; RICHARDS, E.; ARNOLD, J. C.; IRELAND, C.; TODD, L.; ALLSOP, D. J.; MCGREGOR, I. S. Composition and Use of Cannabis Extracts for Childhood Epilepsy in the Australian Community. **Nature Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 10154, 2018.

SURENDRAN, S.; QASSADI, F.; SURENDRAN, G.; LILLEY, D.; HEINRICH, M. Myrcene-What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? **Front Nutr**, v. 8, jul. 2021.

TAYLOR, J.; ELGORASHI, E.; MAES, ANNEMIE.; GORP, U.; KIMPE, N.; VAN STADEN, J.; VERSCHAEVE, L. Investigating the Safety of Plants Used in South African Traditional Medicine: Testing for Genotoxicity in the Micronucleus And Alkaline Comet Assays. **Environ Mol Mutagen**, v. 42, n. 3, p.144-54, oct. 2003.

TERNELLI, M.; BRIGHENTI, V.; ANCESCHI, L.; POTO, M.; BERTELLI, D.; LICATA, M.; PELLATI, F. Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content in both cannabinoids and terpenes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.186, n. 113296, 2020.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TRAUL, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food Chem Toxicol**, v. 38, n. 1, p. 79-98, 2000.

TROMPOWSKY, A. C. M. V. **Estudo da genotoxicidade *in vitro* de substâncias nitroimidazólicas como instrumento para busca de novos agentes tripanomicidas**. 2016. 151 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

TROMPOWSKY, A.C.M.V.; CONDE, T. R.; CALIL LEMOS, R.; QUARESMA, B.; PITOMBEIRA, M.; DE CARVALHO, A. S.; BOECHAT, N.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; ZAMITH, H. *In vitro* genotoxicity of nitroimidazoles as a tool in the search of new trypanocidal agents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114, e190017, 2019.

TSAI, Y. H.; PARK, S.; KOVACIC, J.; SNOOK, J. T. Mechanisms mediating lipoprotein responses to diets with medium-chain triglyceride and lauric acid. **Lipids**, v.34, n. 9, p. 895-905, 1999.

UJVÁRY I.; HANUŠ, L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. **Cannabis Cannabinoid Res.**, v. 1, n. 1, p. 90-101, mar. 2016.

UNIÃO EUROPEIA (UE). REGULAMENTO N. 1307/2013 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 17 de dezembro de 2013. Estabelece regras para os pagamentos diretos aos agricultores ao abrigo de regimes de apoio no âmbito da política agrícola comum e que revoga o Regulamento (CE) n.º 637/2008 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 73/2009 do Conselho. **Jornal Oficial da União Europeia**, 20 dez. 2013. Disponível em: <<https://eur->

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:347:0608:0670:EN:PDF>. Acesso em 02 nov.2019.

VALIM BRIGANTE, T. A.; ABE, F. R.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J.; CRIPPA, J.; DE OLIVEIRA, D. P. Cannabidiol did not induce teratogenicity or neurotoxicity in exposed T zebrafish embryos. **Chem Biol Interact.**, v. 291, p. 81-86, aug. 2018.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 119, n.3, p. 575-587, oct. 2008.

YACUBIAN, E. M. T. Tratamento da epilepsia na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, Supl.1, p. S19-S27, 2002.

YAO, I.; STEIN, E. S.; MAGGIO, N. Cannabinoids, hippocampal excitability and efficacy for the treatment of epilepsy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 202, p. 32-39, 2019.

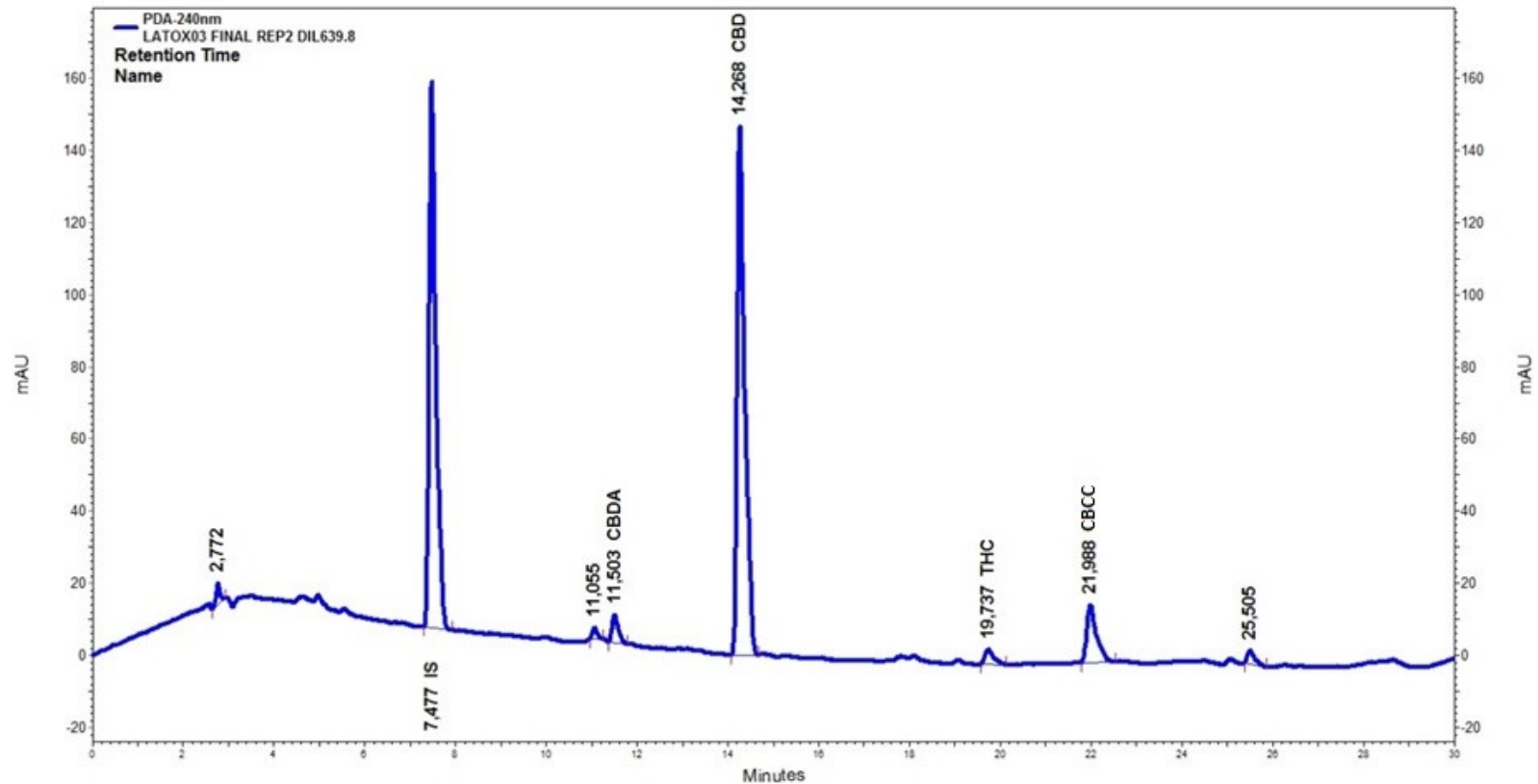
ZAHEER, S.; KUMAR, D.; KHAN, M. T.; GIYANWANI, P. R.; KIRAN, F. Epilepsy and Cannabis: A Literature Review. **Cureus**, v. 10, n. 9, e3278, 2018.

ZAMITH, H. P.; VIDAL, M. N.; SPEIT, G.; PAUMGARTTEN, F. J. Absence of genotoxic activity of beta-myrcene in the in vivo cytogenetic bone marrow assay. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 93-98, 1993.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 421-429, apr. 2006.

ZUARDI, A. W. History of *cannabis* as a medicine: a review. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 153-157, jun. 2006.

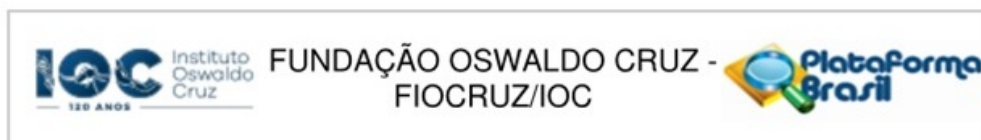
ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 271-280, set. 2008.

ANEXO 1 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *C. sativa*

PDA: comprimento de onda. mAU: área do pico. IS: Padrão interno (diazepam). CBDA: Ácido canabidiólico. CBD: Canabidiol. THC: Tetrahydrocannabinol. CBCC: Canabicromeno. Canabinóides detectados em PDA: 240 nm e identificados por seus espectros de absorção na região do ultravioleta em CLAE, em comparação com os padrões de referência e pelos tempos de retenção, com exceção do CBCC identificado por espectrometria de massas, mas não quantificado pela ausência de padrão de referência na CLAE. Equipamento de CLAE acoplado ao detector de arranjo de diodos (Thermo®) dotado de bomba quartenária Rheos 5600, automostrador Accela e detector PDA Accela de 20Hz. *Software* ChromQuest 5.0. Coluna cromatográfica, marca ACE, dimensões 250 x 4,6 mm e partículas de 5 µm em temperatura constante de 30°C. Eluição dos analitos no modo gradiente (solvente A: tampão formiato de amônio, 50 mM, pH 5,19 e solvente B metanol: 0-10 min de 32 a 15% de A; 10 a 20 min de 15 a 8% de A; 20 a 22 min de 8 a 5% de A, 22 a 25 min 5% de A; 25 a 30 min volta à condição inicial de 32% de A). Fluxo de 1,0 mL/min e injeção de 10 µL.

Fonte: (CARVALHO *et al.*, 2020).

## ANEXO 2 – COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO AO CEP/FIOCRUZ



**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE "in vitro" DE EXTRATOS DE "Cannabis sativa" UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRACTÁRIA.

**Pesquisador:** TALINE RAMOS CONDE

**Versão:** 1

**CAAE:** 42792921.6.1001.5248

**Instituição Proponente:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**DADOS DO COMPROVANTE**

**Número do Comprovante:** 008855/2021

**Patrocinador Principal:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Informamos que o projeto AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE "in vitro" DE EXTRATOS DE "Cannabis sativa" UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRACTÁRIA. que tem como pesquisador responsável TALINE RAMOS CONDE, foi recebido para análise ética no CEP Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC em 03/02/2021 às 17:06.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

## ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE "in vitro" DE EXTRATOS DE "Cannabis sativa" UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRATÁRIA.

**Pesquisador:** TALINE RAMOS CONDE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 42792921.6.1001.5248

**Instituição Proponente:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**Patrocinador Principal:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.576.325

**Apresentação do Projeto:**

As informações descritas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1406039, de 02/03/2021.

Trata-se da 2ª versão do projeto "AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE "in vitro" DE EXTRATOS DE "Cannabis sativa" UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRATÁRIA" com finalidade de atender às pendências emitidas por este CEP no parecer nº 4.554.690 em 24 de fevereiro de 2021.

O estudo é o projeto de mestrado da pesquisadora responsável. A pesquisadora com o presente projeto propõe avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de extrato de Cannabis sativa em células de sangue periférico humano. Será utilizado extrato de Cannabis sativa foi obtida e cedida pelo projeto de "Pesquisa e Extensão Farmacannabis: avaliação preliminar de segurança do tratamento de enfermidades neurológicas da infância com extratos de cannabis" da UFRJ (CAAE: 82021817.0.0000.5257, em 08/02/2018).

As amostras de sangue serão obtidas de colaboradores do INCQS, recrutados por meio de palestra

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manginhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.576.325

de sensibilização prévia e convite fixados nos corredores internos da unidade. O estudo prevê a participação de 10 participantes, que serão submetidos até três coletas de sangue cada. Serão incluídos participantes de ambos os sexos, com idade entre 26 e 34 anos, saudáveis, sem exposição a raios-X nos últimos três meses, não fumantes, preferencialmente que não consumam bebidas alcoólicas, ou estejam fazendo uso de medicamentos no momento da coleta e não façam uso medicinal ou recreativo de derivados de C. sativa. Serão coletados, no máximo, 13mL de sangue periférico por profissional habilitado e membro da equipe de pesquisa.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de extratos de C. sativa utilizados por famílias brasileiras como terapia no controle de convulsões em crianças com epilepsia refratária.

Objetivos Secundários:

- 1-Realizar o EC em condições alcalinas em células sanguíneas humanas in vitro de extratos de C.sativa preparados pelo LATox da UFRJ;
- 2-Realizar o EMnBC em células sanguíneas humanas in vitro de extratos de C.sativa preparados pelo LATox da UFRJ;
- 3-Relacionar os resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade com a composição dos extratos preparados e analisados quanto aos teores de THC e CBD e terpenos pelo LATox da UFRJ.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Segundo a pesquisadora: "Os riscos físicos relacionados à coleta de sangue, embora não sejam frequentes, podem incluir pequeno incômodo no local de coleta e formação de hematoma na pele. Raramente pode haver desmaio no momento da punção, pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha. Para evitar esses possíveis riscos as coletas serão realizadas de forma segura, em local tranquilo, por um profissional habilitado da equipe, utilizando material descartável. Os riscos relacionados à dimensão psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, como possibilidade de discriminação e estigmatização a partir da divulgação dos resultados; divulgação de dados confidenciais; interferência na vida e na rotina dos participantes; embaraço de interagir com estranhos; medo de repercussões eventuais; além da

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br





FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.576.325

possibilidade de utilização dos dados em pesquisas futuras podem ser minimizados de acordo com os procedimentos adotados a seguir:

- As amostras coletadas serão integralmente utilizadas no mesmo dia de coleta. Caso haja sobra das amostras de sangue, as mesmas serão descartadas conforme normas vigentes na instituição, não serão armazenadas ou utilizadas em outras pesquisas.
- Além da coleta de sangue os participantes responderão a um pequeno questionário com informações sobre seu estado de saúde, sendo garantida a sua liberdade em não responder às questões que considerar constrangedoras.
- Todo o procedimento para obtenção dos dados, preenchimento do TCLE e coleta de amostras de sangue levará cerca de 30 minutos e será realizado por um membro da equipe de pesquisa, em uma sala apropriada e reservada nas dependências do INCQS.
- A identidade dos participantes não será divulgada em nenhum momento. A amostra de sangue e o questionário serão anonimizados com códigos numéricos impossibilitando sua identificação. Somente os pesquisadores terão acesso aos dados da pesquisa e tratarão a identidade dos participantes com respeito, seguindo padrões profissionais de sigilo, assegurando e garantindo o sigilo e confidencialidade dos dados pessoais, através da assinatura do Termo de Confidencialidade e Sigilo por todos os membros da equipe de pesquisa.
- A qualquer momento, os participantes poderão se retirar ou se recusar a participar da pesquisa sem que haja qualquer penalidade. O estudo não acarretará nenhuma despesa aos participantes e não receberão qualquer quantia em dinheiro pela participação, entretanto, caso haja algum dano direto ou indireto decorrente da participação na pesquisa, os participantes poderão buscar indenização obedecendo às disposições legais vigentes no Brasil."

