

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

Juliana dos Santos Carmo

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA E DO PERFIL
DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* E
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE EXTRATOS MEDICINAIS DE *Cannabis*
*sativa***

Rio de Janeiro

2021

Juliana dos Santos Carmo

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA E DO PERFIL
DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus
aureus* ISOLADOS DE EXTRATOS MEDICINAIS DE *Cannabis sativa*

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: Dr^a Maysa Beatriz Mandetta
Clementino

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Carmo, Juliana dos Santos

Avaliação da composição da comunidade microbiana e do perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de extratos medicinais de *Cannabis sativa*. / Juliana dos Santos Carmo. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

75 f. : il. ; 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: Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

1. *Cannabis*. 2. Extratos Vegetais. 3. Contaminação Microbiana. I. Título.

Evaluation of the microbial community composition and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from medicinal extracts of *Cannabis sativa*.

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

Juliana dos Santos Carmo

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA E DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE EXTRATOS MEDICINAIS DE *Cannabis sativa*

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: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr^a Joana Angélica Barbosa Ferreira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr^a Virgínia Martins Carvalho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

ORIENTADORA

Dr^a Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me dando forças para seguir em frente e correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus pais, Neuseli e Julio (*in memoriam*), e meu padrasto Márcio, por serem meus maiores incentivadores, estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e me ensinarem o valor e a importância do estudo nas nossas vidas.

À minha orientadora Dr^a Maysa Beatriz Mandetta Clementino, pelos ensinamentos e por ter acreditado em mim e no meu potencial.

Aos colegas de laboratório que de alguma maneira contribuíram para a elaboração deste estudo. Principalmente ao Kayo, que foi fundamental no auxílio das análises laboratoriais. Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos.

À Dr^a Joana Angélica Barbosa Ferreira, pelo apoio, incentivo e por todo conhecimento passado a mim.

À Dr^a Virgínia Martins Carvalho, que me acolheu desde a graduação e me ajudou muito no meu amadurecimento profissional. Obrigada por todo apoio e carinho.

Ao meu amigo Felipe, que esteve ao meu lado desde o início do mestrado. Obrigada pela companhia em sala de aula, pelos conselhos e pelos momentos de descontração.

À Coordenação de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e à Fiocruz, pela oportunidade de desenvolver este projeto incrível e tão importante para a sociedade.

Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste estudo.

EPÍGRAFE

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.

Guimarães Rosa

RESUMO

Extrato medicinal de *Cannabis sativa* apresenta grande potencial terapêutico e tem sido utilizado mundialmente no auxílio do tratamento de Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia, dor neuropática e epilepsia. No Brasil, esse produto é bastante utilizado, principalmente, para controlar crises convulsivas em portadores de epilepsia refratária. A análise microbiológica de extratos de *C. sativa* é essencial para evitar danos à saúde de usuários, principalmente pacientes imunocomprometidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a identidade, a susceptibilidade aos antimicrobianos e as relações clonais de isolados bacterianos de *Escherichia coli* (n=60) e *Staphylococcus aureus* (n=20) obtidos de extratos artesanais de *C. sativa* (extração oleosa) entre 2017-2018. Para isso, a confirmação da identidade dos isolados foi realizada pela PCR de genes espécie-específicos; a susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco-difusão; as relações clonais pela ERIC-PCR; a determinação da patogenicidade dos isolados de *E. coli* pela atividade hemolítica e pela pesquisa de genes de virulência de EPEC e EHEC. Os isolados de *E. coli* e *S. aureus* foram confirmados pela identificação molecular. Isolados de *E. coli* revelaram resistência a quatro antimicrobianos: cefuroxima (51,7%); ciprofloxacino (10%); tigeciclina (8,3%) e aztreonam (6,7%), já os isolados de *S. aureus* apresentaram resistência à benzilpenicilina (40%). Foi revelado um alto polimorfismo genético entre os isolados de *E. coli* e *S. aureus* pela ERIC-PCR. Esses isolados não apresentaram atividade hemolítica e nem genes marcadores de virulência. Foi realizada também a pesquisa de contaminação microbiológica e da composição da comunidade microbiana pela metagenômica em 30 amostras de extrato medicinal de *C. sativa* obtidos por extração alcoólica, entre 2019-2020. Das 30 amostras, sete apresentaram contaminação microbiana e foram identificados fenotipicamente como: *Enterobacter cloacae* (n=2), *Bacillus circulans* (n=1), *Staphylococcus epidermidis* (n=3) e *Aspergillus flavus* (n=3). A análise metagenômica da comunidade microbiana dos extratos de *C. sativa* apresentou alta diversidade de organismos do domínio Bacteria (79,7 a 99,4%) com predominância dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota e Actinobacteriota; e do domínio Archaea (0,6 a 20,3%). Nossos resultados mostraram uma queda significativa de bactérias recuperadas de extratos obtidos pela extração alcoólica, o que é relevante para diminuição de riscos à saúde de pacientes e garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto.

Palavras-chave: *Cannabis Sativa*. Extrato Medicinal. Contaminação Microbiana.

ABSTRACT

Medicinal extract of *Cannabis sativa* has great therapeutic potential and has been used worldwide to aid in the treatment of Parkinson's, Alzheimer's, schizophrenia, neuropathic pain and epilepsy. In Brazil, this product is widely used, mainly, to control seizures in patients with refractory epilepsy. The microbiological analysis of *C. sativa* extracts is essential to avoid damage to the health of users, especially immunocompromised patients. The aim of the present study was to evaluate the identity, susceptibility to antimicrobials and the clonal relationships of bacterial isolates of *Escherichia coli* (n=60) and *Staphylococcus aureus* (n=20) obtained from artisanal extracts of *C. sativa* (oily extraction) among 2017-2018. For this, the confirmation of the identity of the isolates was carried out by PCR of specie-specific genes; susceptibility to antimicrobials by disk-diffusion technique; clonal relations by ERIC-PCR; determination of the pathogenicity of *E. coli* isolates by hemolytic activity and by search for EPEC and EHEC virulence genes. *Escherichia coli* and *S. aureus* isolates were confirmed by molecular identification. *Escherichia coli* isolates showed resistance to four antimicrobials: cefuroxime (51.7%); ciprofloxacin (10%); tigecycline (8.3%) and aztreonam (6.7%), whereas *S. aureus* isolates showed resistance to benzylpenicillin (40%). A high genetic polymorphism was revealed between the isolates of *E. coli* and *S. aureus* by ERIC-PCR. These isolates showed no hemolytic activity and no virulence marker genes. Research on microbiological contamination and composition of the microbial community by metagenomic was also carried out on 30 samples of medicinal extract of *C. sativa* obtained by alcoholic extraction, between 2019-2020. Of the 30 samples, seven had microbial contamination and were identified phenotypically as: *Enterobacter cloacae* (n=2), *Bacillus circulans* (n=1), *Staphylococcus epidermidis* (n=3) and *Aspergillus flavus* (n=3). The metagenomic analysis of the microbial community of *C. sativa* extracts showed a high diversity of organisms of the Bacteria domain (79.7 to 99.4%) with predominance of Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota and Actinobacteriota phylum; and Archaea domain (0.6 to 20.3%). Our results showed a significant drop in bacteria recovered from extracts obtained by alcoholic extraction, which is relevant for reducing risks to the health of patients and to ensure product quality, safety and efficacy.

Keywords: *Cannabis Sativa*. Medicinal Extract. Microbial Contamination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de produção de extratos artesanais por extração oleosa.....	21
Figura 2 - Esquema de produção de extratos artesanais por extração alcoólica	22
Figura 3 - Extração alcoólica de <i>C. sativa</i> por Soxhlet.....	23
Quadro 1 - Grupos amostrais analisados na metagenômica	43
Gráfico 1 - Micro-organismos isolados nos extratos oleosos de <i>C. sativa</i> analisados em 2017 e 2018	45
Gráfico 2 – Resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	48
Figura 4 - Relação clonal dos isolados de <i>E. coli</i> pela ERIC-PCR.....	50
Figura 5 - Relação clonal dos isolados de <i>S. aureus</i> pela ERIC-PCR	51
Gráfico 3 - Abundância relativa dos filos microbianos identificados nos extratos medicinais de Cannabis.....	52
Gráfico 4 - Abundância relativa das famílias microbianas identificadas nos extratos medicinais de Cannabis	53
Gráfico 5 - Abundância relativa dos gêneros microbianos identificados nos extratos medicinais de Cannabis	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites microbianos para produtos não estéreis	25
Tabela 2 – Limites microbiológicos recomendados para produtos botânicos consumidos por via oral nos EUA (UFC/g).....	26
Tabela 3 - Diretrizes existentes na farmacopeia dos EUA para Cannabis (UFC/g) ..	27
Tabela 4 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias Gram-negativas bile tolerantes.....	37
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na confirmação da identidade de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	40
Tabela 6 - Oligonucleotídeos utilizados na pesquisa de gene de virulência	42
Tabela 7 – Contagem e identificação de micro-organismos em extratos de <i>C. sativa</i> analisados em 2019 e 2020	46

LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CB1	Receptores canabinoides do subtipo 1
CB2	Receptores canabinoides do subtipo 2
CBD	Canabidiol
CFM	Conselho Federal de Medicina
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRM	Certified Reference Material
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DOU	Diário Oficial da União
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido clorídrico
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
ONG	Organização Não Governamental
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
THC	Tetrahydrocannabinol
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
g	Grama
kDa	Kilodalton
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
n	Número amostral
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Cannabis sativa</i> e sistema endocanabinoide	13
1.2	Extrato de <i>Cannabis sativa</i> no tratamento de epilepsia	14
1.3	Regulamentação da <i>Cannabis sativa</i>	16
1.4	Preparo de extrato artesanal de <i>Cannabis sativa</i>	20
1.5	Avaliação da qualidade microbiológica	23
1.6	Resistência bacteriana aos antibióticos	27
1.7	<i>Escherichia coli</i> patogênica	29
1.8	Tipificação molecular	30
1.9	Diversidade metagenômica.....	31
1.10	Justificativa	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Amostragem	35
3.2	Contagem total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras	35
3.3	Contagem de bactérias Gram-negativas bile tolerantes	36
3.4	Pesquisa de patógenos	37
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	37
3.4.2	<i>Salmonella</i>	38
3.4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3.4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.4.5	<i>Candida albicans</i>	38
3.4.6	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	39
3.4.7	Outros micro-organismos.....	39
3.5	Identificação molecular de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	39
3.6	Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	40
3.7	Estabelecimento de relações clonais por meio da técnica ERIC-PCR.....	41
3.8	Patogenicidade e atividade hemolítica dos isolados de <i>E. coli</i>	42
3.9	Comunidade microbiana de extratos de <i>C. sativa</i> pela metagenômica	43
3.9.1	Amostragem	43

3.9.2 Sequenciamento do gene <i>rrs</i> do 16S rRNA.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Contagem e isolamento de micro-organismos	45
4.1.1 Amostragem de 2017/2018.....	45
4.1.2 Amostragem de 2019/2020.....	46
4.2 Identificação molecular de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	47
4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	48
4.4 Tipificação das cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	48
4.5 Patogenicidade	51
4.6 Análise da composição da comunidade microbiana pela metagenômica...52	52
5 DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cannabis sativa* e sistema endocanabinoide

Cannabis sativa, uma plantada família *Cannabaceae*, se desenvolve principalmente nas regiões tropicais e temperadas, e apresenta grande potencial terapêutico, apesar de suas propriedades psicotrópicas. O primeiro relato de uso medicinal de *C. sativa* foi atribuído aos chineses, que descreveram os potenciais terapêuticos dessa planta há 2000 anos (HONÓRIO *et al.*, 2006).

Além do uso terapêutico, essa planta foi utilizada há milhares de anos por apresentar diversas finalidades, como fonte de alimento, combustível, papel e como fibra têxtil. Ela é uma fonte de vários compostos bioativos, como canabinoides (Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabidiol, por exemplo), terpenoides, flavonoides e ácidos graxos poliinsaturados (MARINI *et al.*, 2018).

No início da década de 40 foi isolado o canabidiol (CBD) a partir de *C. sativa* (ADAMS *et al.*, 1940), porém foi a partir da década de 60, após a identificação do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (MECHOULAM *et al.*, 1963), que vários estudos revelaram as propriedades farmacológicas dos componentes dessa planta (MECHOULAM *et al.*, 2007; WHITING *et al.*, 2015). Até o momento, são conhecidos mais de 80 canabinoides presentes nas flores e folhas de *C. sativa* (ZUARDI *et al.*, 2010).

A *C. sativa* e seus princípios ativos são regulamentados para uso terapêutico em vários países da Europa, como Portugal, Holanda, Bélgica e Espanha, em alguns estados americanos, como Califórnia, Minnesota e a capital Washington (ROBSON, 2001; ZUARDI *et al.*, 2006; SZAFIARSKI; BEBIN, 2014). Medicamentos à base de *C. sativa* são produzidos para diferentes indicações terapêuticas como Parkinson (ZUARDI *et al.*, 2009), esquizofrenia (ZUARDI *et al.*, 2006), Alzheimer (IUVONE *et al.*, 2004), dor neuropática causada pela esclerose múltipla (ROG *et al.*, 2005) e pela artrite reumatoide (BLAKE *et al.*, 2006) e epilepsia (HUSSAIN *et al.*, 2015), sendo por muitas vezes a única alternativa terapêutica no controle dessas patologias.

Os princípios ativos mais abundantes na planta, THC e CBD atuam nos receptores canabinoides e apresentam efeitos paradoxais. Enquanto o THC se relaciona aos estados de euforia, ansiedade e psicóticos, o CBD está relacionado aos efeitos depressores no sistema nervoso central (SNC) com ação antipsicótica e ansiolítica (MECHOULAM *et al.*, 2007). Os efeitos farmacológicos são atribuídos à

interação dos canabinoides com os receptores canabinoides do subtipo 1 (CB1), encontrado no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), e receptores canabinoides do subtipo 2 (CB2) que estão mais restritos às células e tecidos do sistema imune (LEWEKE; KOETHE, 2008).

O sistema endocanabinoide consiste em receptores de canabinoides, canabinoides endógenos e enzimas que controlam a ativação e a disponibilidade desses endocanabinoides (SAITO *et al.*, 2010). O THC se liga aos receptores CB1 e CB2 agindo como um agonista parcial, além de exercer uma atividade neural mista, excitatória e inibitória, em diferentes áreas do cérebro, mostrando não atuar somente em receptores canabinoides específicos (PERTWEE, 2008). Já o CBD possui um mecanismo de ação complexo e ainda não está totalmente compreendido, sabe-se que ele apresenta baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2, sua ação resulta de mediação na sinalização dos endocanabinoides através da hidrólise enzimática ou inibição da recaptação da anandamida, o neurotransmissor canabinoide endógeno (MECHOULAM *et al.*, 2002). Além disso, o CBD demonstrou ser capaz de funcionar como um agonista dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} promovendo efeito ansiolítico (FOGAÇA *et al.*, 2014; MARINHO *et al.*, 2015).

1.2 Extrato de *Cannabis sativa* no tratamento de epilepsia

O primeiro medicamento composto por CBD indicado para tratar formas raras e graves de epilepsia, oriundas da síndrome de Lennox-Gastaut e síndrome de Dravet foi aprovado em 2018 pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora dos Estados Unidos da América (EUA). O medicamento denominado Epidiolex (canabidiol 100 mg/mL) é uma solução oral indicada para o tratamento de convulsões em pacientes a partir de 2 anos de idade (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018). Esse mesmo medicamento começou a ser comercializado em todos os países da Europa a partir de setembro de 2019, com a mesma indicação terapêutica, regulada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2019).

Em relação ao extrato de *C. sativa* preparado de maneira artesanal, existem no Chile organizações sociais como a Fundação Daya, uma instituição sem fins lucrativos que tem como objetivo ajudar pacientes oncológicos em tratamento, pessoas com epilepsia refratária e com dor crônica. Esse auxílio ocorre através de atendimento de médicos e terapeutas da fundação, oficinas de auto cultivo e preparações de extratos

medicinais de *C. sativa*, a fim de capacitar e gerar autonomia àqueles que necessitam do tratamento (CHILE; FUNDACIÓN DAYA, 2019).

No Brasil, o uso dos extratos medicinais de *C. sativa* se dá, em maior prevalência, no controle de crises convulsivas em portadores de epilepsia refratária, que são aqueles indivíduos não responsivos ao tratamento convencional da epilepsia e correspondem a 20% dos casos de pacientes epiléticos (ALVARENGA *et al.*, 2007), nesse cenário é crescente o número de indivíduos que buscam o extrato medicinal para o controle de convulsões (CARVALHO, 2017).

A epilepsia é o transtorno neurológico mais frequente, afetando cerca de 50 milhões de pessoas no mundo (MARCHETTI *et al.*, 2005). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, cerca de 157.070 novos casos são diagnosticados a cada ano (100/100.000), com uma prevalência de 11,9/1000 a 16,5/1000 de formas ativas da doença. A epilepsia refratária acomete principalmente crianças portadoras de síndromes genéticas raras (*cdkl5*, Rett e Dravet) que tem como característica mais debilitante as crises convulsivas de alta frequência com alto risco de lesões neurológicas irreversíveis e até mesmo de óbito (ZHI *et al.*, 2016; CAMPOS-CASTELLO *et al.*, 2007; PÉREZ; MORENO, 2015).

O uso do extrato medicinal de *C. sativa* diminui significativamente o número de crises convulsivas diárias em pacientes com epilepsia refratária (PORTER; JACOBSON, 2013; CARVALHO *et al.*, 2017). Um estudo desenvolvido por Porter e Jacobson (2013) avaliou dezenove crianças com diagnóstico de epilepsia refratária que faziam uso de extrato de *C. sativa* rico em CBD. Dezesesseis (84%) dos 19 pais relataram uma redução na frequência de crises convulsivas. Desses, dois (11%) relataram término do quadro convulsivo, oito (42%) relataram uma redução maior que 80% na frequência de convulsões e seis (32%) relataram uma redução de convulsões de 25 a 60%. Outros efeitos benéficos incluíram aumento da atenção, melhora do humor e do sono, já os efeitos colaterais incluíram sonolência e fadiga. Outro exemplo foi o caso da menina britânica Charlotte Figi, diagnosticada com síndrome de Dravet aos 2,5 anos, apresentava cerca de 50 crises convulsivas por dia que resultaram na perda das habilidades de andar, falar e comer. Com o uso de extrato de *C. sativa* rico em CBD, as crises convulsivas foram controladas na primeira semana de tratamento com retorno gradativo das habilidades neuromotoras (MCCALL, 2015).

1.3 Regulamentação da *Cannabis sativa*

Israel é pioneiro global em desenvolvimento de pesquisas com Cannabis medicinal e nos últimos anos foi criado um processo de alta padronização dos produtos de cannabis para uso médico. Em 2016, o Ministério da Saúde de Israel publicou um documento conhecido como “livro verde” que incluía uma metodologia clínica destinada ao tratamento médico com cannabis medicinal. Muitos médicos do serviço público foram treinados e certificados de acordo com essa metodologia, para que pudessem fornecer tratamento e emitir licenças para posse e uso de *C. sativa* aos pacientes necessitados. A compra de produtos de cannabis medicinal deve ser realizada em farmácias autorizadas a vender esse produto. Em 2019, o governo de Israel aprovou uma lei (Lei Nº 4490) que permite a exportação de cannabis medicinal por empresas aprovadas pelo órgão regulador da saúde e pela polícia para países onde o uso da substância é permitido. Atualmente, Israel é um dos países que lidera o campo de pesquisa e desenvolvimento em Cannabis medicinal, desde estudos com a planta e desenvolvimento de produtos, até ensaios clínicos em humanos (Ministério da Saúde de Israel, 2020).

Nos EUA, em 38 estados, além da capital Washington, a *C. sativa* tem seu uso medicinal legalizado, sob a regulação do FDA. Inicialmente, extratos ricos em CBD e THC foram registrados como suplementos alimentares, mas devido às evidências terapêuticas apresentadas, foram então excluídos dessa classificação no início de 2019. Esses produtos devem então passar pelo processo de aprovação para serem comercializados como medicamentos. Uma maneira de ajudar a garantir que novos medicamentos seguros e eficazes, incluindo quaisquer medicamentos derivados da *C. sativa*, estejam disponíveis para pacientes que necessitam de terapia médica apropriada (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019).

No Canadá a *C. sativa* começou a ser usada legalmente para fim medicinal em 2001, aprovada pelo Ministério da Saúde e implementada pelo *Controlled Drugs and Substance Act*. Em 2016, algumas mudanças ocorreram sobre a especificação da quantidade de cannabis medicinal por pessoa que poderia ser dispensada pelo vendedor em loja ou site licenciado pelo governo federal. Em 2018, o governo aprovou legislação permitindo a produção e venda de *C. sativa* para uso recreativo destinado a pessoas maiores de 18 anos (UNODC, 2019).

Já na América do Sul, no período de 2013-2014, o Uruguai foi o primeiro país

a legalizar inteiramente o acesso à *C. sativa* e além do uso recreativo foram estabelecidas as bases para a produção farmacêutica (URUGUAI, Lei Nº 19.172/2013). Posteriormente, em 2015, a Colômbia legalizou o uso terapêutico da *C. sativa* por meio do Decreto Nº 2467/2015, que regularizou o cultivo, transformação, importação e exportação da *C. sativa* e seus derivados para fins terapêuticos. No mesmo ano, no Chile, o Decreto Nº 84/2015 foi introduzido para remover a *Cannabis* sp. da lista de drogas perigosas e autorizar a venda de medicamentos derivados da planta mediante prescrição médica em farmácias. Além disso, determinou-se que para semear, plantar e cultivar plantas do gênero *Cannabis* deve-se obter uma autorização destinada somente para uso pessoal, sendo proibida a comercialização (CHILE, Decreto Nº 84/2015).

No Brasil, em 2014, o Conselho Federal de Medicina (CFM) regulamentou a prescrição de extratos de *C. sativa* (Resolução CFM Nº 2.113/14). Posteriormente, a RDC Nº 03/2015 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), determinou a inclusão do CBD na lista C1 da Portaria MS 344/1998 (Portaria sobre o regulamento técnico de substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial), estando na mesma classificação de medicamentos como ácido valpróico e carbamazepina (anticonvulsivantes) e olanzapina (antipsicótico).

Ainda em 2015, a Anvisa regulamentou a importação através da RDC Nº 17/2015, que define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produtos à base de CBD em associação com outros canabinoides, dentre eles o THC, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. Além disso, essa RDC determinou que o produto importado deveria ser constituído de derivado vegetal, possuir teor de THC inferior ao de CBD, ser produzido e distribuído por estabelecimentos devidamente regularizados pelas autoridades competentes em seus países de origem para as atividades de produção, distribuição ou comercialização, conter certificado de análise, com especificação e teor de CBD e THC, e que atenda às respectivas exigências regulatórias das autoridades competentes em seus países de origem.