**Benefícios:**

"Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos aos participantes, entretanto, possibilitarão a geração de conhecimentos sobre os potenciais riscos tóxicos e genotóxicos provenientes da ingestão de extratos de "Cannabis sativa" por crianças com epilepsia refratária. Desta forma, através deste projeto em parceria com a UFRJ, esperamos contribuir para o uso medicinal da Cannabis avaliando a segurança dos diferentes extratos obtidos."

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.576.325

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo está bem estruturado e com redação clara. O projeto apresenta metodologia que poderá atender aos objetivos propostos.

A pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/12, a Resolução 510/16 do CNS e a Normativa 01de 2013 no que diz respeito ao participante da pesquisa, uma vez que atendeu às Pendências Éticas sinalizadas na 1ª versão.

**Desfecho Primário:**

Segundo a pesquisadora: "SEGURANÇA DE USO: O estudo irá avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de extratos de "C. sativa" utilizados por famílias brasileiras como terapia no controle de convulsões em crianças com epilepsia refratária, verificando através dos Ensaio Cometa e Micronúcleo, se diferentes concentrações de extrato de "C. sativa" podem causar danos ao DNA em células sadias "in vitro". Assim, trazer informações quanto ao potencial risco desses extratos à saúde humana."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Na presente versão, foram apresentados e avaliados os seguintes documentos:

- 1-PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1406039-Riscos foram revistos;
- 2-Folha de Rosto, revisada. Dra. Taline Ramos Connde assina e carimba como pesquisadora responsável e data em 30/10/2020. Antonio Eugenio Castro de Almeida, diretor do INCQS- Fiocruz assina e carimba os campos Instituição proponente e patrocinador principal e data em 19/01/2021;
- 3-Carta resposta, em papel timbrado, com data de 02 de março de 2021, sem assinatura;
- 4-Carta resposta, em papel timbrado, com data de 02/03/2021, assinado e carimbado pela a pesquisadora;
- 5-TalineConde\_ProjetoCannabis\_TCLENovo3, revisado em Word, com as alterações sinalizadas e
- 6-TalineConde\_ProjetoCannabis\_TCLENovo3, revisado em PDF, sem as alterações sinalizadas.

**Recomendações:**

O projeto deverá ser desenvolvido na forma em que foi aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.576.325

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto na presente versão está em conformidade com a Resolução 466/12, a Resolução 510/16 do CNS e a Normativa 01 de 2013 no que diz respeito ao participante da pesquisa, após atender as seguintes pendências.

1) No documento "PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1406039":

a) Rever o item riscos e incluir outros riscos.

Foram mencionados somente riscos físicos relativos a coleta de sangue, assim como formas de minimização dos mesmos. Além desses riscos ressaltar que a possibilidade de quebra de sigilo e confidencialidade deve ser considerada como risco da pesquisa e que, essa possibilidade, será minimizada pela assinatura do termo de confidencialidade por cada membro da equipe, além da garantia de anonimização dos dados do participante da pesquisa pela codificação das amostras e dados coletados e limitação de acesso aos dados gerados. Incluir também possibilidade de constrangimento, desconforto, discriminação, divulgação de dados confidenciais e utilização dos dados em pesquisas futuras e que para esses riscos a equipe utilizará local reservado para obtenção de dados, preenchimento do TCLE e coleta de amostras, além disso, estará garantida a liberdade do participante não responder questões que considere constrangedoras. Estará garantida a não violação e a integridade dos documentos e utilização do material biológico e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista neste estudo e autorizada pelo participante e que o material sobressalente será descartado conforme normas vigentes.

**RESPOSTA DA PESQUISADORA:**

"O item "Risco" no formulário da Plataforma Brasil foi revisado, sendo incluída a possibilidade de outros riscos previstos na Res 466/12, assim como a forma de minimizá-los. As informações inseridas para minimizar os riscos já constavam no TCLE e foram melhor detalhadas para atender à solicitação."

**PENDÊNCIA ATENDIDA**

2) No documento "TalineConde ProjetoCannabis QuestionarioParticipantes", o pesquisador usa o termo "doador" no título do questionário ("QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO COMO DOADOR PARA O PROJETO"). Substituir o termo "doador" por participante da pesquisa.

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.576.325

**RESPOSTA DA PESQUISADORA:**

No documento "Taline Conde Projeto Cannabis Questionario Participantes", o título do questionário foi alterado de "QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO COMO DOADOR PARA O PROJETO:" para "QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO:" e anexado o documento "Taline Conde Projeto Cannabis Questionario Participantes 2".

**PENDÊNCIA ATENDIDA**

3) No documento "TalineConde\_ProjetoCannabis\_FolhaRosto\_atual" (Folha de rosto), incluir junto a assinatura da Dra. Taline Ramos Conde, no campo pesquisador responsável, carimbo para que possa ser feita a identificação de quem está assinando ou texto em fonte legível.

**RESPOSTA DA PESQUISADORA**

No documento "Taline Conde Projeto Cannabis Folha Rosto atual" (Folha de rosto), a folha de rosto devidamente carimbada abaixo da assinatura do Pesquisador Responsável, sendo anexado o novo documento "Taline Conde Projeto Cannabis Folha Rosto Atual Carimbada.pdf"

**PENDÊNCIA ATENDIDA**

**ADICIONAL - RESPOSTA DA PESQUISADORA**

4) Além das alterações acima solicitadas, o TCLE do projeto foi modificado para adequar às alterações realizadas. Os novos documentos foram anexados no formulário da Plataforma Brasil. O arquivo do TCLE em Word indica as alterações realizadas em fonte azul e sublinhadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) em sua 282ª Reunião Ordinária, realizada em 23.02.2021, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto em Ad Referendum.

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.576.325

Este CEP ressalta a importância do envio dos relatórios parciais e final, sendo uma das responsabilidades assumidas pelo pesquisador ao submeter o seu projeto para apreciação (Resolução CNS 466/2012, XI.2.d e Resolução CNS 510/2016, Art. 28, V).

O Relatório Parcial deverá ser encaminhado anualmente e,

O Relatório de Conclusão (Final) deverá ser enviado aproximadamente em 30 a 60 dias após o término do projeto. Ambos os tipos de relatórios deverão ser apresentados via Plataforma Brasil, no modo/ferramenta "Notificação".

A observância dos prazos de envio dos relatórios parciais ou finais é estritamente de responsabilidade do pesquisador. A não obediência aos prazos estipulados poderá implicar na NÃO APROVAÇÃO dos relatórios.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1406039.pdf	02/03/2021 11:58:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TalineConde_ProjetoCannabis_TCLEno vo3.pdf	02/03/2021 11:56:55	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TalineConde_ProjetoCannabis_TCLEno vo3.docx	02/03/2021 11:56:34	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	TalineConde_ProjetoCannabis_CartaResposta_Pendencias.pdf	02/03/2021 11:45:49	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	TalineConde_ProjetoCannabis_CartaResposta_Pendencias.doc	02/03/2021 11:43:53	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Folha de Rosto	TalineConde_ProjetoCannabis_FolhaRosto_AtualCarimbada.pdf	02/03/2021 11:35:32	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	TalineConde_ProjetoCannabis_QuestionarioParticipantes2.pdf	28/02/2021 13:58:30	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TalineConde_ProjetoCannabis_PROJETOdetalhado2_jan2021.pdf	03/02/2021 15:59:02	TALINE RAMOS CONDE	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 4.576.325

Declaração de Pesquisadores	TalineConde_ProjetoCannabis_TermoConfidencialidadeSigilo2.pdf	02/02/2021 00:32:25	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TalineConde_ProjetoCannabis_TermoAnuencia_INCQS.pdf	02/02/2021 00:31:00	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Orçamento	TalineConde_ProjetoCannabis_OrçamentoProjeto.pdf	29/01/2021 17:38:20	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Cronograma	TalineConde_ProjetoCannabis_CronogramaProjeto2.pdf	29/01/2021 17:24:09	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TalineConde_ProjetoCannabis_TermoAnuencia_FF_UFRJ.pdf	29/01/2021 17:17:19	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	ATA_CONGREGACAO_ProjetoFarmacocannabisUFRJ.pdf	28/01/2021 00:43:18	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	Oficio_ParceriaINCQSeUFRJsobreProjetoCannabis.pdf	28/01/2021 00:39:30	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	TalineConde_ProjetoCannabis_DeclaracaoDoacaoDeExtrato_AvaliacaoGenotoxicidade.pdf	23/01/2021 22:09:54	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Outros	TalineConde_ProjetoCannabis_CONVITEparticipantes.pdf	23/01/2021 22:08:22	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TalineConde_ProjetoCannabis_DeclaracaoBiorrepositorio.pdf	23/01/2021 22:04:11	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Brochura Pesquisa	TalineConde_ProjetoCannabis_PreProjetoSelecaoMestrado.pdf	28/07/2020 17:57:55	TALINE RAMOS CONDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TalineConde_ProjetoCannabis_aprovadoSeminariosII.pdf	28/07/2020 17:42:17	TALINE RAMOS CONDE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 06 de Março de 2021

Assinado por:

**Maria Regina Reis Amendoeira  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

## APÊNDICE A – CONVITE AOS PARTICIPANTES



# CONVITE

AOS FUNCIONÁRIOS E COLABORADORES INTERNOS DO INCQS

## DOAÇÃO DE SANGUE

---

O SETOR DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

CONVIDA INTERESSADOS EM DOAR SANGUE PERIFÉRICO  
PARA O PROJETO:

“AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATOS DE *Cannabis sativa* UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRATÁRIA.”

PROCURAR POR:

**TALINE RAMOS CONDE**

LOCAL:

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA

BLOCO 7

SETOR DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

**SALA 108**

(Ramal: 5278 ou 5235)



## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo intitulado “**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATOS DE *Cannabis sativa* UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRACTÁRIA.**”. Você receberá da pesquisadora responsável, Taline Ramos Conde, do Setor de Citotoxicidade e Genotoxicidade do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, todas as informações necessárias para pleno entendimento quanto aos detalhes relevantes do presente estudo. A equipe da pesquisa estará à disposição para qualquer esclarecimento sobre o estudo e sobre a participação em qualquer momento. Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo (Dados para contato encontram-se no final deste documento).

- O estudo tem como objetivo avaliar se substâncias contidas em extratos de *C. sativa* (Maconha) utilizados como terapia no controle de convulsões podem causar citotoxicidade e/ou genotoxicidade ao ser humano. Para responder a esta questão, há a necessidade de testar estes extratos *in vitro* em células de sangue humano (coletado por punção venosa) para verificar se as substâncias contidas nos extratos causarão morte das células, retardo do ciclo celular (citotoxicidade) ou dano ao DNA (genotoxicidade/mutagenicidade). Porém, se for detectado danos no DNA das células sanguíneas que não foram tratadas, a amostra de sangue coletada não poderá ser utilizada, e deverá ser informado ao participante;

Rubrica do Participante:	Rubrica do Pesquisador:
--------------------------	-------------------------





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



- Participarão do estudo pessoas de ambos os sexos e que preencham os seguintes requisitos: ter idade entre 26 e 34 anos; não ter sido exposta a raios-X nos últimos 3 meses, não ser fumante, preferencialmente não consumir bebidas alcoólicas, não estar fazendo uso de medicamentos no momento e não fazer uso medicinal ou recreativo de derivados de *Cannabis sativa* (maconha).
- Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos aos participantes, entretanto, possibilitarão a identificação de extratos de *C. sativa*, com eficácia demonstrada na redução de crises convulsivas em crianças e teores de  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD) determinados, porém destituídos de atividades citotóxica e genotóxica em células sanguíneas humanas. Desta forma espera-se contribuir para o uso medicinal da *C. sativa* no tratamento das epilepsias refratárias a tratamentos convencionais avaliando a segurança dos diferentes extratos obtidos pelo Laboratório de Análises Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Estima-se que, mundialmente, mais de 50 milhões de pessoas são atingidas pela epilepsia, cerca de 40 milhões em países em desenvolvimento, apresentando grande importância em termos de saúde pública. As epilepsias refratárias ou de difícil controle correspondem a cerca de 20% a 30% dos pacientes epiléticos, uma vez que as crises são persistentes mesmo empregando-se tratamento com fármacos antiepiléticos potencialmente eficazes. Assim, são necessárias iniciativas por parte dos órgãos competentes para desenvolver terapias eficazes e seguras para a população afetada. Você poderá ter acesso a qualquer resultado gerado a qualquer momento da pesquisa.
- O estudo terá duração de 2 anos e as amostras coletadas serão integralmente utilizadas no mesmo dia de coleta. Caso haja sobra das amostras de sangue, as mesmas serão descartadas conforme normas vigentes na instituição, não serão armazenadas ou utilizadas em outras pesquisas;

Rubrica do Participante:	Rubrica do Pesquisador:

Página 2 de 5



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



- Os participantes da pesquisa participarão da etapa de coleta sanguínea, como doador, para realização dos ensaios de citotoxicidade, Cometa e/ou micronúcleo;
- Para este estudo pedimos sua autorização para coletar um pouco de sangue da veia do seu braço. Poderá ser doado um volume sanguíneo em torno de 2,5 mL para o caso de realização do ensaio de citotoxicidade (determinação de letalidade celular), previamente ao ensaio de genotoxicidade Cometa para avaliação de quebras de fita de DNA; cerca de 6 mL para o caso de realização do ensaio Cometa; e cerca de 13 mL para o caso de realização dos ensaios simultâneos de citotoxicidade (índice de replicação) e do ensaio de mutagenicidade de micronúcleo que detecta fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros;
- Os riscos, incômodos e desconfortos físicos locais que podem ocorrer na participação são os normais de uma coleta sanguínea. Embora não sejam frequentes, podem incluir desmaio, dor e/ou mancha roxa na pele. Mais raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha. Para evitar esses danos a coleta será feita de forma segura, por um profissional habilitado da equipe, e utilizando somente material descartável. De qualquer forma, caso ocorra alguns desses problemas, você poderá procurar a equipe da pesquisa para orientação.
- Além da coleta de sangue você responderá um pequeno questionário com informações sobre sua saúde. Todo o procedimento levará cerca de 30 minutos e será realizado em uma sala apropriada nas dependências do INCQS.
- A identidade dos participantes não será divulgada em nenhum momento. A amostra de sangue e o questionário serão anonimizados com códigos numéricos impossibilitando sua identificação. Somente os pesquisadores terão acesso aos dados da pesquisa e

Rubrica do Participante:

Rubrica do Pesquisador:

Página 3 de 5

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil  
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

[www.incqs.fiocruz.br](http://www.incqs.fiocruz.br)



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**INCQS**

tratarão sua identidade com respeito, seguindo padrões profissionais de sigilo, assegurando e garantindo o sigilo e confidencialidade dos seus dados pessoais.

- A qualquer momento, você poderá se retirar ou se recusar a participar da pesquisa sem que haja qualquer penalidade. O estudo não acarretará nenhuma despesa aos participantes e você não receberá qualquer quantia em dinheiro pela participação, entretanto, caso haja algum dano direto ou indireto decorrente da sua participação na pesquisa, você poderá buscar indenização obedecendo as disposições legais vigentes no Brasil.
- Você receberá uma via deste documento e a outra via ficará arquivada com a equipe da pesquisa. Todas as páginas deverão ser rubricadas por você e pelo pesquisador responsável e a última página datada e assinada.
- Em caso de dúvida quanto à condução ética da pesquisa e seus métodos, você poderá entrar em contato com o "Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP Fiocruz/IOC" (Dados para contato encontram-se no final deste documento). O referido Comitê de Ética *"é uma instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma, o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto, de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade."*

Rubrica do Participante:	Rubrica do Pesquisador:
--------------------------	-------------------------

Página 4 de 5



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Após compreender perfeitamente tudo o que foi informado sobre a participação no mencionado estudo e estando consciente dos direitos, das responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a participação implicam, se você concordar em dele participar e dar o consentimento, coloque seu nome e assine nos locais indicados abaixo.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do (a) pesquisador (a): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Nome e endereço da responsável pela pesquisa**

Taline Ramos Conde

Setor de Citotoxicidade e Genotoxicidade

Laboratório de Toxicologia (Bloco 7 – sala 108)

Departamento de Farmacologia e Toxicologia - DFT / INCQS/FIOCRUZ

E-mail: [taline.conde@incqs.fiocruz.br](mailto:taline.conde@incqs.fiocruz.br)

Tel.: (21) 3865-5278/5235

**Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP Fiocruz/IOC**

Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4036, 7º andar - sala 705 (Expansão) - Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ

CEP: 21.040-360

Tel.: (21) 3882-9011

Tel./Fax: (21) 2561-4815

E-mail: [cepfiocruz@ioc.fiocruz.br](mailto:cepfiocruz@ioc.fiocruz.br)

Skype: cep\_fiocruz\_ioc

Página 5 de 5

## APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO COMO DOADOR



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**
**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

**QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO COMO DOADOR PARA O PROJETO:**

"AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE *in vitro* DE EXTRATOS DE *Cannabis sativa* UTILIZADOS POR FAMÍLIAS BRASILEIRAS COMO TERAPIA NO CONTROLE DE CONVULSÕES EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRATÁRIA."

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

Local de trabalho e/ou estágio: \_\_\_\_\_

1. Qual é a sua idade?

\_\_\_\_\_

2. É fumante? Qual a frequência diária?

\_\_\_\_\_

3. Com que frequência consome bebidas alcoólicas?

\_\_\_\_\_

4. Quando foi a sua última exposição a raios-X?

\_\_\_\_\_

5. Está atualmente fazendo uso de algum medicamento?

\_\_\_\_\_

6. Faz uso de algum derivado de *Cannabis sativa*, de forma recreativa ou medicinal?

\_\_\_\_\_

Página 1 de 1

 Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil  
 Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

[www.incqs.fiocruz.br](http://www.incqs.fiocruz.br)


## APÊNDICE D – PREPARO DE SOLUÇÕES EMPREGADAS NO ENSAIO COMETA

### 1 Solução PBS

- Cloreto de sódio	(PM 58,44)	32,0 g
- Cloreto de potássio	(PM 74,55)	0,8 g
- Fosfato de sódio dibásico	(PM 141,96)	4,6 g
- Fosfato de potássio monobásico	(PM 136,09)	0,8 g
- Água desionizada	qsp	4,0 L

- Dissolução com agitação magnética.
- Ajuste do pH a aproximadamente 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N.
- Esterilização por autoclavação durante 30 min. Pode-se também esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 µm).

### 2 Solução de agarose de ponto de fusão normal (agarose PFN) 1,5%

Para 200 lâminas, adicionou-se 6g de agarose PFN (Sigma A-9918) a 400 mL de solução PBS e aqueceu-se com o auxílio de bico de Bunsen a uma temperatura próxima à ebulição até a sua dissolução.

A agarose PFN 1,5% foi fervida três vezes antes de ser usada no ensaio.

### A solução de agarose PFN 1,5% foi usada para o revestimento das lâminas (camada inferior de agarose) de acordo com o procedimento abaixo:

- As lâminas limpas foram mergulhadas por pouco tempo na solução de agarose PFN 1,5% quente mantida em banho-maria a uma temperatura de  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ . A agarose deve alcançar até a metade da parte fosca da lâmina para assegurar que a mesma fique aderida adequadamente à lâmina.
- O lado posterior da lâmina foi seco, e em seguida, a lâmina foi colocada rapidamente sobre a estante na posição horizontal. Essa etapa deve ser realizada rapidamente para que se possa garantir uma boa distribuição da agarose.
- As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente *overnight* para secarem.
- Após secagem as lâminas foram armazenadas em caixas à temperatura ambiente por tempos prolongados (1 ano) até o dia do uso.

### 3 Solução de agarose de baixo ponto de fusão (agarose BPF) 0,5%

- Dissolução de 0,1g de agarose BPF (Sigma A-9414) em 20 mL de PBS pelo aquecimento com bico de Bunsen a uma temperatura próxima à da ebulição até a completa solubilização da agarose.

- Distribuição da agarose em volumes de 5 mL em erlenmeyer de 25 mL e manutenção na geladeira até o momento do uso.
- No ensaio, a agarose BPF 0,5% deve ser aquecida rapidamente até a sua completa dissolução.
- Após a dissolução, a agarose deve ser resfriada colocando-a em banho-maria a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  até o momento do uso.
- A solução de agarose BPF 0,5% foi empregada para a preparação da segunda camada de agarose conforme procedimento abaixo:
  - Em microtubo plástico de tampa achatada (0,6mL) adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  da suspensão celular ou mistura de incubação a 120  $\mu\text{L}$  de agarose BPF 0,5% mantida em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ ;
  - Homogeneizou-se uma vez para completa distribuição das células em agarose BPF 0,5%;
  - Em seguida, adicionou-se 120  $\mu\text{L}$  da mistura sobre a lâmina previamente revestida pela agarose PFN 1,5%;
  - Imediatamente após, colocou-se lamínula sobre a lâmina, evitando-se a formação de bolhas de ar;
  - Colocou-se em geladeira ( $4^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$ ) as lâminas em estantes por aproximadamente 5 min, até que a camada de agarose endurecesse;
  - Após cerca de 5 min, removeu-se a lamínula, deslizando-a delicadamente sobre a camada de agarose e logo em seguida, mergulhou-se lentamente a lâmina em recipiente contendo solução para lise celular gelada, recentemente preparada e protegida da luz;
  - As lâminas foram mantidas em geladeira ( $4^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$ ) *overnight*;
- No dia seguinte, procedeu-se a eletroforese.

#### 4 Solução para lise

##### a) Solução de lise 1

- Cloreto de sódio	2,5 M	(PM 58,44)	146,1 g
- EDTA dissódico	100mM	(PM 372,24)	37,2 g
- Tris	10 mM	(PM 121,14)	1,2 g
- Hidróxido de sódio		(PM 40)	8 g
- Sarcosinato de lauroilo sódico		(PM 293,4)	10 g
- Água desionizada		qsp	1000 mL

- Dissolver com agitação magnética em torno de 850 mL de água os 3 primeiros reagentes;
- antes da solubilização completa, adicionar 8 a 9g de hidróxido de sódio sólido para ajustar o pH em torno de 10;
- caso o pH esteja acima de 10 adicionar ácido clorídrico 10N;
- se for necessário, adicionar solução de hidróxido de sódio 1N para o ajuste ao pH em torno de 10;

- adicionar com agitação magnética 10 g de sarcosinato de lauroilo sódico (Sigma L-5125; PM 293,4) para obter a concentração final de 1% p/v;
- completar o volume final a 1000 mL com água desionizada;
- manter a solução à temperatura ambiente.
- antes da solubilização completa, adicionar 8g de hidróxido de sódio sólido para ajustar o pH para 10.

#### **b) Solução de lise 2 (final)**

- Triton X – 100	(PM 646,87)	1 mL
- DMSO	(PM 78,13)	10 mL
- Solução de lise 1		89 mL

- preparar a solução no dia do experimento;
- manter na geladeira (cerca de 8°C) por pelo menos 60 min antes do uso.

### **5 Solução tampão alcalina para eletroforese (NaOH 300 mN/EDTA 1mM)**

#### **a) Solução de hidróxido de sódio (10 N)**

Hidróxido de sódio (PM 40)	40 g
Água desionizada	100 mL

- Em capela química, adicionar lentamente a água ao pó em béquer;
- após cada adição, resfriar o béquer em banho de gelo;
- usar a solução no prazo máximo de 2 semanas após a sua preparação;
- manter à temperatura ambiente.

#### **b) Solução de EDTA 200 mM**

- EDTA dissódico (PM 372,24)	14,89 g
- Água desionizada qsp	200 mL

- Dissolução com agitação magnética;
- ajuste do pH da solução a aproximadamente 10 usando NaOH 10N;
- manutenção da solução à temperatura ambiente

#### **c) Solução tampão (NaOH 300 mN/EDTA 1mM)**

- Hidróxido de sódio 10 N	.....45 mL
- EDTA dissódico 200 mM	.....7,5 mL
- Água desionizada qsp.....	1500 mL

- A solução tampão deve ser preparada no dia do ensaio e mantida em geladeira por pelo menos 2h antes do seu uso.

### **6 Solução tampão para neutralização**

- Tris 0,4 M (PM 121,14).....	48,5 g
-------------------------------	--------



- Água desionizada qsp.....1000 mL

- Dissolver com agitação magnética;
- ajustar o pH para 7,5 com ácido clorídrico concentrado;
- manter a temperatura ambiente.

## 7 Solução corante de brometo de etídio:

### a) Solução de brometo de etídio 200 µg/mL (10 X concentrada):

- Brometo de etídio (PM 394,3).....0,005 g

- Água desionizada .....25 mL

### b) Solução de brometo de etídio 20 µg/mL (1 X concentrada):

- Solução de brometo de etídio 200 µg/mL.....0,25 mL

- Água desionizada .....2,25 mL

- Solução 1X concentrada preparada no dia do experimento; adição de 30 µL por lâmina

## 8 Solução corante de diacetato de fluoresceína (FDA) e brometo de etídio

### a) Solução A - FDA 5 mg/mL

- FDA (PM 416,4).....0,025 g

- Acetona.....5 mL

### b) Solução B - Brometo de etídio 200 µg/mL

- Brometo de etídio (PM 394,3).....0,005 g

- Solução PBS.....25 mL

### c) Solução corante de FDA 30 µg/mL e de brometo de etídio 8 µg/mL

- Solução A.....30 µL

- Solução B.....200 µL

- Solução PBS.....4,8 mL

- A solução corante c) deve ser preparada no dia do teste para determinação da viabilidade celular;
- 100 µL da solução corante deve ser adicionada a 100 µL de suspensão celular;

\* 50 µL da mistura deve ser adicionada à lâmina para microscopia seguida de colocação de lâmina para análise.