Diante das diversas indicações terapêuticas do THC e da pressão sócio-política exercida pela representação de pacientes, houve a publicação da RDC Nº 66/2016 permitindo a importação de produtos que possuam as substâncias CBD e/ou THC ou partes da planta, quando realizada por pessoa física, para uso próprio, para

tratamento de saúde, mediante prescrição médica. Para a importação desses produtos se aplicam os mesmos requisitos estabelecidos pela RDC Nº 17/2015 alterando, no entanto, a parte que proíbe a importação da planta e/ou de extratos ricos em THC.

Já no final de 2016, a Anvisa atualizou o anexo I da Portaria SVS/MS Nº 344/98 (RDC Nº 130/2016) e incluiu na lista A3 medicamentos registrados derivados da *C. sativa*, em concentração de no máximo 30 mg/mL para THC e CBD. O motivo desta atualização foi a fase final do processo de registro do medicamento Mevatyl® (registrado sob o nome Sativex® no Reino Unido pela GW Pharma), que foi então aprovado em 2017, sendo o primeiro medicamento registrado no país à base de *C. sativa* (27 mg/mL THC + 25 mg/mL CBD). Indicado para o tratamento sintomático da espasticidade relacionada à esclerose múltipla, sendo destinado a pacientes adultos não responsivos a outros medicamentos antiespásticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017) e comercializado apenas com prescrição médica assim como outros medicamentos psicotrópicos. Entretanto, esse medicamento não é indicado para o tratamento de epilepsia, pois a alta concentração de THC possui potencial de causar agravamento de crises epiléticas. O medicamento também não é recomendado para uso em crianças e adolescentes com menos de 18 anos de idade devido à ausência de dados de segurança e eficácia para pacientes nesta faixa etária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Em junho de 2019, a Anvisa publicou duas propostas de consulta pública relacionadas com o objetivo de favorecer a produção nacional de terapias feitas à base de *C. sativa* com garantia de qualidade e segurança, além de permitir a ampliação do acesso da população brasileira a medicamentos, visto que o alto custo do tratamento poderá ser reduzido. Uma das propostas trata dos requisitos técnicos e administrativos para o cultivo da planta por empresas farmacêuticas, única e exclusivamente para fins medicinais e científicos (Consulta Pública nº 655 de 13/06/2019, Anvisa). A outra aborda sobre os procedimentos para o registro e monitoramento de medicamentos produzidos à base de *Cannabis sativa*, seus derivados e análogos sintéticos (Consulta Pública Nº 654 de 13/06/2019, Anvisa).

A Anvisa recebeu 1.154 contribuições, 594 referentes à consulta pública sobre registro e monitoramento de medicamentos à base de *Cannabis sativa* (Consulta Pública Nº 654 de 13/06/2019, Anvisa) e 560 sobre os requisitos técnicos e

administrativos para o cultivo da planta (Consulta Pública Nº 655 de 13/06/2019, Anvisa), sendo a grande maioria das contribuições realizadas por pessoa física.

Os resultados das consultas públicas favoreceram para que ainda no final de 2019, a Anvisa publicasse a RDC Nº 327, de 9 de dezembro de 2019 que estabelece regras para a concessão da autorização sanitária, fabricação, importação, comercialização, prescrição, dispensação, monitoramento e fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, produzidos por indústrias em território nacional. Segundo a RDC, os produtos contendo como ativos exclusivamente derivados vegetais ou fitofármacos da *C. sativa*, devem possuir predominantemente, CBD e não mais que 0,2% de THC. Podendo estes, conter teor de THC acima de 0,2%, desde que sejam destinados a cuidados paliativos exclusivamente para pacientes sem alternativas terapêuticas. Além disso, os produtos de Cannabis só poderão ser prescritos quando estiverem esgotadas outras opções terapêuticas disponíveis no mercado brasileiro.

A RDC Nº 327/2019 aborda também que a planta e suas partes não poderão ser importadas e/ou comercializadas como matérias primas, mesmo que secas, trituradas ou pulverizadas, além de não poderem ser cultivadas no país. Logo, as indústrias que desejarem produzir esse produto no Brasil poderão importar somente os princípios ativos da planta. Em março de 2020 essa RDC entrou em vigor e no mês seguinte foi concedida a autorização sanitária para a primeira empresa a produzir e comercializar o produto à base de canabidiol em território nacional.

No mesmo ano de 2020, a RDC Nº 17/2015 foi revogada, entrando em vigor a RDC Nº 335, que 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. A principal mudança dessa RDC foi a simplificação dos documentos e informações que deverão ser fornecidos à Anvisa.

A publicação dessas RDC foi um grande passo para a regulação, produção e utilização de produtos à base de *C. sativa*, porém, apenas a produção em larga escala pelas indústrias farmacêuticas foi contemplada, não oferecendo suporte ao cultivo e produção artesanal pelas famílias de portadores da epilepsia refratária.

Essas famílias que produzem o próprio extrato de *C. sativa* realizam o processo de extração de forma artesanal, o que eleva o risco de contaminação microbiológica comparado com a produção industrial, logo, há necessidade de uma atenção maior e

um auxílio para esses pequenos produtores. Uma vez que, mesmo tendo um produto nacional, se o valor de mercado for abusivo, as famílias continuarão recorrendo à justiça brasileira para conseguir autorização do plantio e produção do produto.

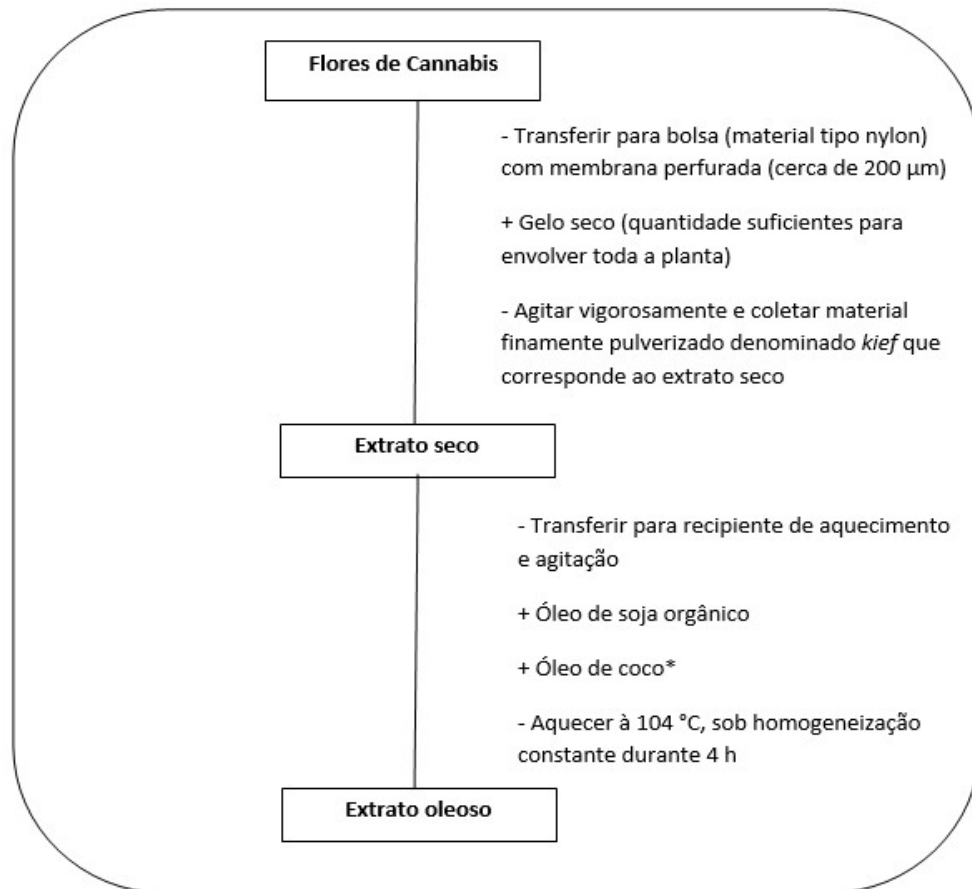
1.4 Preparo de extrato artesanal de *Cannabis sativa*

Famíliares de pacientes com epilepsia refratária recorrem à justiça brasileira para liberação do cultivo de *C. sativa* com objetivo de preparar o próprio extrato (Anvisa, 2017), uma vez que não conseguem realizar a importação dos extratos de *C. sativa*, seja por questão financeira ou burocrática.

No Rio de Janeiro, muitas famílias que produzem os extratos de *C. sativa* estão sendo assistidas por um programa de extensão da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) chamado Farmacannabis, aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, sob a numeração de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 82021817.0.0000.5257.

O programa, iniciado em 2016, visa avaliar a segurança farmacoterapêutica desses extratos, reduzindo riscos e aprimorando a farmacoterapia através de assessoria aos produtores artesanais, além de realizar o monitoramento do teor de canabinoide presente no extrato produzido. O cultivo é feito a partir de sementes de *C. sativa* da cepa *Harle-Tsu*, uma variedade da planta que possui 20 vezes mais CBD que THC (na proporção de 5:2) (GREENCAMP, 2019). No início do programa os extratos eram produzidos através de uma extração oleosa (Figura 1), desenvolvida pelos próprios familiares através de observações da produção em outros países, via internet, e que foi aprimorada pelo grupo do Farmacannabis.

Figura 1 - Esquema de produção de extratos artesanais por extração oleosa



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

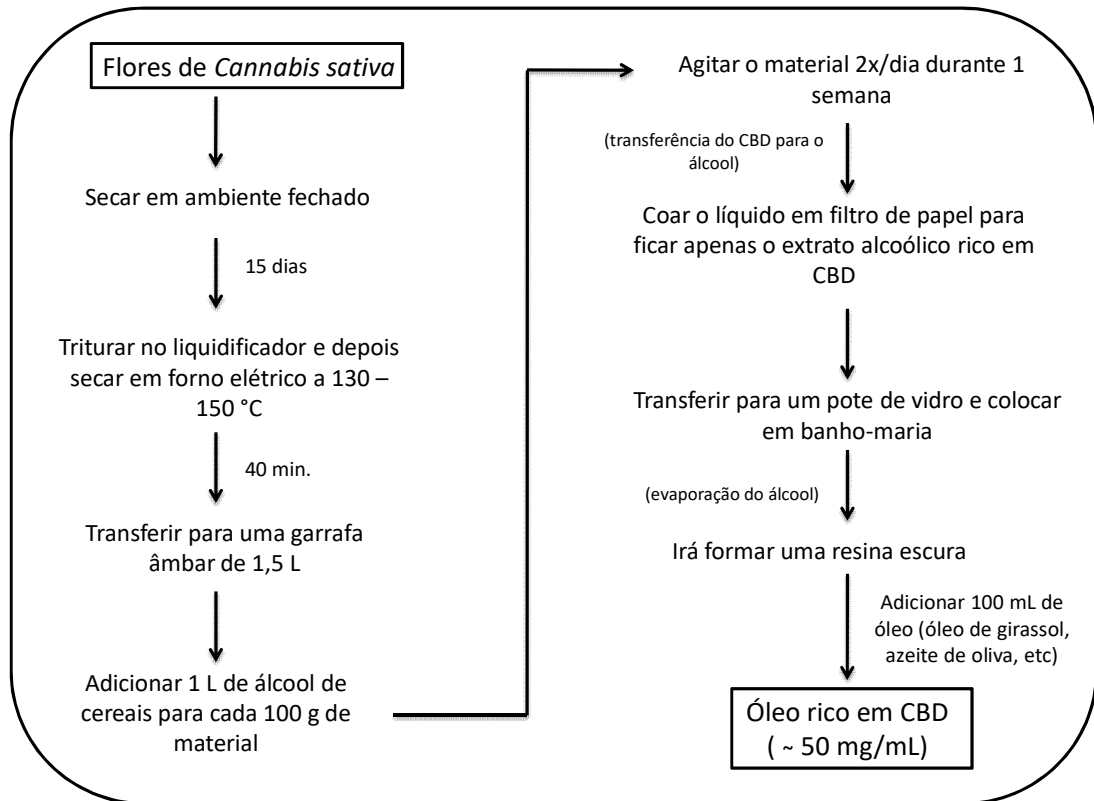
Fonte: Profª Drª Virgínia Martins Carvalho (2017).

Canabinoides como o CBD e o THC, são formados na forma de ácido, CBDA (ácido canabidiólico) e THCA (ácido tetrahydrocannabinólico), que se transformam em CBD e THC através de um processo de descarboxilação por aquecimento (CARVALHO *et al.*, 2020).

Durante o processo da extração oleosa foi visto que se perdia muita matéria-prima e após análise dos extratos realizada pelo Farmacannabis, foi observado que os canabinoides não eram bem recuperados, apresentando aumento dos ácidos de canabinoides (CARVALHO *et al.*, 2020). Além disso, através de uma parceria entre o Farmacannabis e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) com o objetivo de avaliar a segurança do tratamento, foram realizadas análises microbiológicas dos extratos e visto que o risco de contaminação microbiana era elevado (CARMO, 2019). Logo, a partir dos dados obtidos, o Farmacannabis orientou

aos produtores que uma nova forma de preparo fosse utilizada, devendo ser realizada primeiro uma extração alcoólica e posteriormente adicionando o óleo (Figura 2).

Figura 2 - Esquema de produção de extratos artesanais por extração alcoólica



Fonte: Profª Drª Virgínia Martins Carvalho (2019).

Além dessa forma de preparo, pode-se realizar a extração alcoólica utilizando extrator Soxhlet, um aparelho desenvolvido para extração de lipídeos de um material sólido (Figura 3). A extração alcoólica realizada com essa técnica ainda não foi bem avaliada, mas aparentemente apresentou um rendimento maior de canabinoides, porém, por ser um equipamento laboratorial e que requer uma certa técnica para manuseio, só deve ser usado por pessoas capacitadas.

Figura 3 - Extração alcoólica de *C. sativa* por Soxhlet



Nota¹: Extração realizada na casa de família com autorização de plantio para preparo do próprio extrato.

Nota²: Extração acompanhada por membros do Farmacannabis-UFRJ.

Fonte: (Da autora, 2020).

1.5 Avaliação da qualidade microbiológica

Devido a *C. sativa* ser de origem vegetal, naturalmente ela abriga vários patógenos como bactérias, fungos e vírus. Normalmente as plantas são contaminadas com esses patógenos durante o crescimento, colheita e processamento, principalmente pelo manuseio humano, uma vez que mãos e pele humanas abrigam diferentes micro-organismos comensais e oportunistas, como bactérias dos gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* e vírus como norovírus e hepatite A, enquanto o trato intestinal possui bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp.. Além disso, os micro-organismos podem ser provenientes da água ou solo contaminados, e até mesmo pelo ar (BHANDARE, 2020).

Contaminantes microbiológicos podem representar um risco à saúde para aqueles que utilizam extratos de *C. sativa*, uma vez que fungos e bactérias podem causar infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. Até mesmo toxinas oriundas de micro-organismos, como toxina Shiga e aflatoxinas, são capazes de gerar doenças que vão de uma diarreia amena à síndrome hemolítica urêmica (MCPARTLAND; MCKERNAN, 2017).

Em estudos recentes, bactérias potencialmente patogênicas foram isoladas de várias partes da planta *C. sativa*, incluindo espécies de *Pseudomonas*, *Cellvibrio*, *Oxalobacteraceae*, *Xanthomonadaceae*, *Actinomycetales* e *Sphingobacteriales* (MONTOYA *et al.*, 2020). Também foi observado contaminação de produtos alimentícios de *Cannabis* sp. por bactérias potencialmente prejudiciais à saúde humana, incluindo *Listeria* (MCKERNAN *et al.*, 2018). Fungos, principalmente das espécies *Aspergillus* e *Penicillium*, também têm sido bastante isolados de *C. sativa* e torna-se uma preocupação devido a possibilidade de liberar aflatoxinas que podem ser cancerígenas, hepatotóxicas, neurotóxicas ou nefrotóxicas (MONTOYA *et al.*, 2020).

A qualidade microbiológica de produtos de origem vegetal é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras da Anvisa, que estabelecem limites máximos da carga microbiana no produto e a ausência de determinados patógenos (FARMACOPEIA ..., 2019).

A contaminação microbiana de um produto não estéril pode conduzir não somente à sua deterioração, com alterações físicas e químicas, mas também ao risco de infecção para o usuário (FARMACOPEIA ..., 2019). Com isso, a garantia de qualidade e os controles de produção tanto das flores de *C. sativa* utilizadas no processo de extração, quanto do produto final, devem garantir que os micro-organismos capazes de proliferar e contaminar o produto estejam dentro dos limites especificados (Tabela 1).

Tabela 1 – Limites microbianos para produtos não estéreis

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

- (a) É aceitável um resultado duas vezes o valor de especificação em virtude da variabilidade maior de execução dos testes para determinação da biocarga, porém, quando estes valores são encontrados com frequência, é necessário rever o processo produtivo. Assim:
- 10¹ UFC: valor máximo aceitável = 20
 - 10² UFC: valor máximo aceitável = 200
 - 10³ UFC: valor máximo aceitável = 2000 e assim sucessivamente.
- (b) Resultados de contagem de bactérias e fungos dentro dos limites aceitáveis não exclui a necessidade da pesquisa de patógenos.
- (c) Além dos micro-organismos listados na Tabela, a significância de outros micro-organismos recuperados deve ser avaliada levando em consideração:
- o uso do produto: considerar a via de administração a ser utilizada;
 - a natureza do produto: o produto é susceptível ao crescimento microbiano?
 - o usuário: considerar o risco para neonatos, infantes e debilitados.
- (d) Para produtos que se enquadrem em mais de uma situação prevalecerão os limites mais restritivos.
- (e) Outras enterobactérias.

Fonte: (FARMACOPEIA ..., 2019).

No Brasil utilizam-se os limites microbianos, citados acima, preconizado pela farmacopeia brasileira aos produtos de origem vegetal, de maneira geral, enquanto nos EUA existe uma monografia específica para *Cannabis* spp. (AMERICAN Herbal Pharmacopoeia, 2013) no qual determina o próprio padrão de identidade, análises e controle de qualidade, dentre os quais determina os limites microbianos para esse tipo de produto (Tabela 2). Os valores diferem um pouco do que está preconizado na farmacopeia brasileira em relação ao limite de bactérias e fungos, além de não exigir a ausência de *Staphylococcus aureus*.

Tabela 2 – Limites microbiológicos recomendados para produtos botânicos consumidos por via oral nos EUA (UFC/g)

	Bactérias aeróbicas viáveis totais	Levedura e mofo totais	Coliformes totais	Bactéria Gram-negativa bile-tolerante	<i>E. coli</i> (cepas patogênicas) e <i>Salmonella</i> spp.
Materiais não processados*	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ³	Ausência em 1g
Materiais processados*	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ³	Ausência em 1g
Extratos à base de CO₂ e solvente	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ²	Ausência em 1g

*materiais não processados incluem preparações de cannabis minimamente processadas, como inflorescências, resina obtida através de processo de separação por resfriamento (*kief*) e resina obtida através de processo de separação por prensagem (*haxixe*). Os materiais processados incluem várias preparações comestíveis com infusão de sólidos ou líquidos, preparações tópicas com óleos e resinas processadas com água. Pode ocorrer contaminação microbiana significativa durante o manuseio pós-colheita.

Fonte: (Adaptado de AMERICAN ..., 2013).

A *American Herbal Pharmacopoeia* desenvolve monografias qualitativas e terapêuticas sobre plantas frequentemente usadas nos EUA. Essas monografias representam o conjunto de informações sobre medicamentos fitoterápicos que servem como referência principal para acadêmicos, profissionais de saúde, fabricantes e reguladores. Dedicada a promover o uso responsável de produtos e medicamentos à base de plantas (AMERICAN Herbal Pharmacopoeia, 2013).

Porém, como nos EUA cada estado segue suas próprias leis, existem estados que determinam a realização de testes microbiológicos em produtos canábicos de acordo com a *American Herbal Pharmacopoeia* ou com a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), assim como existem estados que não impõem regulamentos para testes microbiológicos (MCKERNAN *et al.*, 2016).

Já no Canadá, o regulamento sobre o acesso à cannabis para fins médicos (ACMPR) determina diretrizes para testes microbiológicos de produtos de Cannabis, segundo a Lei sobre alimentos e medicamentos, que segue os limites preconizados nas farmacopeias europeia e americana (Tabela 3) para medicamentos fitoterápicos.

Tabela 3 - Diretrizes existentes na farmacopeia dos EUA para Cannabis (UFC/g)

	Bactérias aeróbicas totais	Levedura e mofo totais	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	Coliformes Totais*
Planta rasurada	10 ⁵	10 ³	Ausência em 10g	Ausência em 10g	10 ³
Planta pulverizada	10 ⁴	10 ³	Ausência em 10g	Ausência em 10g	Nenhum critério
Tinturas	10 ⁴	10 ³	Nenhum critério	Nenhum critério	Nenhum critério
Infusões	10 ²	< 10	Nenhum critério	Nenhum critério	Nenhum critério

*Bactéria Gram-negativa bile tolerante
 Fonte: (Adaptado de BHANDARE, 2020).

1.6 Resistência bacteriana aos antibióticos

Atualmente, a resistência antimicrobiana é uma das mais graves ameaças à saúde. As infecções causadas por bactérias multirresistentes são muito comuns e vem se tornando um sério problema de saúde pública. Denomina-se resistoma o conjunto de genes de resistência aos antimicrobianos presentes em um determinado ambiente (VAN DUIN; PATERSON, 2016). A resistência antimicrobiana, seja ela, intrínseca ou adquirida, é um processo adaptativo que garante a sobrevivência de micro-organismos sob o aspecto microbiológico (resistência *in vitro*) e clínico (resistência *in vivo*) (SANTOS, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2012).

Uma bactéria pode se tornar resistente através de mutações espontâneas ou aquisição de genes a partir de outros micro-organismos (BLAIR *et al.*, 2015). Na resistência adquirida, micro-organismos tornam-se resistentes pela incorporação de elementos genéticos por meio da transferência horizontal de genes. Elementos genéticos móveis incluindo fagos, plasmídeos, *transposons*, *integrons*, entre outros, medeiam essa transferência e conferem diversas propriedades fundamentais para a sobrevivência dos micro-organismos no ambiente em que se encontram (FERNANDEZ *et al.*, 2011; FERNANDEZ; HANCOCK, 2012). É através desses mecanismos de trocas genéticas que muitas bactérias podem se tornar resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos (TENOVER, 2006).

A partir da aquisição de genes de resistência, o micro-organismo pode produzir enzimas capazes de inativar o antimicrobiano, como é o caso das enzimas β -lactamases que quebram o anel β -lactâmico desativando a atividade antibacteriana

do fármaco. Quando adquiridos, os genes de resistência podem ser dispensados ou mais raramente, até mesmo serem incorporados ao genoma bacteriano. Além disso, outros determinantes de resistência também podem ser carregados junto com os genes de resistência, ampliando ainda mais o fenótipo multirresistente, diminuindo as opções terapêuticas (DŽIDIĆ *et al.*, 2008).