## 9 Solução de metanosulfonato de metila (MMS): controle positivo no ensaio Cometa

- MMS PM 110,13; d = 1,300

### a) Solução A - MMS $8 \times 10^{-2}$ M (80 mM):

- MMS.....20 µL

- PBS.....3 mL

**b) Solução B - MMS  $8 \times 10^{-4}$  M (0,8 mM):**

- Solução A.....10  $\mu$ L
- PBS.....990  $\mu$ L

• No ensaio Cometa, a solução B - MMS 0,8 mM (50  $\mu$ L) foi diluída em 200  $\mu$ L de sangue resultando na concentração final de 160  $\mu$ M

**10 Soluções de brometo de etídio (BrEt): controle positivo no ensaio Cometa com S9****a) Solução A – BrEt (1.000  $\mu$ g/mL):**

- BrEt (PM 394,3).....1 mg
- PBS.....1 mL

• No ensaio Cometa, a solução A - BrEt 1.000  $\mu$ g/mL (10  $\mu$ L) foi diluída em 200  $\mu$ L de sangue resultando na concentração final de 50  $\mu$ g/mL.

**b) Solução B - BrEt (400  $\mu$ g/mL):**

- Solução A.....0,5 mL
- PBS.....0,75 mL

• No ensaio Cometa, a solução B - BrEt 400  $\mu$ g/mL (10  $\mu$ L) foi diluída em 200  $\mu$ L de sangue resultando na concentração final de 20  $\mu$ g/mL.

**c) Solução C - BrEt (200  $\mu$ g/mL):**

- Solução A.....0,5 mL
- PBS..... 0,5 mL

• No ensaio Cometa, a solução C - BrEt 200  $\mu$ g/mL (10  $\mu$ L) foi diluída em 200  $\mu$ L de sangue resultando na concentração final de 10  $\mu$ g/mL

**11 Soluções de benzo-a-pireno (BaP) em DMSO 1% em PBS: controle positivo no ensaio Cometa com S9****a) Solvente (DMSO 20% em PBS):**

- DMSO ..... 0,5 mL
- PBS ..... 2 mL

**b) Solução A – BaP (1.000  $\mu$ g/mL):**

- BaP (PM 252,31).....1 mg
- DMSO 20% em PBS.....1 mL

• No ensaio Cometa, a solução A - BaP 1.000  $\mu$ g/mL (10  $\mu$ L) foi diluída em 200  $\mu$ L de sangue resultando na concentração final de 50  $\mu$ g/mL.

**c) Solução B - BaP (400  $\mu$ g/mL):**

- Solução A.....0,5 mL
- DMSO 20% em PBS.....0,75 mL

- No ensaio Cometa, a solução B - BaP 400 µg/mL (10 µL) foi diluída em 200 µL de sangue resultando na concentração final de 20 µg/mL.

**d) Solução C - BaP (200 µg/mL):**

- Solução A.....0,5 mL
- DMSO 20% em PBS..... 0,5 mL

- No ensaio Cometa, a solução C - BaP 200 µg/mL (10 µL) foi diluída em 200 µL de sangue resultando na concentração final de 10 µg/mL

**12 Soluções de ciclofosfamida (CP): controle positivo no ensaio Cometa com S9**

**a) Solução A – CP (40 mM):**

- CP (PM 279,1)..... 2,8 mg
- PBS..... 250 µL

- No ensaio Cometa, a solução A – CP 40 mM (10 µL) foi diluída em 200 µL de sangue resultando na concentração final de 2 mM.

**b) Solução B - CP (20 mM):**

- Solução A..... 125 µL
- PBS..... 125 µL

- No ensaio Cometa, a solução B – CP 20 mM (10 µL) foi diluída em 200 µL de sangue resultando na concentração final de 1 mM.

**c) Solução C - CP (10 mM):**

- Solução A..... 125 µL
- PBS..... 125 µL

- No ensaio Cometa, a solução C – CP 10 mM (10 µL) foi diluída em 200 µL de sangue resultando na concentração final de 0,5 mM.

## APÊNDICE E – PREPARO DE SOLUÇÕES EMPREGADAS NO ENSAIO DE MICRONÚCLEO *IN VITRO*

### 1 Meio RPMI 1640

**a) Meio RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM de HEPES sem NaHCO<sub>3</sub> lote: 1568811.Gibco: 23400-021 10 x 1L.**

- Meio RPMI	(1 pacote)	16,2 g
- Bicarbonato de sódio	(PM 84,01)	2,0 g
- Água desionizada	Qsp	1,0 L

- Dissolução com agitação magnética.
- Ajuste do pH a aproximadamente 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N.
- Esterilização por autoclavação durante 30 min. Pode-se também esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 µm).

### **b) Meio RPMI 1640 suplementado 1 (50 mL)**

- Soro fetal bovino- SFB (GIBCO: Ref. 10082-147) – 10mL
- GlutaMax (GIBCO: Ref. 35050-061) – 0,5mL
- FHA (PHA-M: Gibco, USA – Ref. 10576-015) – 0,750 mL
- Meio RPMI – qsp 50mL

- Uso: Estabelecimento das culturas e tratamentos

### **c) Meio RPMI 1640 suplementado 2 (50 mL)**

- SFB – 10mL
- GlutaMax – 0,5mL
- Meio RPMI – qsp 50mL

- Uso: Após retirar os tratamentos e para adição da citocalasina B

### 2 Solução NaCl 0,9%

- NaCl (PM 58,44)	2,7 g
- Água destilada	300 mL

### 3 Solução KCl 0,56%

- KCl (PM 58,44)	1,68 g
- Água destilada	300 mL

#### **4 Preparo da solução de citocalasina B (solução estoque 1000x concentrada: 4,5 mg/mL)**

- Citocalasina B                      10 mg
- DMSO                                      2,222mL

- Concentração final de uso da citocalasina B nas culturas: 4,5 µg/mL (Faixa recomendada: 3 a 6 µg/mL) em 0,1% de DMSO.
- Para diluir 1000X a solução de citocalasina B (4,5 mg/mL) em DMSO: adicionar 5 µL dessa solução em cada garrafa de cultura com 5mL de meio suplementado 2.

#### **5 Preparo da solução de Mitomicina C (MMC) 50 µg/mL**

##### **a) Solução estoque 500x concentrada 500 µg/mL**

- MMC (Sigma M4287)                      2 mg
- Água estéril                                      4 mL

- Manutenção da solução em freezer (cerca de -20°C) em alíquotas de 100µL.

##### **b) Solução de MMC 50 µg/mL**

- Solução estoque (500 µg/mL)                      30 µL
- Água destilada                                      270 µL

- Manutenção da solução em banho de gelo até o momento do uso.
- Considerando a adição de 100 µL de MMC (50 µg/mL) em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 1 (diluição 50 X), resulta na concentração final de MMC de 1 µg/mL no meio.

#### **6 Preparo da solução de Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina) 1 µg/mL**

##### **a) Solução estoque de Colcemid 10 µg/mL (COL1)**

- COL (PM 371,4)                                      5 mg
- Solução de NaCl 0,9%.                                      500 mL

- Dissolver inicialmente o COL em 10 mL de solução salina.
- Adição do restante da solução com agitação.
- Após completar o volume a 500 mL, realizar a filtração estéril com membrana de 0,22 µm.
- Separar em volumes de 50 mL por frasco de 100 mL.

##### **b) Solução de Colcemid 1 µg/mL (COL2)**

- COL1 (10 µg/mL)                                      30 µL
- Água destilada                                      270 µL

- Tratar as culturas com 100 µL de COL2 para 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 2, resultando na concentração final de 0,02 µg/mL.

**7 Solução de ciclofosfamida (CP) 2 mg/mL**

- Ciclofosfamida (PM 279,1)                      2 mg
- PBS    1 mL

**• Tratamento das culturas com CP (2 mg/mL):**

Concentração final de CP 10 µg/mL: 25 µL de solução CP em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 1

Concentração final de CP 10 µg/mL (+S9): 30,2 µL de solução CP em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 1 + 1,044 mL de mistura S9

Concentração final de CP 5 µg/mL(+S9): 15,1 µL de solução CP em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 1 + 1,044 mL de mistura S9

**8 Solução de metanosulfonato de metila (MMS) 4 mM****a) Solução estoque de metanosulfonato de metila (MMS) - MMS1 (80 mM)**

- MMS (PM 110,13)                      20 µL
- PBS    3mL

**b) Solução de MMS2 (4 mM)**

- Solução MMS1                              50 µL
- PBS    950 µL

• **Tratamento das culturas:** 100 µL de solução MMS2 em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 1 (**concentração final: MMS 80 µM**)

**9 Solução de metanol/ácido acético glacial (5:1)**

- Metanol    175 mL
- Água destilada                                      35 mL

**10 Solução de metanol/ácido acético glacial (5:1) + NaCl 0,9% (1:1)**

- Metanol/ácido acético glacial (5:1)                      30 mL
- Solução NaCl 0,9%                                      30 mL

**11 Solução corante de laranja de acridina (60 µg/mL)****a) Solução estoque de laranja de acridina (1mg/mL)**

- Laranja de acridina (PM 370,0)                      50 mg
- Ácido acético glacial                                      50 mL

**b) Solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,3 M)**

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PM 136,09)                                      10,21 g

- Água destilada 250 mL

**c) Solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,3 M)**

-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (PM 141,96) 10,65 g  
- Água destilada 250 mL

**d) Solução de laranja de acridina (concentração de uso: 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )**

- Solução estoque (1mg/mL) 6 mL  
-  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 M 10 mL  
-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3 M 10 mL  
- Água destilada 74 mL

- A solução de laranja de acridina permite diferenciação entre DNA e RNA.
- Uso de filtro na faixa de 450-490 nm e 520 nm acoplado ao microscópio de fluorescência para este corante

## APÊNDICE F – PREPARO DA FRAÇÃO S9 E MISTURA S9

### 1 Fração S9

#### 1.1 Descrição da fração S9

Procedência (MOLTOX 11-01L.2 – **Lote nº 4185**: Fração S9 liofilizada em KCl 0,15 M de fígado de rato Sprague Dawley induzido por Aroclor 1254 (Monsanto KL615). Dose por via ip: 500 mg/kg. Concentração de proteína: **38,4 mg/mL**

#### 1.2 Modo de preparo da fração S9

Reconstituir cada um dos frascos contendo fração S9 com 2,1 mL de água destilada estéril segundo Moltox. Agitar levemente para hidratar o liofilizado. Após a reconstituição da fração S9, congelar os tubos imediatamente em banho de gelo seco e estocar imediatamente a -80°C em tubos plásticos tipo Nunc de 0,5 mL, 1mL ou 1,8 mL. O volume da fração S9 reconstituída a ser colocada por tubo é dependente do volume a ser utilizado na preparação da mistura S9 por ensaio. No dia do ensaio, descongelar a fração S9 à temperatura ambiente e colocar em banho de gelo picado. A mistura S9 deve ser preparada assim que a fração S9 se descongele. Uma vez descongelada a fração S9 reconstituída **não poderá ser novamente congelada e reaproveitada, bem como a mistura S9.**

### 2. Mistura S9

As seguintes soluções, componentes da mistura S9, foram preparadas segundo MARON; AMES (1983) como recomendado pela Moltox.

- **Solução de MgCl<sub>2</sub> 0,4 M e KCl 1,65M (100 mL).**
- **Solução de glicose-6-fosfato 1M (10 mL).**
- **Solução NADP 0,1 M (5 mL).**
- **Solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 (500 mL) composta por:  
440 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M e 60 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2M.**

#### 2.1 Solução de MgCl<sub>2</sub> 0,4 M e KCl 1,65M. Volume: 100 mL

- KCl (PM 74,55) .....12,3 g
- \*MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (PM 203,30) .....8,14 g
- H<sub>2</sub>O destilada qsp.....100 mL

\*No caso de MgCl<sub>2</sub> anidro pesar 3,81 g

- Após dissolução em água, autoclavar por 20 min a 121°C. Manter a solução estéril em frasco de vidro em geladeira ou à temperatura ambiente.



## 2.2 Solução de glicose-6-fosfato 1M. Volume: 10 mL

- Glicose-6-fosfato (PM 282,12) .....2,82 g
- H<sub>2</sub>O destilada estéril.....10 mL
- Colocar 110 µL da solução/ tubo plástico tipo Nunc (0,5 mL) estéril. Para cada 20 mL de mistura S9 são empregados 100 µL da solução de glicose-6-fosfato.
- Armazenar no freezer a -20° C a solução de glicose-6-fosfato em alíquotas de 110 µL (estáveis por pelo menos 6 meses).
- A solução pode ser esterilizada com filtro de 0,22 µM.

## 2.3 Solução de NADP 0,1 M

- NADP (PM 765,4) .....0,383 g\*\*
- H<sub>2</sub>O destilada estéril.....5 mL

\*\* Checar a fórmula molecular indicada para cada lote de NADP

O NADP deve ser adicionado a tubos de vidro estéreis com tampa de rosca, pré pesados (MARON; AMES, 1983). Para cada 20 mL de mistura S9 são necessários 800 µL de NADP 0,1 M. Para dar uma margem de segurança, pesar 64 mg de NADP para o volume de 840 µL de solução. Calcular a massa de NADP em função do volume a ser empregado de mistura S9 por ensaio. Estas alíquotas secas pesadas nos tubos são envolvidas com folha de alumínio para proteger da luz. A massa de NADP deve ser indicada no rótulo bem como o volume de água destilada estéril para preparação da solução 0,1 M. Recomenda-se colocar os tubos com NADP pesado em dissecador com sílica gel ou outro dissecante. O dissecador com os tubos envoltos com papel de alumínio é mantido a -20°C. Quando for usar o NADP, na mistura S9, remover um tubo do dissecador, adicionar a quantidade especificada de água e misturar pelo vortex até que o NADP se dissolva. Coloque o tubo em banho de gelo. Não há necessidade de esterilizar por filtração usando filtro de 0,22 µM, mas caso se deseje pode ser feito. A solução que sobrou no frasco de armazenamento pode retornar ao freezer para uso futuro. Soluções de NADP armazenadas no freezer são estáveis por pelo menos 6 meses.