Além disso, as bactérias podem desenvolver resistência aos antimicrobianos por meio de alguns mecanismos já bem descritos na literatura, como alteração do sítio alvo (DRAWZ; BONOMO, 2010), bombas de efluxo (SOTO, 2013) e diminuição da expressão de porinas na parede celular bacteriana (DRAWZ; BONOMO, 2010).

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

A resistência antimicrobiana em *E. coli* tem sido bastante relatada à nível mundial. A resistência emergente a fluoroquinolonas e a produção da enzima β -lactamase de espectro estendido (ESBL) por cepas de *E. coli* multirresistentes foram motivos de preocupação, devido às limitadas opções terapêuticas para tratar infecções causadas por essa bactéria (BAUM; MARRE, 2005). As enzimas ESBL são capazes de hidrolisar as cefalosporinas de amplo espectro, como a cefotaxima e ceftazidima, e os monobactâmicos, como o aztreonam (JACOBY; MEDEIROS, 1991).

A espécie *Staphylococcus aureus*, bactéria do grupo dos cocos Gram-positivos, pertencente à família *Staphylococcaceae*, pode sobreviver permanentemente na microbiota das narinas, pele, garganta e trato intestinal de alguns indivíduos, podendo provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia. As rotas de transmissão ocorrem por contato direto, geralmente através da pele de uma pessoa colonizada ou infectada com lesões abertas, ou através das mãos e bocas de profissionais de saúde contaminados (SANTOS *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência do *S. aureus* aos antimicrobianos está diretamente relacionado com os procedimentos empregados na sua antibioticoterapia. A penicilina G ou benzilpenicilina começou a ser usada no tratamento de pacientes infectados pelo *S. aureus* em 1943, porém, logo esse patógeno exibia resistência a este β -lactâmico nos hospitais do Reino Unido e dos EUA. O mesmo ocorreu com a meticilina, com o aparecimento das cepas MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) e com a vancomicina, na qual já existem cepas de *S. aureus* resistentes (VRSA) (SANTOS *et al.*, 2007).

1.7 *Escherichia coli* patogênica

Escherichia coli é uma bactéria comensal, uma vez que habita o intestino de animais e seres humanos sem ocasionar doenças. Entretanto, existe uma pequena parte das estirpes que apresenta patogenicidade responsável por enfermidades, sendo seis os patótipos (grupos que apresentam diferentes mecanismos de virulência) de *E. coli* diarreiogênica. Sendo elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KUHNERT *et al.*, 2000).

As STECs são um grupo de bactérias patogênicas emergentes, relacionadas a surtos diarreicos de origem alimentar. Entre os muitos subtipos que constitui o grupo, o mais comum é *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC). Os sintomas causados pela STEC variam entre diarreia leve a colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica, relacionada a sequelas renais (BRYAN *et al.*, 2015). As cepas de STEC produzem importantes substâncias denominadas toxinas de Shiga, seus principais fatores de virulência, codificadas pelo gene *stx*. A EHEC expressa simultaneamente os genes *stx* e *eae*, principal diferença entre esse e os demais subtipos da STEC (LOUKIADIS *et al.*, 2006).

EPEC e EHEC produzem mecanismos semelhantes de adesão ao epitélio intestinal que resultam em uma característica anexação e apagamento dos enterócitos que está associada à expressão da intimina, uma proteína da membrana externa codificada pelo gene *eae* (REID *et al.*, 1999).

ETEC são uma das principais causas de diarreia em crianças de países em desenvolvimento e em adultos que viajam para essas regiões, conhecida

popularmente como diarreia do viajante. A principal via de infecção é a contaminação fecal em alimentos e água potável. Após a ingestão, ETEC coloniza o intestino, se anexando à mucosa e causando uma disfunção no transporte de eletrólito e água em enterócitos levando aos seguintes sintomas: diarreia aquosa, febre baixa, vômitos, cólicas e náuseas (KUHNERT *et al.*, 2000).

1.8 Tipificação molecular

As bactérias possuem sequências de elementos repetitivos que podem ser conservados em muitos gêneros ou espécies. Vários métodos de detecção e tipagem molecular foram desenvolvidos e são amplamente utilizados para detectar, diferenciar, tipificar e classificar patógenos para determinar a origem e a disseminação de diversos clones em investigações de surtos, tratamentos clínicos e estudos epidemiológicos (TRINDADE *et al.*, 2003; ADZITEY; HUDA; ALI, 2013). O ponto chave de uma técnica de tipificação é o poder discriminatório, que está relacionado com o fato de que os isolados que compartilham perfis idênticos ou intimamente relacionados sejam realmente clones e façam parte da mesma cadeia de transmissão (TRINDADE *et al.*, 2003).

A *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR) é uma técnica de tipificação molecular simples, precisa e econômica que utiliza primers específicos para sequências consensuais intergênicas repetitivas. Esses primers podem ser usados em condições de alto rigor para que o DNA alvo possa produzir impressões digitais, de regiões altamente conservadas, que possuem diferentes tamanhos, de modo que possa então ser verificada a diferenciação entre os micro-organismos da mesma espécie (WASSENAAR; NEWELL, 2000).

Um estudo realizado com amostras de água de fontes naturais, analisou 650 amostras e realizou a detecção e genotipagem de isolados de *E. coli* utilizando ERIC-PCR. Os pesquisadores identificaram 175 diferentes genótipos de *E. coli* em 555 amostras de água contaminadas com fezes humanas e de animais. Os isolados do mesmo genótipo foram frequentemente encontrados no mesmo conjunto de amostras de água (CASAREZ; PILLAI; GIOVANNI, 2007).

A genotipagem utilizando ERIC-PCR também pode ser realizada em outros micro-organismos que não sejam enterobactérias. Um estudo desenvolvido por TSAI e colaboradores (2020) realizou a genotipagem de *S. aureus* multirresistentes isolados

de águas de rios em Taiwan. Foi observado que cepas com perfis de resistência semelhantes foram categorizadas no mesmo grupo e algumas apresentaram-se como mesmo clone.

1.9 Diversidade metagenômica

Micro-organismos não cultiváveis em laboratório compreendem a maioria da diversidade biológica do planeta. Visto isso, métodos independentes de cultivo são essenciais para entender a diversidade genética, estrutura populacional e papéis ecológicos da maioria dos micro-organismos (RIESENFELD *et al.*, 2004).

A metagenômica nada mais é que uma análise genômica independente de cultivo que gera dados de sequências de DNA retirados diretamente do ambiente, que são comparados com os genomas de milhares de espécies em bancos de dados e ferramentas como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). De um modo geral, uma análise de metagenômica compreende três etapas principais: processamento da amostra biológica, sequenciamento numa plataforma de alto desempenho e análise dos dados (RIESENFELD *et al.*, 2004; STREIT; SCHMITZ, 2004).

O advento da metagenômica vem proporcionando a realização de análises de comunidades microbianas em inúmeros ambientes baseada em sequência, ou seja, é o *screening* de genes de interesse baseando-se em suas sequências conservadas (TURQUE *et al.*, 2010; GONZALEZ *et al.*, 2012). Devido à grande maioria dos micro-organismos não serem cultiváveis em laboratório, as pesquisas pela metagenômica podem resultar na identificação de genes e proteínas de micro-organismos até então desconhecidos. Assim, a probabilidade de descobrir novas sequências torna essa abordagem mais favorável do que as pesquisas em micro-organismos já cultivados (RIESENFELD *et al.*, 2004; STREIT; SCHMITZ, 2004).

Um grupo nos EUA analisou uma formulação a base de plantas que aumenta a imunidade através de bactérias presentes nesse produto. Foi escolhida uma espécie de planta (*Angelica sinensis*) utilizada na formulação para caracterizar sua comunidade bacteriana por meio de análise metagenômica. O estudo metagenômico do gene *rrs* do 16S rRNA forneceu uma visão geral da complexa comunidade bacteriana. A maioria dos micro-organismos identificados eram bactérias Gram-negativas, sendo o gênero *Rahnella* o mais abundante nas três amostras analisadas

e parecia estar associado à atividade imunoestimuladora. Esse gênero bacteriano é amplamente distribuído na água, no solo e nas plantas (MONTENEGRO *et al.*, 2015).

Outro estudo metagenômico, também realizado nos EUA, identificou uma variedade de patógenos humanos, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*, *Salmonella enterica*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Clostridium botulinum*, em flores de plantas medicinais de *Cannabis* sp. cultivadas dentro de casas em Massachusetts, Maine e Rhode Island (MCKERNAN *et al.*, 2016).

1.10 Justificativa

Na legislação atual, regulamentada pela Anvisa, a *C. sativa* é considerada como proscrita, exceto para fins médicos e científicos, de forma controlada e supervisionada (RDC Nº 143/17). Ou seja, isso não impede a realização de pesquisas e utilização com finalidades terapêuticas, sendo possível, inclusive, o registro de medicamento à base de substância e/ou planta proscritas.

Ainda que a Anvisa autorize a importação de extratos de *C. sativa*, o acesso a esse medicamento acarreta questões burocráticas e principalmente financeiras, uma vez que esses produtos são vendidos a preços elevados. Tendo em vista esse fato, famílias de portadores da epilepsia refratária estão conseguindo por meio judicial o *habeas corpus* para cultivarem a *C. sativa* e produzirem seus próprios extratos medicinais.

Existem muitos estudos sobre as propriedades farmacológicas dos extratos de *C. sativa* e até sobre análises toxicológicas, mas poucos estudos avaliam a qualidade microbiológica desses extratos, tampouco seu potencial risco à saúde. No entanto, alguns estudos têm revelado a presença de atividade antimicrobiana de canabinoides, do óleo da semente e de produtos da extração alcoólica da *C. sativa* (APPENDINO *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2012). Por outro lado, é importante ressaltar que análises microbiológicas em extratos oleosos de *C. sativa* demonstraram abundância de microorganismos patogênicos, principalmente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em um estudo anterior realizado no INCQS (CARMO, 2019).

Diante da importância do tema, a realização deste estudo é de alta relevância, uma vez que se trata da caracterização de isolados microbianos provenientes do monitoramento de extrato artesanal de *C. sativa*, abordagem ainda não adotada no

Brasil. Além disso, estudaremos a composição de comunidades microbianas do extrato e as possíveis relações clonais e suas associações com os perfis de susceptibilidade antimicrobianos.

O uso da metagenômica irá permitir uma exploração mais robusta da composição da comunidade microbiana presente nos extratos medicinais de *C. sativa*, uma vez que essa técnica identifica micro-organismos não cultiváveis em laboratório, que compreendem a maioria da diversidade biológica do planeta. Além disso, poderá revelar a presença de possíveis patógenos que não foram possíveis de serem identificados na metodologia convencional de cultivo microbiano.

Os resultados obtidos no presente estudo poderão revelar dados ainda não divulgados no Brasil, em relação à qualidade microbiológica de extrato artesanal de *C. sativa*, e com isso, contribuir com as ações da vigilância sanitária, no que caracteriza sua extrema relevância para a saúde pública.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Determinar a composição da comunidade microbiana de extratos medicinais de *Cannabis sativa* pela metagenômica e avaliar a variabilidade genética, a susceptibilidade aos antimicrobianos e as relações clonais de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados desses produtos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a identificação molecular de linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de extratos de *C. sativa*;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados;
- Estabelecer as relações clonais dos isolados pela ERIC-PCR e associar com perfis de resistência aos antimicrobianos;
- Determinar a patogenicidade e atividade hemolítica dos isolados de *E. coli*;
- Realizar a contagem e identificação fenotípica de micro-organismos nas novas amostras de extratos de *C. sativa*;
- Determinar e comparar a composição da comunidade microbiana de extratos de *C. sativa*, pela metagenômica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

No período de 2017-2018, foram obtidas 73 amostras de extratos de *C. sativa* produzidos por familiares de pacientes epiléticos. Esses extratos foram obtidos a partir de extração oleosa em colaboração com o projeto de extensão Farmacannabis-UFRJ (CARVALHO, 2017). Essas amostras foram encaminhadas ao Setor de Produtos Não Estéreis, no Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz (Ofício N° 657/2017).