## 2.4 Solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4

### a) Solução A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2 M

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....13,8 g
- H<sub>2</sub>O destilada.....500 mL

### b) Solução B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....14,2 g
- H<sub>2</sub>O destilada.....500 mL

### c) Preparo de 500 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4

- Solução A.....60 mL\*
- Solução B.....440 mL\*

\*Estes são valores aproximados de soluções

- Medir o valor do pH da solução tampão. Caso o pH esteja muito baixo, adicionar mais solução B até atingir o pH 7,4. Esterilizar por autoclavação por 20 min a 121°C.

## 2.5 Preparo da mistura S9

No preparo de 20 mL da mistura S9, contendo 10% v/v de fração S9, adicionar os componentes na ordem indicada na formulação abaixo. Começar pela adição de água destilada estéril e finalizando com a fração S9.

### Composição da mistura S9 (20 mL)

- H<sub>2</sub>O destilada estéril.....6,7 mL
- Solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4.....10 mL
- Solução NADP 0,1 M.....800 µL
- Solução Glicose-6-fosfato 1M.....100 µL
- Solução de MgCl<sub>2</sub> 0,4 M e KCl 1,65M.....400 µL
- Fração S9.....2 mL

*No preparo de 20 mL de mistura S9 empregou-se tubo plástico tipo Nunc (50 mL) envolto em papel de alumínio) em banho de gelo picado em isopor*

- A mistura S9 deve ser preparada no momento do tratamento.
- A água destilada, a solução tampão e a solução de sais (MgCl<sub>2</sub> e KCl) devem estar previamente resfriadas
- As soluções de NADP e glicose-6-fosfato mantidas congeladas a -20°C devem ser mantidas à temperatura ambiente até o descongelamento. Imediatamente após o descongelamento, homogeneizar as soluções e empregá-las para preparação da mistura S9. Estas soluções após o descongelamento devem ser mantidas também em isopor com gelo picado.
- A fração S9, previamente reconstituída com água destilada e congelada, após o descongelamento deve ser mantida em banho de gelo picado.
- Para a realização dos testes preliminares para definição do Cp na presença da mistura S9, dos 3 ensaios (BrEt/DAF; EC e EMnBC) com TCM e com o extrato de *Cannabis* foram

reconstituídos 2 frascos de fração S9 com 2,1 mL de água estéril para cada frasco. A mistura S9 continha 10% de fração S9 em todos os ensaios realizados.

- As condições experimentais dos ensaios estão descritas em Notas 1, 2 e 3 abaixo:
  - Nota 1: O teste preliminar BrEt/DAF e EC para definição do Cp foram realizados com CC, Cs-PBS, Cs-DMSO1% PBS e 3 concentrações de cada substância candidata (BrEt, BaP e CP), em duplicata.
  - Nota 2: Os três ensaios BrEt/DAF e 3 EC foram realizados com 3 concentrações de TCM e 4 concentrações de extrato, além do CC, Cs-PBS e 2 concentrações de Cp, com tratamento em duplicata em cada ensaio.
  - Nota 3: Os 2 EMnBC foram realizados com 4 concentrações de TCM, 5 concentrações do extrato de *C. sativa*, o CC e o Cp em culturas em duplicata.
- No caso do emprego da fração S9 líquida e congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , descongelar a fração S9 à temperatura ambiente e, logo após o descongelamento manter a fração em banho de gelo picado até o momento de adição às soluções acima para a preparação da mistura S9. Ao homogeneizar suavemente a mistura S9, utilizar pipeta de vidro estéril procurando evitar a formação de bolhas de ar. A mistura S9 deverá ser mantida resfriada em banho de gelo em fluxo laminar com a luz apagada do fluxo, pois além do NADP na mistura S9, as substâncias controle positivas empregadas (brometo de etídio, ciclofosfamida) são fotossensíveis.
- Após o preparo, a mistura S9 deve ser mantida em banho de gelo até a adição às culturas.

## APÊNDICE G – RESULTADOS DOS ENSAIOS INDIVIDUAIS DE CITOTOXICIDADE E COMETA DO VEÍCULO TCM

No ensaio DAF/BrEt 1, o TCM não induziu decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao controle celular (0,0%), nas concentrações de 2,5% e 10%, e letalidade celular muito reduzida para as concentrações de 5% (1,0%), 20% (1,0%) e 50% (0,5%) de TCM, como mostrado na Tabela G1. As diluições testadas apresentaram níveis aceitáveis de citotoxicidade, bem inferiores ao valor máximo permitido de 30% no EC, indicando que o TCM poderá ser utilizado como solvente dos extratos na faixa testada de 2,5% a 50%.

Tabela G1 – Citotoxicidade do veículo TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica: ensaio DAF/BrEt. 1 Tratamento: 2h a 37°C

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>1</sup> (%)
Controle celular	0,0
TCM 2,5%	0,0
TCM 5%	1,0
TCM 10%	0,0
TCM 20%	1,0
TCM 50%	0,5

TCM: Triglicerídeos de cadeia média. DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: Brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

A Tabela G2 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o EC1 do TCM realizado em C57BL/6 *in vitro*. O veículo TCM, não apresentou genotoxicidade nas concentrações testadas, uma vez que não houve aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparado ao controle celular. O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle celular.

Tabela G2 – Ensaio Cometa 1 do veículo TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle</b>					
Controle celular	92,5	7,5	0	0	15
<b>TCM<sup>1</sup></b>					
TCM 2,5%	98,5	1,5	0,0	0,0	3
TCM 5%	94,0	5,5	0,5	0,0	13
TCM 10%	98,0	2,0	0,0	0,0	4
TCM 20%	98,5	1,0	0,5	0,0	4
TCM 50%	95,5	4,5	0,0	0,0	9
<b>Controle positivo</b>					
MMS 160 $\mu\text{M}$ <sup>2</sup>	0,0	0,5	11,5	88,0	575 ****

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \*\*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

Concomitantemente ao segundo EC (EC2), foi realizado o segundo ensaio de citotoxicidade DAF/BrEt (DAF/BrEt 2) do TCM. A Tabela G3 mostra os resultados do ensaio DAF/BrEt. 2 do TCM em CSHT.

Tabela G3 – Citotoxicidade do veículo TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica: ensaio DAF/BrEt. 2. Tratamento: 2h a 37°C

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>1</sup> (%)
Controle celular	0,0
TCM 2,5%	1,0
TCM 5%	1,5
TCM 10%	6,5
TCM 20%	3,0
TCM 50%	2,0

TCM: Triglicerídeos de cadeia média. DAF: diacetato de fluoresceína (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). BrEt: brometo de etídio (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). <sup>1</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

As 5 concentrações de TCM foram levemente citotóxicas em CSHT causando letalidade celular de 1%; 1,5%; 6,5%; 3% e 2%, respectivamente, nas concentrações de TCM 2,5; 5; 10; 20 e 50% quando comparadas ao valor de 0% para o controle celular. A faixa de concentrações de TCM no DAF/BrEt. 2, como no DAF/BrEt 1 mostraram níveis aceitáveis de citotoxicidade para ser empregada no EC2.

A Tabela G4 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o EC2 realizado em CSTH *in vitro*. O TCM não foi genotóxico nas concentrações testadas, não induzindo aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparado ao controle celular. O controle positivo, MMS 160  $\mu\text{M}$ , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

Tabela G4 – Ensaio Cometa 2 do veículo TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* sem ativação metabólica. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle</b>					
Controle celular	95,0	5,0	0	0	10
<b>TCM<sup>1</sup></b>					
TCM 2,5%	91,5	7,0	1,0	0,5	21
TCM 5%	93,0	5,5	1,0	0,5	18
TCM 10%	92,5	6,5	0,0	1,0	19
TCM 20%	91,0	8,0	0,0	1,0	22
TCM 50%	95,5	3,5	0,5	0,5	12
<b>Controle positivo</b>					
MMS 160 $\mu\text{M}$ <sup>2</sup>	0,0	0,5	15,0	84,5	568 ***

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

## APÊNDICE H – RESULTADOS DOS ENSAIOS INDIVIDUAIS DE CITOTOXICIDADE E COMETA DO EXTRATO DE *CANNABIS* SEM S9

No ensaio DAF/BrEt 1 sem S9, TCM 1,3 e 4% não induziram morte celular como o correspondente controle celular, diferentemente de TCM 8 e 20% que causaram leve decréscimo de 1,5% de viabilidade celular quando comparado ao valor de 0% do controle celular como mostrado na Tabela H1.

Neste ensaio observou-se que não foram citotóxicas em C57BL/6, as diluições do extrato de *C. sativa* contendo 0,3 mg/mL e 5,0 mg/mL de CBD, quando comparadas aos seus respectivos controles, TCM 1,3% e TCM 4%. As duas diluições de extrato com 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de CBD causaram letalidade celular de 1 % e 2% levemente superiores aos seus respectivos controles, TCM 4% (0%) e TCM 8% (1,5%). Os baixos níveis de citotoxicidade encontrados para TCM e para o extrato estão bem abaixo do limite máximo aceitável de 30% para uso no EC, logo todos os grupos foram empregados no EC1 na ausência de ativação metabólica.

Tabela H1 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica: ensaio DAF/BrEt. 1. Tratamento: 2h a 37°C.

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>4</sup> (%)
Controle Celular	0,0
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>2</sup></b>	
TCM 1,3%	0,0
CBD 0,3 mg/mL <sup>3</sup>	0,0
TCM 4%	0,0
CBD 1,0 mg/mL	1,0
TCM 8%	1,5
CBD 2,0 mg/mL	2,0
TCM 20%	1,5
CBD 5,0 mg/mL	1,5

DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: Brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol no extrato de *C. sativa* em TCM 1,3%. <sup>4</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis

A Tabela H2 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o EC1 realizado em CSTH *in vitro*. O extrato de *C. sativa* e o veículo TCM não apresentaram genotoxicidade, não induzindo em nenhuma das concentrações testadas aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparados, respectivamente, aos controles TCM correspondentes e controle celular. O controle positivo, MMS 160  $\mu\text{M}$ , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

Tabela H2 – Ensaio Cometa 1 do extrato de *Cannabis sativa* e do TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle</b>					
Controle celular	97,0	3,0	0,0	0,0	6
<b>Concentrações de TCM <sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i> <sup>2</sup></b>					
TCM 1,3%	99,0	1,0	0,0	0,0	2
CBD 0,3 mg/mL <sup>3</sup>	98,0	1,5	0,0	0,5	6
TCM 4%	97,5	2,5	0,0	0,0	5
CBD 1,0 mg/mL	96,5	3,5	0,0	0,0	7
TCM 8%	92,5	6,0	1,0	0,5	19
CBD 2,0 mg/mL	94,0	5,0	1,0	0,0	14
TCM 20%	94,0	5,0	0,5	0,5	15
CBD 5,0 mg/mL	93,5	4,5	1,0	1,0	19
<b>Controle positivo</b>					
MMS 160 $\mu\text{M}$ <sup>4</sup>	0,0	0,0	15,0	85,0	570 ***

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol no extrato de *C. sativa*. <sup>4</sup>Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

No segundo ensaio de citotoxicidade, DAF/BrEt 2, na ausência de ativação metabólica, o controle celular e o TCM 1,3% não induziram morte celular, diferentemente, de TCM 4, 8 e 20% que causaram reduzido decréscimo de 0,5% de viabilidade celular quando comparados ao valor de 0% observado para o controle celular (Tabela H3). Não foram citotóxicas em CSTH, as diluições do extrato de *C. sativa* com 0,3 mg/mL de CBD nas duas concentrações finais de TCM (1,3 e 4%), os extratos com 2,0 mg/mL e com 5,0 mg/mL de CBD, quando comparados aos respectivos controles, TCM 1,3; 4; 8 e 20%. A diluição do extrato com 1,0 mg/mL de



CBD causou letalidade celular de 1 % levemente superior, praticamente igual, ao controle TCM 4% (0,5%) como mostrado na Tabela H3. No DAF/BrEt 2, o maior nível de citotoxicidade de 1% detectado está bem abaixo do limite máximo aceitável de citotoxicidade de 30% para uso no EC2.

Tabela H3 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica: ensaio DAF/BrEt. 2. Tratamento: 2h a 37°C

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>5</sup> (%)
Controle Celular	0,0
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>2</sup></b>	
TCM 1,3%	0,0
CBD 0,3 mg/mL <sup>3</sup>	0,0
TCM 4%	0,5
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	0,0
CBD 1,0 mg/mL	1,0
TCM 8%	0,5
CBD 2,0 mg/mL	0,0
TCM 20%	0,5
CBD 5,0 mg/mL	0,5

DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 1,3%. <sup>4</sup>Concentração final de CBD de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 4%. <sup>5</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

A Tabela H4 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o EC2 realizado em CSHT *in vitro*. O extrato de *C. sativa* e o veículo TCM não apresentaram genotoxicidade, não induzindo em nenhuma das concentrações testadas aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparados respectivamente, aos controles TCM correspondentes e controle celular. O controle positivo, MMS, nas concentrações de 80 e 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

Tabela H4 – Ensaio Cometa 2 do extrato de *Cannabis sativa* e do TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle</b>					
Controle celular	93,0	2,5	0,0	0,0	5
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>2</sup></b>					
TCM 1,3%	92,5	7,5	0,0	0,0	15
CBD 0,3 mg/mL <sup>3</sup>	95,0	3,5	1,0	0,5	14
TCM 4%	98,0	2,0	0,0	0,0	4
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	97,0	3,0	0,0	0,0	6
CBD 1,0 mg/mL	95,0	5,0	0,0	0,0	10
TCM 8%	96,5	3,5	0,0	0,0	7
CBD 2,0 mg/mL	92,5	7,0	0,0	0,5	17
TCM 20%	97,0	3,0	0,0	0,0	6
CBD 5,0 mg/mL	97,0	3,0	0,0	0,0	6
<b>Controle positivo</b>					
MMS 80 µM <sup>5</sup>	1,0	34,5	13,0	51,5	430 ***
MMS 160 µM	0,0	1,0	17,5	81,5	561 ***

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 1,3%. <sup>4</sup>Concentração final de CBD de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 4%. <sup>5</sup>Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos \*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

No terceiro ensaio de citotoxicidade, DAF/BrEt 3, o controle celular, o TCM (4, 8 e 20%) e o extrato nas concentrações de CBD 0,3 mg/mL (4%), CBD 1,0 mg/mL e CBD 2,0 mg/mL não induziram decréscimo de viabilidade celular. Somente o extrato na concentração de CBD 5,0 mg/mL causou letalidade celular muito reduzida de 0,5%, bem abaixo do limite máximo aceitável de citotoxicidade de 30% para uso no EC (Tabela H5). Logo todos os grupos foram empregados no EC3 na ausência de ativação metabólica.

Tabela H5 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica: ensaio DAF/BrEt. 3. Tratamento: 2h a 37°C.

GRUPOS	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>4</sup> (%)
Controle Celular	0,0
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>2</sup></b>	
TCM 4%	0,0
CBD 0,3 mg/mL <sup>3</sup>	0,0

CBD 1,0 mg/mL	0,0
TCM 8%	0,0
CBD 2,0 mg/mL	0,0
TCM 20%	0,0
CBD 5,0 mg/mL	0,5

DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 4%. <sup>4</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

A Tabela H6 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o EC3 realizado em CSTH *in vitro*. O extrato de *C. sativa* e o veículo TCM não apresentaram genotoxicidade, não induzindo em nenhuma das concentrações testadas aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparados aos controles solvente (TCM) e celular, respectivamente. O controle positivo, MMS 80 e 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

Tabela H6 – Ensaio Cometa 3 do extrato de *Cannabis sativa* e do TCM em células sanguíneas humanas *in vitro* na ausência de ativação metabólica. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle</b>					
Controle celular	96,5	3,0	0,5	0,0	8
<b>Concentrações de TCM <sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i> <sup>2</sup></b>					
TCM 4%	94,5	5,5	0,0	0,0	11
CBD 0,3 mg/mL <sup>3</sup>	94,0	4,5	1,0	0,5	16
CBD 1,0 mg/mL	94,5	5,5	0,0	0,0	11
TCM 8%	91,0	9,0	0,0	0,0	18
CBD 2,0 mg/mL	98,5	1,0	0,0	0,5	5
TCM 20%	97,0	2,5	0,5	0,0	7
CBD 5,0 mg/mL	96,5	3,5	0,0	0,0	7
<b>Controle positivo</b>					
MMS 80 µM <sup>4</sup>	2,0	41,5	16,0	40,5	390 ***
MMS 160 µM	0,0	7,5	29,5	63,0	511 ***

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>3</sup>Concentração final de canabidiol de 0,3 mg/mL no extrato de *C. sativa* em TCM 4%. <sup>4</sup>Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de Student, os asteriscos \*\*\* indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle celular.

## APÊNDICE I – RESULTADOS DO ENSAIO PRELIMINAR PARA DEFINIÇÃO DO CONTROLE POSITIVO NOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E COMETA COM S9

Os resultados do ensaio DAF/BrEt para avaliação de citotoxicidade do BrEt, BaP e CP são mostrados na Tabela I1 abaixo.

Tabela I1 – Citotoxicidade do BrEt, BaP e da CP na ausência e presença de mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*: ensaio DAF/BrEt<sup>1</sup>.

GRUPO	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>6</sup> (%)
<b>Controle sem S9<sup>2</sup></b>	
Controle celular	1,0
Controle solvente PBS	0,0
Controle solvente DMSO 1% em PBS	1,0
<b>BrEt<sup>3</sup>, BaP<sup>4</sup>, CP<sup>5</sup> sem S9</b>	
BrEt 50 µg/mL	97,5
BaP 50 µg/mL	1,5
CP 2,0 mM	0,5
<b>Controle com S9</b>	
Controle celular	8,0
Controle solvente PBS	12,0
Controle solvente DMSO 1% em PBS	5,5
<b>BrEt, BaP, CP com S9</b>	
BrEt 10 µg/mL	6,5
BrEt 20 µg/mL	99,0
BrEt 50 µg/mL	95,5
BaP 10 µg/mL	10,5
BaP 20 µg/mL	3,0
BaP 50 µg/mL	7,0
CP 0,5 mM	1,5
CP 1,0 mM	5,5
CP 2,0 mM	1,0

<sup>1</sup>Ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>2</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzida pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>3</sup>Brometo de etídio. <sup>4</sup>Benzo[a]pireno. <sup>5</sup>Ciclofosfamida. <sup>6</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

No teste DAF/BrEt, os controles solventes, PBS e DMSO 1% em PBS sem S9, não induziram decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao controle celular. Ao se adicionar a mistura S9 aos controles, celular, PBS e DMSO 1% em PBS, houve um aumento de citotoxicidade nas CSHT para 8%, 12% e 5,5%, respectivamente, quando comparados aos mesmos grupos sem S9 com valores respectivos de 1,0; 0,0 e 1,0% de citotoxicidade (Tabela I1).

O BrEt apresentou elevada citotoxicidade nas concentrações de 50 µg/mL sem S9 e com S9 (97,5% e 95,5%) quando comparados aos valores dos respectivos controle solvente PBS (0% e 12,0%), bem como na concentração de BrEt 20 µg/mL com S9 (99%) com citotoxicidade superior ao PBS (12,0%). Já a concentração de BrEt 10 µg/mL com S9, não foi citotóxica em CSTH quando comparada ao PBS podendo ser utilizada no EC, diferentemente, das duas maiores concentrações de BrEt por apresentarem níveis de toxicidade elevados, bem superiores ao valor limite de 30% em relação ao controle.

O BaP apresentou baixa citotoxicidade em CSHT na concentração de 50 µg/mL sem S9 (1,5%) levemente superior ao controle DMSO 1% em PBS (1,0 %). Com a adição de S9, a citotoxicidade do BaP mostrou valores de 10,5%, 3,0% e 7,0% nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL, respectivamente superiores ao valor de 5,5% observado para o respectivo controle solvente. Todas as três concentrações de BaP foram testadas no EC.

A CP foi a substância que apresentou menor citotoxicidade, 0,5% na concentração de 2,0 mM sem S9. As concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de CP com mistura S9 não foram citotóxicas quando comparadas ao controle solvente DMSO 1% em PBS com S9, logo foram testadas no EC.

A Tabela I2 abaixo mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas diferentes classes e em números de UAT para o EC realizado.

Tabela I2 – Ensaio Cometa do BrEt, BaP e da CP na ausência e presença de mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA				U.A.T. <sup>5</sup>
	0	1	2	3	
<b>Controle sem S9<sup>1</sup></b>					
Controle celular	94,5	5,5	0	0	11
Controle solvente PBS	96,5	3,5	0,0	0,0	7
Controle solvente DMSO 1% em PBS	94,5	4,5	0,0	1,0	15
<b>BrEt<sup>2</sup>, BaP<sup>3</sup>, CP<sup>4</sup> sem S9</b>					
BaP 50 µg/mL	82,5	16,5	0,5	0,5	38*
CP 2,0 mM	87,0	11,0	1,0	1,0	32
<b>Controle com S9</b>					
Controle celular	90,5	7,5	2,0	0,0	23**
Controle solvente PBS	90,5	8,5	1,0	0,0	21*
Controle solvente DMSO 1% em PBS	93,5	6,0	0,0	0,5	15
<b>BrEt, BaP, CP com S9</b>					
BrEt 10 µg/mL	92,0	7,5	0,0	0,5	18
BaP 10 µg/mL	92,5	7,0	0,0	0,5	17
BaP 20 µg/mL	92,0	8,0	0,0	0,0	16
BaP 50µg/mL	88,0	12,0	0,0	0,0	24
CP 0,5 mM	91,0	9,0	0,0	0,0	18
CP 1,0 mM	63,0	36,5	0,0	0,5	76
CP 2,0 mM	8,5	64,0	26,0	1,5	241**

<sup>1</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzida pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>2</sup>Brometo de etídio. <sup>3</sup>Benzo[a]pireno. <sup>4</sup>Ciclofosfamida. <sup>5</sup>Unidades arbitrárias totais determinadas a partir da análise de 200 células por tratamento. Pelo teste t de *Student* os asteriscos \* indicam diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle DMSO 1% em PBS sem S9 para BaP e em relação ao PBS sem S9 para PBS com S9 e \*\* indicam diferenças altamente significativas (p<0,01) em relação ao controle celular sem S9 e em relação ao controle PBS com S9 para CP.

O controle celular com S9 apresentou um aumento na migração de DNA altamente significativo (p < 0,01) comparado ao controle celular sem S9. O controle solvente PBS com S9 apresentou aumento estatisticamente significativo (p < 0,05) comparado ao controle solvente PBS sem S9 (Tabela I2). O controle solvente DMSO 1% em PBS com S9 não apresentou aumento estatisticamente significativo comparado ao controle solvente DMSO 1% em PBS sem S9.

Na presença da mistura S9, o BrEt na concentração de 10 µg/mL com S9 não causou aumento significativo de UAT quando comparado ao controle solvente PBS com S9.

O BaP 50 µg/mL sem S9 apresentou aumento na migração de DNA estatisticamente significativo (p < 0,05) quando comparado ao controle solvente (DMSO 1% em PBS) na ausência da mistura S9. Este resultado não é esperado na

ausência de mistura S9, pois o BaP é uma substância genotóxica indireta necessitando pois, de ativação metabólica para se tornar uma genotoxina. As três concentrações de BaP (10, 20 e 50 µg/mL) com S9 não induziram genotoxicidade ( $p > 0,05$ ) quando comparadas ao controle solvente (DMSO 1% em PBS) com mistura S9. Logo, na faixa de concentrações de BaP empregada com S9 não se detectou genotoxicidade.

A mais alta concentração de CP 2,0 mM sem S9 não apresentou efeito genotóxico significativo em relação ao controle solvente PBS sem S9 ( $p > 0,05$ ), diferentemente da mesma concentração de CP na presença da mistura S9, com efeito, genotóxico extremamente significativo ( $p < 0,001$ ), comprovando-se desta forma, a eficácia da mistura S9 nos experimentos de ativação metabólica. Ao contrário, as duas menores concentrações de CP (0,5 e 1,0 mM) com S9 não foram genotóxicas ( $p > 0,05$ ).

## APÊNDICE J – RESULTADOS DOS ENSAIOS INDIVIDUAIS DE CITOTOXICIDADE E COMETA DO EXTRATO DE *CANNABIS* COM S9

No ensaio para avaliação de citotoxicidade DAF/BrEt 1, os controles celular e solvente (PBS) sem S9 não induziram decréscimo de viabilidade celular. Ao adicionar a mistura S9 aos controles, a citotoxicidade foi de 1,5% e 2,5% para os controles celular e PBS, respectivamente (Tabela J1),

O controle solvente dos extratos, TCM nas concentrações de 4%, 8% e 20% sem S9, apresentaram citotoxicidade de 2,0%; 2,5% e 4,0%, respectivamente. Na presença da mistura S9, os valores de citotoxicidade (1,5%; 3,0% e 4,5%) foram bem próximos aos obtidos sem S9. Na presença da mistura S9, TCM 4% não foi citotóxico, TCM 8% e 20% apresentaram baixa citotoxicidade em C57BL/6 quando comparadas ao controle celular com S9 (1,5%).

O extrato de *C. sativa*, em todas as 4 concentrações finais de CBD de 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL com S9 não foram citotóxicas em C57BL/6 quando comparadas aos respectivos controles TCM, como mostrado na Tabela J1.

A CP nas concentrações de 1,0 mM e 2,0 mM sem a S9 apresentou citotoxicidade de 1,0%. Ao adicionar a fração S9, ambas as concentrações de CP não foram citotóxicas em relação ao controle PBS com S9.

Tabela J1 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*: ensaio DAF/BrEt 1. Tratamento: 2h a 37°C

GRUPO	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>6</sup> (%)
<b>Controle sem S9</b>	
Controle celular	0,0
PBS	0,0
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> sem S9</b>	
TCM 4%	2,0
TCM 8%	2,5
TCM 20%	4,0
<b>Controle positivo sem S9</b>	
CP <sup>2</sup> 1,0 mM	1,0
CP 2,0 mM	1,0
<b>Controle com S9<sup>3</sup></b>	
Controle celular	1,5
PBS	2,5



<b>Concentrações de TCM e extrato de <i>C. sativa</i><sup>4</sup> com S9</b>	
TCM 4%	1,5
CBD 0,3 mg/mL <sup>5</sup>	0,5
CBD 1,0 mg/mL	0,5
TCM 8%	3,0
CBD 2,0 mg/mL	2,0
TCM 20%	4,5
CBD 5,0 mg/mL	3,0
<b>Controle positivo com S9</b>	
CP 1,0 mM	1,5
CP 2,0 mM	1,5

DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Ciclofosfamida. <sup>3</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>4</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>5</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>6</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

A Tabela J2 abaixo mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas diferentes classes e em números de UAT para o EC1 realizado com TCM e o extrato de *C. sativa* com mistura S9.

Os controles solventes, PBS, TCM 4%, 8% e 20%, e o controle positivo (CP 1,0 mM e CP 2,0 mM) sem S9 não apresentaram aumento significativo na migração de DNA quando comparados, respectivamente ao controle celular e controle solvente de CP (PBS) sem S9. O controle celular com S9 não apresentou um aumento estatisticamente significativo comparado ao mesmo controle sem S9. O controle solvente PBS+S9 não apresentou aumento estatisticamente significativo comparado ao PBS sem S9 e ao controle celular com S9.