Já no período de 2019-2020 foram fornecidas 30 amostras de extratos artesanais de *C. sativa*, que foram preparados utilizando extração alcoólica, Soxhlet ou CO₂ em estado supercrítico.

Nessas amostras foram realizadas análises de contagem total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras; contagem de bactérias Gram-negativas bile tolerantes; pesquisa de patógenos: *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e a caracterização fenotípica de outros micro-organismos (JORGENSEN; PFALLER, 2015; FARMACOPEIA ..., 2019).

3.2 Contagem total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras

Como os extratos de cannabis são produtos de natureza lipídica, transferiu-se 1mL da amostra para tubo de ensaio com 9 mL de caldo caseína-soja com 0,1% de polissorbato 80 para atingir a diluição 10⁻¹. O produto foi homogeneizado em banho termostático (40–45 °C). Foram preparadas diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente (caldo caseína-soja) acrescido de polissorbato 80, utilizando o método de contagem por semeadura em profundidade.

No ensaio de contagem total de bactérias aeróbias foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada diluição (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵) da amostra para 2 placas de Petri e adicionado 20 mL de ágar caseína-soja (Merck, EUA), previamente fundido e resfriado a 45–50°C em banho termostático. Após homogeneização e solidificação do ágar as placas foram incubadas a (32,5 ± 2,5) °C por 48 h (FARMACOPEIA ..., 2019).

Já para a contagem de bolores e leveduras (semeadura em profundidade) foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada diluição (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) da amostra

para 2 placas de Petri e adicionado 20 mL de ágar sabouraud-dextrose 4% (Difco, EUA), previamente fundido e resfriado a 45–50 °C em banho termostático. Após homogeneização e solidificação do ágar as placas foram incubadas a (22,5 ± 2,5) °C por 5 a 7 dias (FARMACOPEIA ..., 2019).

Após o período de incubação, foi realizado a contagem de colônias nas placas de ágar caseína-soja, que apresentaram até 300 colônias de bactérias e nas placas de ágar sabouraud-dextrose com até 100 colônias fúngicas, utilizando a seguinte fórmula:

$$N = \frac{(\sum Pi)}{(\sum Vi)} D$$

Onde:

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

D = Fator de diluição usado

ΣPi = Soma do número de colônias observadas em cada placa

ΣVi = Soma do volume do teste em cada placa

Quando as placas de todas as diluições não apresentavam colônias, a contagem foi registrada como sendo menor que uma vez a menor diluição. Ou seja, se nenhum crescimento foi detectado na diluição 1:10, a contagem foi inferior a 10 UFC/mL.

3.3 Contagem de bactérias Gram-negativas bile tolerantes

O produto na diluição 1:10 foi incubado a (22,5 ± 2,5) °C por duas horas apenas para que ocorresse a reativação da bactéria. Em seguida, transferiu-se 1 mL para tubos contendo 9 mL de caldo Mossel para enterobactéria (Difco, EUA), realizando diluições em série até 10⁻³. Os três tubos foram incubados a (32,5 ± 2,5) °C por 24 a 48 h. Após período de incubação, para cada tubo com crescimento positivo, foram realizadas subculturas em ágar violeta vermelho neutro glicose (VRBG) (Merck, EUA) e posteriormente incubadas a (32,5 ± 2,5) °C durante 18 a 24 h (FARMACOPEIA ..., 2019).

O

crescimento de colônias bem desenvolvidas de bactérias Gram-negativas, geralmente vermelhas ou avermelhadas, indica contaminação (resultado positivo). Anotam-se os

resultados positivos e negativos, e determina-se o número mais provável (NMP) de bactérias por grama ou mililitro do produto segundo tabela 4.

Tabela 4 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias Gram-negativas bile tolerantes

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

Fonte: (Modificado da FARMACOPEIA ..., 2019).

3.4 Pesquisa de patógenos

Esse método possibilita verificar a presença ou a ausência de micro-organismos específicos em meios seletivos. Para todas as pesquisas descritas a seguir, utilizou-se a amostra na diluição 10⁻¹ em caldo caseína-soja previamente incubada a (32,5 ± 2,5) °C durante 18 a 24 h e foram realizadas baseando-se no manual de microbiologia clínica (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

3.4.1 *Escherichia coli*

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

3.4.2 *Salmonella*

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

3.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

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

3.4.4 *Staphylococcus aureus*

Transferiu-se uma alíquota da amostra para placa contendo ágar sal manitol (Merck, EUA). Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24 h. O crescimento de colônias amarelas ou brancas rodeada por uma zona amarela indica presença provável de *S. aureus* que deve ser confirmada por coloração de Gram e testes bioquímicos específicos: desoxirribonuclease (DNAse) (Merck, EUA), coagulase, catalase, além da fermentação anaeróbica em glicose e manitol.

3.4.5 *Candida albicans*

Transferiu-se uma alíquota para placa contendo ágar sabouraud dextrose e ágar Nickerson. Incubou-se a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 24–48 h. O crescimento de

colônias brancas em ágar sabouraud, colônias pretas em ágar Nickerson e colônias verdes em CHROMagar indica presença de *C. albicans*.

3.4.6 *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

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

3.4.7 Outros micro-organismos

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

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

3.5 Identificação molecular de *E. coli* e *S. aureus*

A extração do DNA genômico (gDNA) foi realizada por fervura, no qual uma alçada de colônia bacteriana foi transferida para microtubo de 1,5 mL contendo 200 µL de tampão TE e posteriormente aquecido a 95 °C por 15 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 minutos. Ao final da centrifugação foi recuperado 100 µL do sobrenadante para utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR).

A confirmação da identidade dos isolados bacterianos foi realizada através da amplificação de gene específico de *E. coli* (*uidA*) que codifica a produção de β-glucuronidase (BEJ *et al.*, 1991; CEBULA *et al.*, 1995) e amplificação de gene específico de *S. aureus* (*femA*) que tem como produto uma proteína de 48-50 kDa,

sendo envolvido na estrutura da parede celular bacteriana (TEIXEIRA *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2016).

A mistura de PCR foi composta por água deionizada; 1X PCR MasterMix (PROMEGA), 15 pmol de cada iniciador (Tabela 5), a esta mistura foi adicionado aproximadamente 10 ng do gDNA a ser analisado e a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 1 minuto; anelamento ideal (Tabela 5) por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto por 35 ciclos, com uma extensão adicional a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na confirmação da identidade de *E. coli* e *S. aureus*

Micro-organismo / Gene alvo	Iniciador	Sequência (5'-3')	Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>E. coli/ uidA</i>	UAL-754	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG	52	156	BEJ <i>et al.</i> , 1991
	UAR-900	ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG			
<i>S. aureus/ femA</i>	femA-SaF	TGCCTTTACAGATAGCATGCCA	55	142	CHUNG <i>et al.</i> , 2016
	femA-SaR	AGTAAGTAAGCAAGCTGCAATGACC			

Fonte: (Da autora, 2019).

Para a identificação de *E. coli* foram utilizadas as cepas de referência *E. coli* INCQS 00749/ATCC CRM 8739 (controle positivo) e *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00147/ATCC 13883 (controle negativo). Enquanto isso, na identificação de *S. aureus* foram utilizadas as cepas de referência *S. aureus* INCQS 00746/ATCC CRM 6538 e *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00745/ATCC CRM 12228 como controles positivo e negativo, respectivamente. Adicionalmente, uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5% (p/v); revelado com GelRed™ 1X (BIOTIUM) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS).

3.6 Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer) ou E-test, segundo os critérios estabelecidos pelo

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019). Os isolados foram inicialmente semeados em ágar caseína soja por 24 horas a 37 °C e o crescimento microbiano suspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland.

A suspensão foi semeada, com o auxílio de um swab, em ágar Müller-Hinton onde foram depositados os discos de onze antibióticos selecionados em placas contendo *E. coli*: piperacilina/tazobactam (30/6 µg), cefuroxima (30 µg); ceftazidima (10 µg), cefepima (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (15 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 µg) e fita de tigeciclina. Já para o antibiograma de *S. aureus* foram utilizados nove antibióticos: benzilpenicilina (fita), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), clindamicina (2 µg), tetraciclina (30 µg), rifampicina (fita), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 µg) e vancomicina (fita). A leitura dos halos de inibição foi efetuada após a incubação a 37°C por 16-18 horas.

3.7 Estabelecimento de relações clonais por meio da técnica ERIC-PCR

A análise de tipificação dos isolados foi realizada através da *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR), para a análise do polimorfismo do DNA das amostras bacterianas com o objetivo de avaliar a similaridade genética entre os isolados. Para os isolados de *E. coli* foi utilizado uma combinação dos iniciadores ERIC-1 (5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT-3') e ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), já para os isolados de *S. aureus* foi utilizado apenas o iniciador ERIC-2 e as condições de amplificação de acordo com protocolo previamente descrito (VERSALOVIC *et al.*, 1991).

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1X corado com GelRed™ 1X (BIOTIUM), utilizando o peso molecular padrão de 100 pb de DNA padrão, com uma corrida inicialmente a 65V por 30 minutos, posteriormente aumentando para 80V por 1 hora e 55 minutos e, ao final, analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS).

Padrões de banda foram analisados com o programa BioNumerics versão 6.6 (AppliedMaths, Kortrijk, Bélgica). O dendograma foi construído com a utilização do índice de Dice e o método “unweighted pair group method with arithmetic average”

(UPGMA) (VAN BELKUM *et al.*, 2007). Amostras que apresentaram perfis de banda idênticos foram classificadas em um mesmo genótipo.

3.8 Patogenicidade e atividade hemolítica dos isolados de *E. coli*

Todas as cepas de *E. coli* foram analisadas para verificar seu potencial de patogenicidade. A atividade hemolítica dos isolados de *E. coli* foi avaliada através do cultivo em ágar sangue, as culturas foram semeadas, em formato de círculo, em placas de ágar Müeller-Hinton contendo 5% (v/v) de sangue de ovelha e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, a presença de halo de hemólise ao redor das culturas bacterianas é um indicativo de atividade hemolítica (TAKAHASHI *et al.*, 2014).

Além disso, duas categorias patogênicas foram escolhidas para serem verificadas nas *E. coli* isoladas dos extratos de *C. sativa*. São elas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Para detectar EPEC, foram pesquisados os genes *eae* e *bfpA*; e para detectar EHEC, além do gene *eae*, o gene *stx* também foi investigado. A mistura de PCR foi composta por água deionizada; 1X PCR MasterMix (PROMEGA), 25 pmol de cada iniciador (Tabela 6), a esta mistura foi adicionado aproximadamente 10 ng do gDNA a ser analisado e a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 45 segundos; anelamento a 58 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto por 30 ciclos, com uma extensão adicional a 72 °C por 7 minutos.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos utilizados na pesquisa de gene de virulência

Gene alvo	Iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>eae</i>	<i>eae-F</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA	917	REID <i>et al.</i> , 1999
	<i>eae-R</i>	CCAGACGATACGATCCAG		
<i>bfpA</i>	<i>bfpA-F</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	GUNZBURG <i>et al.</i> , 1995
	<i>bfpA-R</i>	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>Stx</i>	<i>stx-F</i>	ATCCTATTCCC GGGAGTTTACG	584	VIDAL <i>et al.</i> , 2004
	<i>stx-R</i>	GCGTCATCGTATACACAGGAGC		

Fonte: (Da autora, 2020).

As cepas de referência de *E. coli* diarreiogênica INCQS 00180/CDC O111ab EPEC (*bfpA* e *eae*), INCQS 00171/CDC EDL-933 EHEC (*stx* e *eae*) foram usadas

como controles positivos e *E. coli* INCQS 00310/ATCC 11775 como controle negativo. Adicionalmente, uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5% (p/v); revelado com GelRed™ 1X (BIOTIUM) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS).

3.9 Comunidade microbiana de extratos de *C. sativa* pela metagenômica

3.9.1 Amostragem

Para avaliar a composição da comunidade microbiana presente nos extratos de *C. sativa*, as amostras foram agrupadas de acordo com a origem (Organização Não Governamental - ONG; laboratório-Farmacannabis; paciente) e o método de extração utilizado (oleosa; alcoólica; Soxhlet; fluido supercrítico), para serem analisadas pela técnica da metagenômica. As amostras obtidas por extração oleosa foram adquiridas no período 2017-2018 e armazenadas a (-70) °C. Ao final foram obtidos 16 grupos amostrais (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos amostrais analisados na metagenômica

Grupo	Fonte	Tipo de extração
CAN 1	ONG 1	Oleosa
CAN 2	ONG 1	Oleosa + adição de álcool
CAN 3A	ONG 1	Alcoólica
CAN 3B	ONG 1	Alcoólica
CAN 4	ONG 2	Oleosa
CAN 5	ONG 3	Oleosa
CAN 6	ONG 3	Alcoólica
CAN 7	ONG 4	Oleosa
CAN 8	ONG 4	Alcoólica
CAN 9	Laboratório	Soxhlet + Fluido supercrítico
CAN 10	Laboratório	Soxhlet
CAN 11	Laboratório	Fluido supercrítico
CAN 12	Laboratório	Alcoólica
CAN 13	Paciente 1	Alcoólica
CAN 14	Paciente 2	Soxhlet
CAN 15	Paciente 3	Alcoólica

Fonte: (Da autora, 2020).

3.9.2 Sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA

O DNA total das amostras foi extraído e purificado utilizando kit Olive Oil DNA Isolation (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canadá). A região V4 do gene *rrs* do 16S rRNA foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores 16Sf (5' – GTGCCAGCMGCCGCGGTAA - 3') e 16Sr (5' – GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3') com os devidos *barcodes* e adaptadores que proporcionam à amplificação de um fragmento de 380 pb (KOZICH *et al.*, 2013).

A mistura da reação foi composta por AccuPrime™ Pfx SuperMix (Thermo Fisher Scientific™) e 2 µM de cada iniciador, foi adicionado a esta mistura 5 ng do DNA a ser analisado nas seguintes condições: etapa inicial 5 min a 95 °C, em seguida inicia-se as três etapas que foram repetidas por 35 vezes: 20 segundos a 95 °C; 50 °C por 30 segundos; e 5 minutos a 72 °C e alongamento por 10 min a 72 °C. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v); revelado com GelRed™ 1X (BIOTIUM) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN) e quantificados em equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN), conforme o manual dos fabricantes.

O sequenciamento massivo da região V4 do gene *rrs* do 16S rRNA foi realizado de acordo com o protocolo *Miseq Reagent Kit v.2* na plataforma MiSeq (Illumina®). A checagem da qualidade das sequências foi realizada utilizando o programa *FastQC* (ANDREWS, 2010) e a filtragem de sequências com qualidade média igual ou superior a 25 foi realizada pelo programa *PRINSEQ* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012). A análise dos dados foi realizada através do software *QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)* versão 2 (CAPORASO *et al.*, 2010). Os dados foram comparados com o banco de dados *SILVA High Quality Ribosomal RNA Databases* (não-redundante) release 138 com *e-value* máximo de 1e-5, mínima identidade de 98 – 99%.

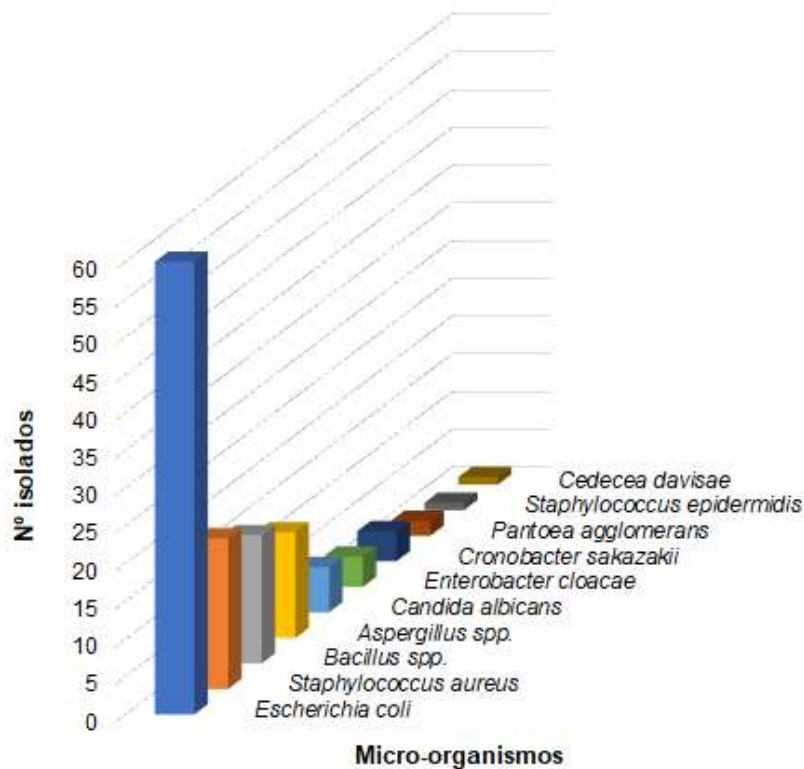
4 RESULTADOS

4.1 Contagem e isolamento de micro-organismos

4.1.1 Amostragem de 2017/2018

Um total de 73 amostras de extratos medicinais de *C. sativa* foram analisadas no período de 2017-2018, utilizando técnicas convencionais de contagem e identificação de micro-organismos. Todos os extratos foram preparados utilizando a técnica da extração oleosa (descrita na Figura 1). Foram encontrados fungos e leveduras, tais como: *Aspergillus* spp. (n = 14/ 19,2%) e *Candida albicans* (n = 6/ 8,2%), além de diversas espécies bacterianas, dentre elas: *E. coli* (n = 60/ 82,2%), *S. aureus* (n = 20/ 27,4%), *Bacillus* spp. (n = 17/ 23,3%), *Enterobacter cloacae* (n = 4/ 5,5%), *Cronobacter sakazakii* (n = 4/ 5,5%), *Pantoea agglomerans* (n = 2/ 2,7%), *Staphylococcus epidermidis* (n = 1/ 1,4%), *Cedecea davisae* (n = 1/ 1,4%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Micro-organismos isolados nos extratos oleosos de *C. sativa* analisados em 2017 e 2018



Fonte: (Da autora, 2018).

4.1.2 Amostragem de 2019/2020

Um total de 30 amostras de extratos medicinais de *C. sativa* foram analisadas no período de 2019-2020, utilizando técnicas convencionais de contagem e identificação de micro-organismos (Tabela 7). Os extratos foram preparados por diferentes tipos de extração, como: extração alcoólica simples (descrita na Figura 2) ou utilizando técnicas mais robustas no laboratório da UFRJ como Soxhlet; ou extração com CO₂ em estado supercrítico, no qual realiza a extração a uma temperatura e pressão específica.

Tabela 7 – Contagem e identificação de micro-organismos em extratos de *C. sativa* analisados em 2019 e 2020 (continua)

Nº Amostra	Tipo de extração	Contagem total de Bactérias	Contagem total de bolores e leveduras	Bactéria Gram-negativa bile-tolerante
1	Soxhlet + Fluido supercrítico	< 10	< 10	Menos de 10
2	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
3	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
4	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
5	Soxhlet	< 10	< 10	Menos de 10
6	Fluido supercrítico	< 10	< 10	Menos de 10
7	Fluido supercrítico	< 10	< 10	Menos de 10
8	Fluido supercrítico	< 10	< 10	Menos de 10
9	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
10	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
11	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
12	Extração alcoólica	< 10	< 10	Menos de 10
13	Extração alcoólica	< 10	< 10	Menos de 10
14	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
15	Extração alcoólica	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ² <i>Aspergillus flavus</i>	Menos de 10 ³ e mais de 10 ² <i>Enterobacter cloacae</i>
16	Extração alcoólica	3,0 x 10 ² <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0 x 10 ² <i>Aspergillus flavus</i>	Menos de 10
17	Desconhecido	4,0 x 10 ² <i>Staphylococcus epidermidis</i>	< 10	Menos de 10
18	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
19	Desconhecido	< 10	< 10	Menos de 10
20	Extração alcoólica	< 10	< 10	Menos de 10
21	Desconhecido	1,5 x 10 ²	< 10	Menos de 10 ³ e mais de 10 ² <i>Enterobacter cloacae</i>

Nota: Resultados em UFC/mL. Exceto para Bactéria Gram-negativa bile tolerante, resultados em NMP.
Fonte: (Da autora, 2020).

Tabela 7 – Contagem e identificação de micro-organismos em extratos de *C. sativa* analisados em 2019 e 2020 (conclusão)

Nº Amostra	Tipo de extração	Contagem total de Bactérias	Contagem total de bolores e leveduras	Bactéria Gram-negativa bile-tolerante
22	Desconhecido	$1,0 \times 10^2$ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	< 10	Menos de 10
23	Extração alcoólica	< 10	< 10	Menos de 10
24	Extração alcoólica	< 10	$1,6 \times 10^3$ <i>Aspergillus flavus</i>	Menos de 10
25	Extração alcoólica	< 10	< 10	Menos de 10
26	Extração alcoólica	< 10	< 10	Menos de 10
27	Soxhlet	< 10	< 10	Menos de 10
28	Soxhlet	< 10	< 10	Menos de 10
29	Fluido supercrítico	< 10	< 10	Menos de 10
30	Extração alcoólica	$1,0 \times 10^4$ <i>Bacillus circulans</i>	< 10	Menos de 10

Nota: Resultados em UFC/mL. Exceto para Bactéria Gram-negativa bile tolerante, resultados em NMP. Fonte: (Da autora, 2020).

Dentre as amostras analisadas foram encontrados fungos: *Aspergillus flavus* (n=3); e bactérias: *Enterobacter cloacae* (n=2), *Bacillus circulans* (n=1) e *Staphylococcus epidermidis* (n=3). Das sete amostras que apresentaram contaminação microbiana, três estavam acima dos limites preconizados pela farmacopeia brasileira. A amostra nº 24 apresentou contagem de *A. flavus* de $1,6 \times 10^3$ UFC/mL, sendo que a farmacopeia determina para contagem de fungos até 100 UFC/mL, com valor máximo aceitável de até 200 UFC/mL. Além disso, as amostras nº 15 e nº 21 apresentaram número mais provável (NMP) de bactéria Gram-negativa bile tolerante entre menos de 10^3 e mais de 10^2 , uma vez que o limite determinado pela farmacopeia é de 10^2 .