Os controles solvente do extrato, TCM 4, 8 e 20% sem e com S9, não apresentaram aumento de migração de DNA significativo em relação aos controles celulares sem S9 e com S9, respectivamente. Também não houve diferença significativa entre os controles TCM 4, 8 e 20% com S9 quando comparados aos controles TCM 4, 8 e 20% sem S9, respectivamente.

As diluições de extrato de *C. sativa* com S9, equivalentes às concentrações finais de CBD 0,3 e 1,0 mg/mL, apresentaram aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle solvente TCM 4% com S9. Diferentemente, nos extratos com 2,0 e 5,0 mg/mL de CBD com S9 não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao TCM 8 e 20% com S9, respectivamente.

O controle positivo (CP), na presença da mistura S9, apresentou aumento na migração de DNA altamente significativo ( $p < 0,01$ ) para CP 1,0 mM e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) para CP 2,0 mM em relação ao controle solvente PBS com S9. Aumentos altamente significativos ( $p < 0,01$ ) em valores médios de UAT também foram detectados ao se comparar as culturas tratadas com CP 1,0 e 2,0 mM com S9 com CP 1,0 e 2,0 mM sem S9, respectivamente.

Tabela J2 – Ensaio Cometa 1 do extrato de *Cannabis sativa* e do TCM com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle sem S9</b>					
Controle celular	94,5	5,5	0	0	11
PBS	96,0	4,0	0,0	0,0	8
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> sem S9</b>					
TCM 4%	95,0	5,0	0,0	0,0	10
TCM 8%	89,0	10,5	0,5	0,0	23
TCM 20%	95,0	5,0	0,0	0,0	10
<b>Controle positivo sem S9</b>					
CP 1,0 mM	95,5	4,5	0,0	0,0	9
CP 2,0 mM	96,5	3,5	0,0	0,0	7
<b>Controle com S9<sup>2</sup></b>					
Controle celular	97,0	3,0	0,0	0,0	6
PBS	94,0	6,0	0,0	0,0	12
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>3</sup> com S9</b>					
TCM 4%	97,0	2,5	0,0	0,5	8
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	92,5	3,0	2,5	2,0	28*
CBD 1,0 mg/mL	89,0	9,0	1,0	1,0	28*
TCM 8%	95,5	2,5	0,5	1,5	16
CBD 2,0 mg/mL	89,0	6,5	2,5	2,0	35
TCM 20%	91,0	3,0	3,0	3,0	36
CBD 5,0 mg/mL	83,5	12,5	2,0	2,0	45
<b>Controle positivo com S9</b>					
CP <sup>5</sup> 1,0 mM	69,0	30,5	0,0	0,5	64**
CP 2,0 mM	50,0	48,0	1,0	1,0	106***

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Molttox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>3</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>4</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>5</sup>Ciclofosfamida. Pelo teste t de Student, os asteriscos \*, \*\*, \*\*\* indicam aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao TCM 4% com S9, altamente significativo ( $p < 0,01$ ) e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao PBS com S9, respectivamente.

Neste ensaio, todos os grupos apresentaram baixa citotoxicidade, sendo as mais elevadas para os tratamentos com TCM 20% sem S9 (4,0%) e com S9 (4,5%) comparado à letalidade do controle celular com S9 de 1,5% (Tabela J1).

No EC1, os controles celular e solvente na presença da S9, não tiveram aumento significativo de valores de UAT em relação às culturas sem S9. O TCM não apresentou genotoxicidade na ausência e na presença de S9 em nenhuma das concentrações testadas (Tabela J2).

A CP 1,0 mM e 2,0 mM apresentou genotoxicidade somente na presença da mistura S9. O mesmo não ocorreu na ausência da mistura S9, demonstrando seu efeito dependente da ativação metabólica e comprovando a eficácia da mistura S9 utilizada no experimento.

No segundo ensaio com o extrato de *C. sativa* com S9, no teste de DAF/BrEt 2, o controle celular sem S9 não induziu decréscimo de viabilidade celular e para o solvente PBS, a citotoxicidade foi de apenas 0,5%. Ao adicionar a mistura S9, a citotoxicidade foi de 2,5% para ambos os controles (Tabela J3).

O controle solvente dos extratos, TCM nas concentrações de 4, 8 e 20% sem S9, apresentaram citotoxicidade de 1,0%; 1,5% e 2,5%, respectivamente. Na presença da mistura S9, as referidas concentrações de TCM não foram citotóxicas em relação ao controle celular com S9 (Tabela J3).

O extrato de *C. sativa* com S9, com concentrações finais de CBD de 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL não foi citotóxico em C57BL/6 na menor concentração de CBD (0,3 mg/mL). Para as demais concentrações de CBD, o extrato foi levemente citotóxico causando 1,5%; 2,5% e 6,5% de citotoxicidade comparados aos valores de 0,5%; 1,5% e 2,0%, para os respectivos controles TCM (Tabela J3).

A CP na concentração de 1,0 mM e 2,0 mM sem a S9 apresentou citotoxicidade de 1,0% e ausência de citotoxicidade, respectivamente, quando comparado ao controle PBS sem S9 com 0,5% de letalidade celular. Ao adicionar a mistura S9, não houve decréscimo de viabilidade celular, apresentando 0,0% de citotoxicidade em ambas as concentrações de CP (Tabela J3).

Tabela J3 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*: ensaio DAF/BrEt. 2. Tratamento: 2h a 37°C

GRUPO	PERCENTUAL DE LETALIDADE CELULAR <sup>6</sup> (%)
<b>Controle sem S9</b>	
Controle celular	0,0
PBS	0,5
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> sem S9</b>	
TCM 4%	1,0
TCM 8%	1,5
TCM 20%	2,5
<b>Controle positivo sem S9</b>	
CP <sup>2</sup> 1,0 mM	1,0
CP 2,0 mM	0,5
<b>Controle com S9<sup>3</sup></b>	
Controle celular	2,5
PBS	2,5
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> e extrato de <i>C. sativa</i><sup>4</sup> com S9</b>	
TCM 4%	0,5
CBD 0,3 mg/mL <sup>5</sup>	0,5
CBD 1,0 mg/mL	1,5
TCM 8%	1,5
CBD 2,0 mg/mL	2,5
TCM 20%	2,0
CBD 5,0 mg/mL	6,5
<b>Controle positivo com S9</b>	
CP 1,0 mM	0,0
CP 2,0 mM	0,0

DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Ciclofosfamida. <sup>3</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>4</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>5</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>6</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis.

A Tabela J4 abaixo mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas diferentes classes e em números de UAT para o EC2 realizado com diferentes concentrações de TCM e extrato de *C. sativa* na presença da mistura S9.

Os controles solventes PBS, TCM 4, 8 e 20%, e a CP 1,0 e 2,0mM sem S9 não apresentaram aumento significativo na migração de DNA quando comparados ao controle celular sem S9. Para a CP 1,0 e 2,0 mM sem S9 também não houve diferenças significativas em relação ao controle solvente PBS sem S9.

O controle celular com S9 não apresentou um aumento estatisticamente significativo em UAT comparado ao controle celular sem S9. O controle solvente PBS+S9 não apresentou aumento significativo de UAT comparado ao controle celular com S9 e ao controle solvente PBS sem S9.

Os controles solvente do extrato TCM 4 e 20% com S9 não apresentaram aumento de UAT significativo em relação ao controle celular com S9, bem como em relação aos respectivos controles solvente TCM 4 e 20% sem S9. Já o controle solvente do extrato, TCM 8% com S9 apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de UAT em relação ao controle celular com S9, mas não foi significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao controle TCM 8% sem S9.

Três diluições do extrato de *C. sativa* com S9, referentes às concentrações de CBD de 0,3; 2,0 e 5,0 mg/mL não causaram aumento significativo de migração de DNA ( $p > 0,05$ ) em relação aos respectivos controles solvente TCM 4, 8 e 20% com S9. Somente o extrato com CBD 1,0 mg/mL com S9 causou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao TCM 4% com S9 (Tabela J4).

O controle positivo, CP 1,0 e 2,0 mM, na presença da mistura S9 apresentou aumento na migração de DNA altamente significativo ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle solvente PBS com S9, bem como em relação às culturas tratadas com CP 1,0 e 2,0 mM sem S9.

Tabela J4 – Ensaio Cometa 2 do extrato de *Cannabis sativa* e do TCM com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle sem S9</b>					
Controle celular	95,5	4,5	0	0	9
PBS	96,5	3,5	0,0	0,0	7
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> sem S9</b>					
TCM 4%	96,0	4,0	0,0	0,0	8
TCM 8%	92,5	7,5	0,0	0,0	15
TCM 20%	93,0	4,5	2,0	0,5	20

<b>Controle positivo</b>					
CP 1,0 mM	94,5	5,5	0,0	0,0	11
CP 2,0 mM	95,5	4,5	0,0	0,0	9
<b>Controle com S9<sup>2</sup></b>					
Controle celular	95,5	4,5	0,0	0,0	9
PBS	98,0	1,5	0,5	0,0	5
<b>Concentrações de TCM e extrato de <i>C. sativa</i><sup>3</sup> com S9</b>					
TCM 4%	93,0	6,5	0,0	0,5	16
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	91,5	8,0	0,5	0,0	18
CBD 1,0 mg/mL	85,5	10,5	2,5	1,5	40*
TCM 8%	93,5	4,0	0,0	2,5	23*
CBD 2,0 mg/mL	89,5	9,0	1,0	0,5	25
TCM 20%	93,0	6,0	0,0	1,0	18
CBD 5,0 mg/mL	86,0	11,0	1,5	1,5	37
<b>Controle positivo com S9</b>					
CP <sup>5</sup> 1,0 mM	42,0	58,0	0,0	0,0	116**
CP 2,0 mM	38,0	61,0	1,0	0,0	126**

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>3</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>4</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>5</sup>Ciclofosfamida. Pelo teste t de Student, o asterisco \* indica aumento de migração de DNA significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao TCM 4% para CBD 1,0 mg/mL e em relação ao controle celular com S9 para TCM 8%; \*\* indica aumento altamente significativo ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle solvente PBS com S9.

Neste segundo ensaio, todos os grupos apresentaram baixa citotoxicidade em C57BL/6, sendo a mais elevada (6,5%) verificada no tratamento do extrato de *C. sativa* com CBD 5,0 mg/mL com S9 comparado ao valor de 2,0% para o controle TCM 20% com S9 (Tabela J3).

No EC2, os controles celular e solvente PBS na presença da S9, não tiveram aumento significativo de UAT em relação às mesmas culturas sem S9 (Tabela J4).

O TCM não apresentou genotoxicidade na ausência da mistura S9 em nenhuma das concentrações testadas em relação ao controle celular sem S9. Na presença de S9, TCM foi genotóxico somente na concentração de 8% quando comparado ao controle celular com S9 (Tabela J4).

O controle positivo, CP 1,0 mM e 2,0 mM, apresentou genotoxicidade apenas na presença da mistura S9, como no EC1. O mesmo não ocorreu na ausência da fração S9, demonstrando que a genotoxicidade da CP é dependente da ativação metabólica pela mistura S9 (Tabela J4).

No terceiro ensaio com o extrato de *C. sativa* +S9, no teste DAF/BrEt 3, os controles celular e solvente PBS sem e com S9 não induziram decréscimo de viabilidade celular (Tabela J5).

O controle solvente dos extratos, TCM nas concentrações de 4, 8 e 20%, sem S9, apresentaram citotoxicidade de 0,5%; 0,0% e 0,5%, respectivamente próximo e igual ao valor de 0% observado para o controle celular sem S9. Na presença da mistura S9, a citotoxicidade foi de 1,0%; 2,0% e 3,5% (Tabela J5).

O extrato de *C. sativa*, com concentrações finais de CBD de 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL com mistura S9 apresentou citotoxicidade de 2,5%; 1,0%; 1,5% e 3,0%, respectivamente. Os valores de citotoxicidade dos correspondentes controles TCM para CBD 0,3 e 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL, 5,0 mg/mL foram 1,0%, 2,0%, 3,5%, respectivamente (Tabela J5). Logo, somente o extrato com 0,3 mg/mL de CBD foi pouco citotóxico, enquanto as demais concentrações de CBD não foram citotóxicas quando comparados aos respectivos controle TCM (Tabela J5).

A CP, nas concentrações de 1,0 mM e 2,0 mM sem S9, apresentou citotoxicidade de 0,5%. Ao adicionar a mistura S9, não houve decréscimo de viabilidade celular na concentração de 2,0 mM e na concentração de 1,0 mM a baixa citotoxicidade de 1,0% em Csth (Tabela J5)

Tabela J5 – Citotoxicidade do veículo TCM e do extrato de *Cannabis sativa* com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*: ensaio DAF/BrEt 3. Tratamento: 2h a 37°C

GRUPO	PERCENTUAL DE CITOTOXICIDADE <sup>6</sup> (%)
<b>Controle sem S9</b>	
Controle celular	0,0
PBS	0,0
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> sem S9</b>	
TCM 4%	0,5
TCM 8%	0,0
TCM 20%	0,5
<b>Controle positivo sem S9</b>	
CP <sup>2</sup> 1,0 mM	0,5
CP 2,0 mM	0,5
<b>Controle com S9<sup>3</sup></b>	
Controle celular	0,0
PBS	0,0

<b>Concentrações de TCM e extrato de <i>C. sativa</i><sup>4</sup> com S9</b>	
TCM 4%	1,0
CBD 0,3 mg/mL <sup>5</sup>	2,5
CBD 1,0 mg/mL	1,0
TCM 8%	2,0
CBD 2,0 mg/mL	1,5
TCM 20%	3,5
CBD 5,0 mg/mL	3,0
<b>Controle positivo com S9</b>	
CP 1,0 mM	1,0
CP 2,0 mM	0,0

DAF: diacetato de fluoresceína (30 µg/mL). BrEt: brometo de etídio (8 µg/mL). <sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Ciclofosfamida. <sup>3</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>4</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>5</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>6</sup>Duzentas células foram analisadas microscopicamente por tratamento para a determinação do percentual de células não viáveis

A Tabela J6 abaixo mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas diferentes classes e em números de UAT para o EC3 realizado com diferentes concentrações de TCM e extrato de *C. sativa* na presença da mistura S9.

Os controles solventes PBS, TCM 4, 8 e 20% sem S9 não apresentaram aumento significativo na migração de DNA quando comparados ao controle celular sem S9. O controle positivo (CP 1,0 e 2,0 mM) sem S9, também não mostrou aumento significativo de UAT em relação ao controle solvente PBS sem S9.

O controle celular com S9 não apresentou aumento de UAT significativo comparado ao controle celular sem S9. O controle solvente PBS+S9 não apresentou aumento estatisticamente significativo comparado ao controle celular com S9, bem como ao controle solvente PBS sem S9.

Os controles solvente do extrato TCM 4, 8 e 20% com S9 não apresentaram aumentos significativos de dano ao DNA em relação aos controles celulares com S9 e também quando comparados aos controles solvente TCM 4, 8 e 20% sem S9.

As diluições dos extratos de *C. sativa* com as concentrações finais de 0,3; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL de CBD com S9 não causaram aumentos significativos na migração de DNA em C57BL/6 quando comparados aos respectivos controles solvente TCM 4, 8 e 20% com S9 (Tabela J6).

O controle positivo CP 1,0 mM e CP 2,0 mM na presença da mistura S9 apresentou aumento na migração de DNA significativo ( $p < 0,05$ ) e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ), respectivamente em relação ao controle solvente PBS com



S9 e quando comparados às respectivas culturas CP 1,0 mM ( $p < 0,05$ ) e 2,0 mM ( $p < 0,001$ ) sem S9 (Tabela J6).

Tabela J6 – Ensaio Cometa 3 do extrato de *Cannabis sativa* e do TCM com mistura S9 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Percentagem de células nas diferentes classes de dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
<b>Controle sem S9</b>					
Controle celular	93,5	6,5	0	0	13
PBS	94,5	5,0	0,0	0,5	13
<b>Concentrações de TCM<sup>1</sup> sem S9</b>					
TCM 4%	95,5	4,5	0,0	0,0	9
TCM 8%	90,5	9,0	0,0	0,5	21
TCM 20%	93,0	7,0	0,0	0,0	14
<b>Controle positivo sem S9</b>					
CP 1,0 mM	95,0	4,5	0,0	0,5	12
CP 2,0 mM	93,5	6,5	0,0	0,0	13
<b>Controle com S9<sup>2</sup></b>					
Controle celular	94,0	6,0	0,0	0,0	12
PBS	95,5	4,5	0,0	0,0	9
<b>Concentrações de TCM e extrato de <i>C. sativa</i><sup>3</sup> com S9</b>					
TCM 4%	94,0	4,5	0,5	1,0	17
CBD 0,3 mg/mL <sup>4</sup>	93,5	6,0	0,5	0,0	14
CBD 1,0 mg/mL	90,5	8,5	1,0	0,0	21
TCM 8%	93,0	6,0	0,5	0,5	17
CBD 2,0 mg/mL	87,0	10,5	1,0	1,5	34
TCM 20%	93,5	6,5	0,0	0,0	13
CBD 5,0 mg/mL	91,5	7,5	0,0	1,0	21
<b>Controle positivo com S9</b>					
CP <sup>5</sup> 1,0 mM	59,5	40,0	0,0	0,5	83*
CP 2,0 mM	47,5	51,5	0,0	1,0	109***

<sup>1</sup>Triglicerídeos de cadeia média. <sup>2</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 1,16 mg/mL). <sup>3</sup>Extrato de *C. sativa* em TCM. <sup>4</sup>Concentração final de CBD (canabidiol) no extrato de *C. sativa*. <sup>5</sup>Ciclofosfamida. Pelo teste t de Student, os asteriscos \* e \*\*\* indicam aumento de migração de DNA significativo ( $p < 0,05$ ) e extremamente significativo ( $p < 0,001$ ), respectivamente, em relação ao controle solvente PBS com S9.

No ensaio DAF/BrEt 3, todos os grupos apresentaram baixa citotoxicidade, sendo a mais elevada (3,5%) para o tratamento com TCM 20% com S9 (Tabela J5).

No EC3, os controles celular e solvente PBS na presença da S9, não tiveram aumento significativo em relação às culturas sem S9 (Tabela J6).

O TCM não apresentou genotoxicidade na ausência ou na presença da mistura S9 em nenhuma das concentrações testadas (Tabela J6).

Neste ensaio, nenhuma das concentrações de extrato com S9 apresentou genotoxicidade em relação ao respectivo controle solvente TCM com S9 (Tabela J6).

O controle positivo, CP 1,0 mM e 2,0 mM, apresentou genotoxicidade apenas na presença da S9. O mesmo não ocorreu com a CP na ausência da mistura S9, confirmando ser a genotoxicidade de CP dependente da ativação metabólica, como mostrado também nos ensaios anteriores.

## APÊNDICE K – RESULTADOS DO EMnBC-01 PRELIMINAR PARA DEFINIÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS E CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE TCM NA AUSÊNCIA DE ATIVAÇÃO METABÓLICA

Ausência de citotoxicidade foi evidenciada com MMS 80 $\mu$ M em relação ao CC2, apresentando valores de IPBC e de %IR superiores aos do referido controle. Valores de citotoxicidade inferiores a 50%, medidos pelas reduções de IPBC e %IR, em relação às culturas CC foram observados para MMC 1,0  $\mu$ g/mL (17,43% e 15,77% em relação ao CC2) e para COL 0,02  $\mu$ g/mL (2,96% e 6,40% em relação ao CC1). Citotoxicidade foi também observada para TCM 20% (24,07% e 38,59% em relação à CC2) (Tabela K1).

Pelo teste de Qui-Quadrado, não foram detectadas diferenças significativas no número de células micronucleadas em células binucleadas sanguíneas humanas (linfócitos) nas culturas com TCM 20% em relação à CC2 ( $p > 0,05$ ). Os controles positivos, MMC 1,0  $\mu$ g/mL e COL 0,02  $\mu$ g/mL induziram aumentos extremamente significativos ( $p < 0,0001$ ) de células micronucleadas em células binucleadas e para ambas as células binucleadas e mononucleadas para a COL. Enquanto que, para o MMS 80  $\mu$ M uma diminuição, ao invés de um aumento de células micronucleadas binucleadas foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CC2, logo teríamos que aumentar a concentração de MMS para a detecção de um efeito mutagênico.

A partir deste ensaio foram escolhidos como controles positivos nos EMnBC-02 e EMnBC-03 com o extrato de *C. sativa* em C57BL/6, na ausência da mistura S9, a MMC 1,0  $\mu$ g/mL e a COL 0,02  $\mu$ g/mL, devido às suas propriedades clastogênica e aneugênica, respectivamente. A maior concentração final (20%) do veículo do extrato de *C. sativa* (TCM) foi considerada adequada para uso no EMnBC por induzir citotoxicidade inferior a 50 % em C57BL/6.

Tabela K1 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-01) de Mitomicina C, Colcemid<sup>®</sup>, metanosulfonato de metila e TCM em células sanguíneas humanas sem ativação metabólica.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS / 500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC <sup>1</sup>	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR <sup>2</sup> (%)	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)		TESTE QUI-QUADRADO (p) <sup>3</sup>
<b>Controle celular</b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
CC1 <sup>4</sup>	342	113	45	1,406				25	27	-
CC2 <sup>5</sup>	294	171	35	1,482	-	-	-	-	17	0,1295
<b>Controle positivo</b>										
								NCMN / 1000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
MMC <sup>6</sup> 1,0 µg/mL	352	97	51	1,398	17,43	82,57	17,43	39		< 0,0001 ****
MMC 1,0 µg/mL	343	111	46	1,406	15,77	84,23	15,77	42		
								NCMN / 1000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 1000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL <sup>7</sup> 0,02 µg/mL	355	93	52	1,394	2,96	97,04	2,96	26	51	<0,0001 **** (CEL. MONONUCLEADA)
COL 0,02 µg/mL	355	100	45	1,380	6,40	93,60	6,40	39	69	<0,0001 **** (CEL. BINUCLEADA)
								NCMN / 1000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
MMS <sup>8</sup> 80µM	298	155	47	1,498	-3,32	103,32	-3,32	25		0,0120 *
MMS 80µM	271	173	56	1,570	-18,26	118,26	-18,26	10		
<b>Substância teste</b>										
TCM <sup>9</sup> 20%	344	129	27	1,366	24,07	75,93	24,07	17		0,0565
TCM 20%	369	114	17	1,296	38,59	61,41	38,59	13		

<sup>1</sup>Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese: indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. <sup>2</sup>Índice de replicação: indica a proporção de ciclos de divisão celular completos por célula durante o período de exposição à citocalasina B em culturas tratadas quando comparadas às culturas controle. <sup>3</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>4</sup>Controle celular sem tratamento para COL. <sup>5</sup>Controle celular sem tratamento para MMC, MMS e TCM. <sup>6</sup>Mitomicina C. <sup>7</sup>Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). <sup>8</sup>Metanosulfonato de metila. <sup>9</sup>Triglicerídeos de cadeia média. Pelo teste de Qui-Quadrado, \*diminuição significativa de células micronucleadas em células binucleadas (p<0,05) em relação ao CC2, \*\*\*\*aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao CC2 para MMC e em relação à CC1 para COL.

## APÊNDICE L – RESULTADOS DO EMnBC-04 PRELIMINAR PARA DEFINIÇÃO DO CONTROLE POSITIVO EM CSTH NA PRESENÇA DE ATIVAÇÃO METABÓLICA (MISTURA S9)

Os resultados do primeiro EMnBC (EMnBC-04) em culturas de CSTH, na presença da mistura S9, com as 2 concentrações de CP (5 e 10 µg/mL) quanto à sua adequabilidade como controle positivo são mostrados na Tabela L1 abaixo. Além disso, constam os resultados das culturas tratadas com a concentração mais elevada de CP (10 µg/mL) sem S9, com os controles positivos na ausência de S9, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL e das culturas sem tratamento na ausência (CC1) e na presença de S9 (CC2).

Ausência de citotoxicidade foi evidenciada em CC2 e CP 10 µg/mL sem S9 em relação a CC1, apresentando valores de IPBC e de %IR superiores ao respectivo controle. Valores de citotoxicidade inferiores a 50%, medidos pelas reduções de IPBC e %IR em relação às culturas controle, foram observados para MMC 1,0 µg/mL (1,22%) e para COL 0,02 µg/mL (18,78%) em relação a CC1. Citotoxicidade foi também observada para CP na presença da mistura S9 de 8,48% e 15,76% para CP 5 µg/mL e CP 10 µg/mL, respectivamente.

Pelo teste de Qui-Quadrado, não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,1$ ) no número de células micronucleadas em células sanguíneas humanas nas culturas CC2 e CP 10 µg/mL sem S9 em relação à CC1. Os controles positivos sem S9, MMC 1,0 µg/mL e COL 0,02 µg/mL, induziram aumentos extremamente significativos ( $p < 0,0001$ ) de células micronucleadas em células binucleadas e para ambas as células binucleadas e mononucleadas para a COL. A CP (5 µg/mL e 10 µg/mL), na presença da mistura S9, causou aumentos extremamente significativos ( $p < 0,001$ ) na frequência de micronúcleos em células binucleadas em relação ao CC2. Logo, nos EMnBC-05 e EMnBC-06 posteriores com o extrato de *C. sativa* empregou-se CP 10 µg/mL como controle positivo com S9.

Tabela L1 – Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese (EMnBC-04) em células sanguíneas humanas de ciclofosfamida na presença e ausência de mistura S9

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS / 500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC <sup>1</sup>	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR <sup>2</sup> (%)	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)	TESTE QUI-QUADRADO (p) <sup>3</sup>	
<b>Controle celular</b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
CC1 <sup>4</sup>	302	151	47	1,490	-		-	17	12	-
CC2 + S9 <sup>5</sup>	264	142	94	1,660	-34,69	134,69	-34,69	-	21	0,1157
<b>Controle positivo sem e com S9<sup>6</sup></b>										
								NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
CP <sup>7</sup> 10 µg/mL	273	177	50	1,554	-13,06	113,06	-13,06	21		0,1157
CP 5 µg/mL +S9	280	138	82	1,604	8,48	91,52	8,48	53		0,0002***
CP 10 µg/mL +S9	298	126	76	1,556	15,76	84,24	15,76	51		0,0004***
MMC <sup>8</sup> 1,0 µg/mL	319	120	61	1,484	1,22	98,78	1,22	123		< 0,0001****
								NCMN / 2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN / 2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL <sup>9</sup> 0,02 µg/mL	343	115	42	1,398	18,78	81,22	18,78	65	122	< 0,0001**** (MONONUCLEADA) < 0,0001**** (BINUCLEADA)

<sup>1</sup>Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese: indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. <sup>2</sup>Índice de replicação: indica a proporção de ciclos de divisão celular completos por célula durante o período de exposição à citocalasina B em culturas tratadas quando comparadas às culturas controle. <sup>3</sup>Valores de p no teste do Qui-Quadrado. <sup>4</sup>Controle celular sem tratamento. <sup>5</sup>Controle celular sem tratamento com S9. <sup>6</sup>Mistura de fração S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 da Moltox (concentração final de proteína: 0,66 mg/mL). <sup>7</sup>Ciclofosfamida. <sup>8</sup>Mitomomicina C. <sup>9</sup>Colcemid® (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, \*\*\* indica aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,001) em relação ao CC2 para CP e \*\*\*\*aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,0001) em relação ao CC1 para MMC e COL