4.2 Identificação molecular de *E. coli* e *S. aureus*

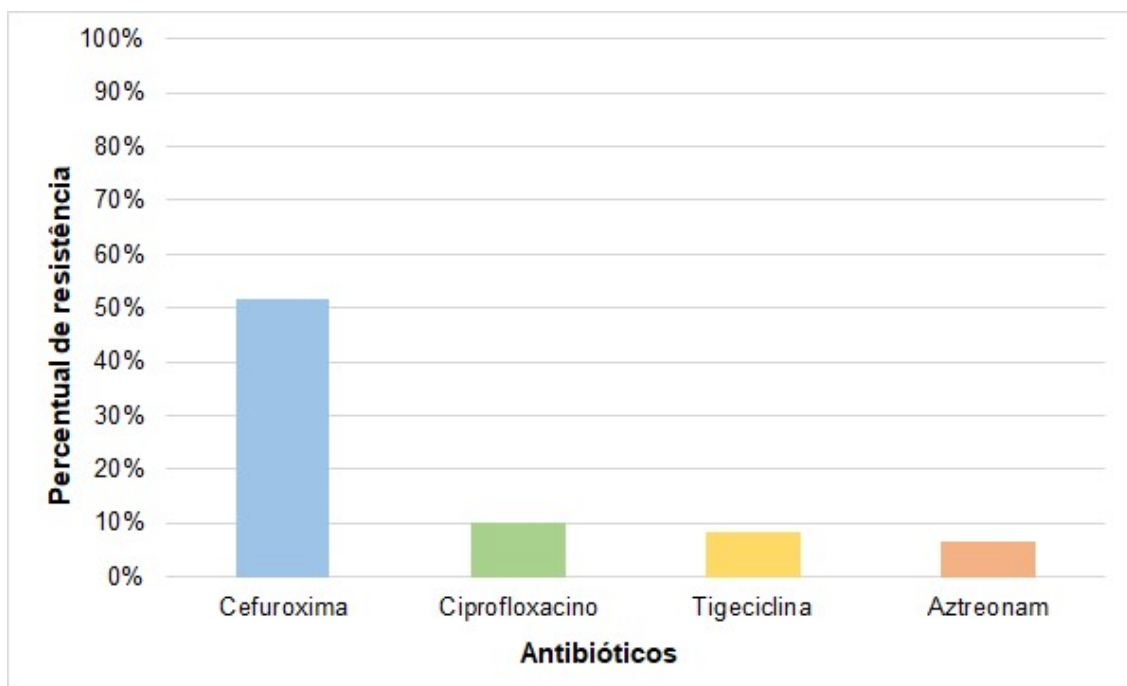
Visto que *E. coli* e *S. aureus* foram as espécies mais isoladas e por serem micro-organismos potencialmente patogênicos que deveriam estar ausentes nesses produtos, foram então os escolhidos para serem analisados neste estudo.

Foram isolados e identificados bioquimicamente 60 *E. coli* e 20 *S. aureus*. A identidade destes 60 isolados de *E. coli* e 20 de *S. aureus* foi confirmada pela PCR dos genes *uidA* (156pb) e *femA* (142pb), respectivamente.

4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os ensaios de antibiograma dos 60 isolados de *E. coli*, revelaram resistência a quatro antibióticos: cefuroxima 51,7% (31/60); ciprofloxacino 10% (6/60); tigeciclina 8,3% (5/60) e aztreonam 6,7% (4/60) (Gráfico 2). Todos os isolados de *E. coli* foram sensíveis a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim.

Gráfico 2 – Resistência dos isolados de *Escherichia coli*



Fonte: (Da autora, 2019).

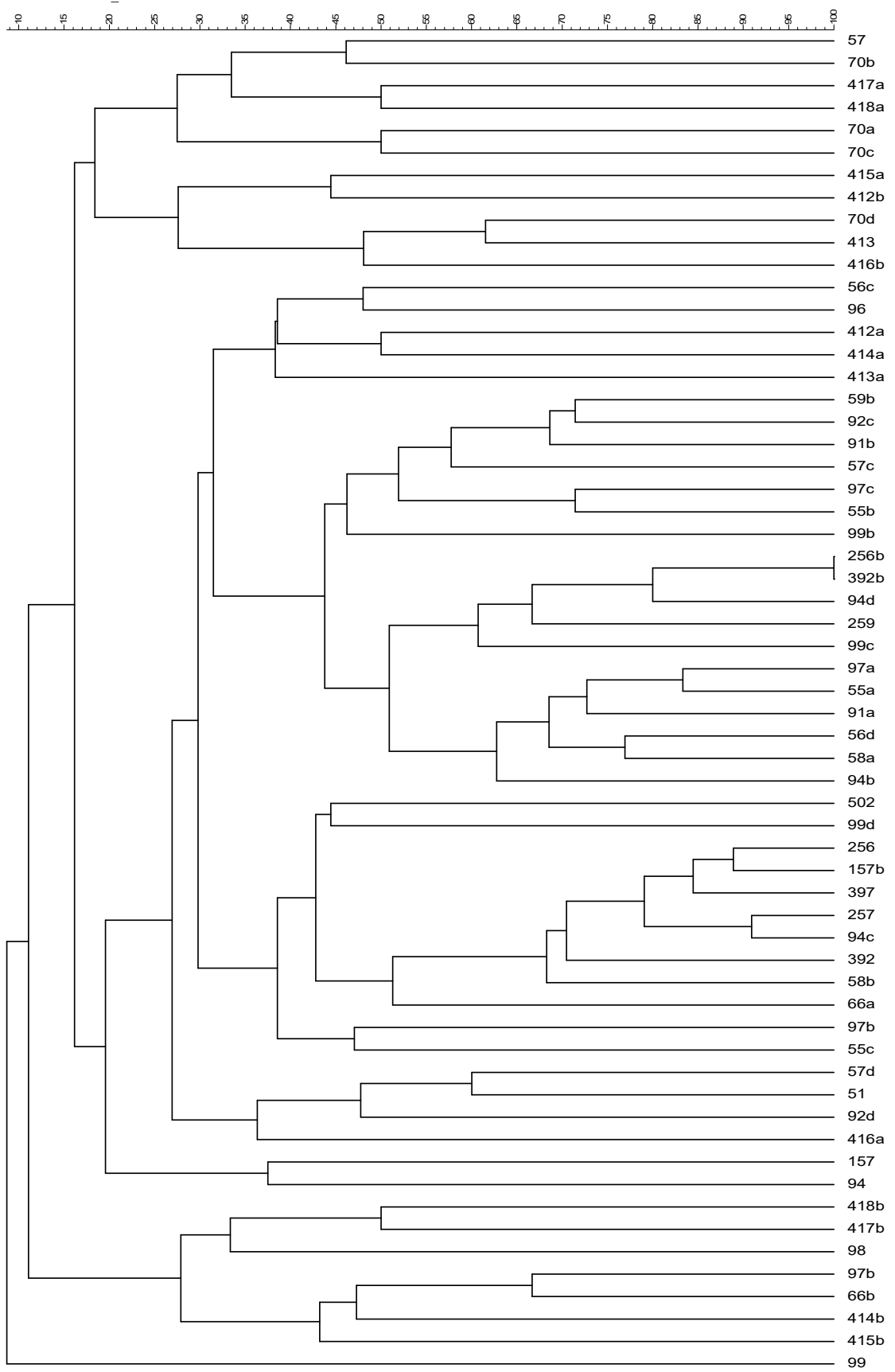
Enquanto isso, 40% (8/20) dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência apenas à benzilpenicilina (penicilina G). Todos os isolados de *S. aureus* foram sensíveis a cefoxitina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina.

4.4 Tipificação das cepas de *E. coli* e *S. aureus*

A diversidade genética foi avaliada através da técnica ERIC-PCR para todos os isolados de *E. coli* (n = 60) e *S. aureus* (n = 20), no qual foi possível observar grande

polimorfismo genético entre os isolados, sugerindo que não há uma relação epidemiológica entre eles. Apenas duas cepas (256b e 392b) de *E. coli* apresentaram o mesmo padrão de bandas, sendo então consideradas como mesmo clone. Essas cepas clones apresentaram resistência a um antimicrobiano, a cefuroxima. Além disso, outras duas cepas (257 e 94c) de *E. coli* apresentaram percentual de identidade acima de 90%, sendo essas sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Figura 4).

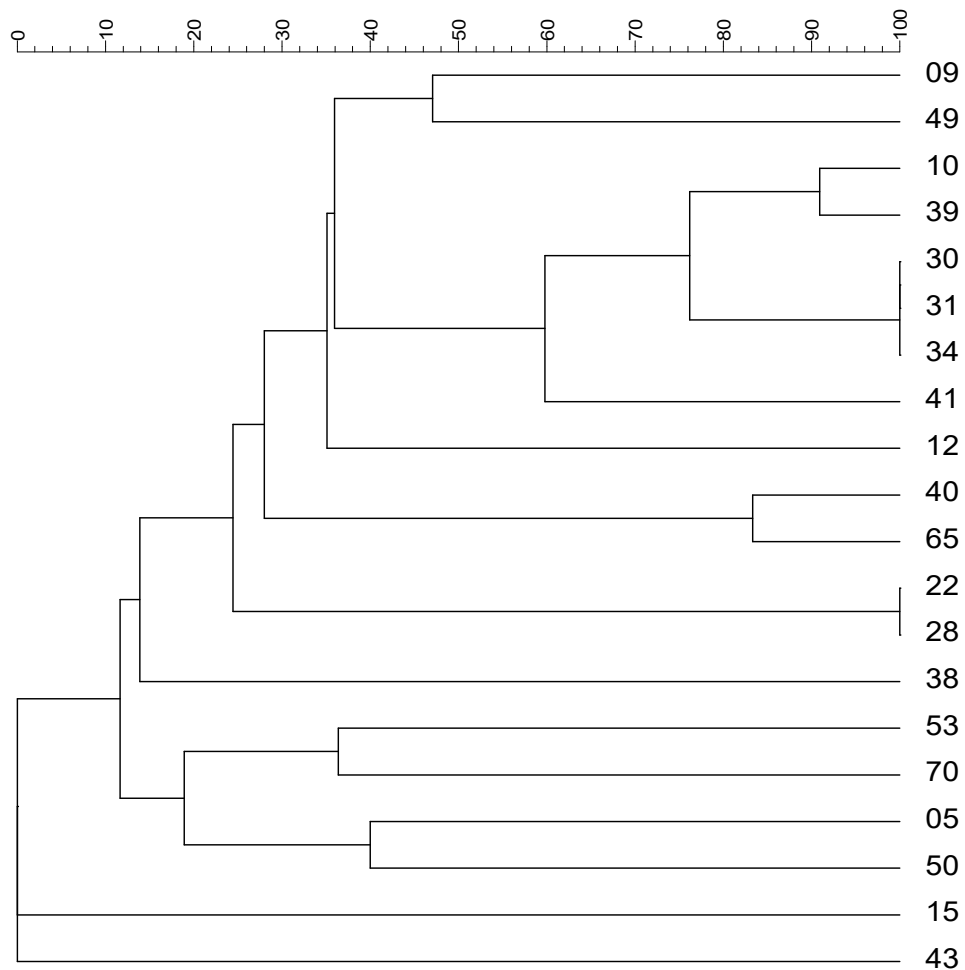
Figura 4 - Relação clonal dos isolados de *E. coli* pela ERIC-PCR



Fonte: (Da autora, 2019).

Em relação ao *S. aureus*, os isolados analisados também mostraram grande diversidade genética, com dois grupos de cepas apresentando o mesmo padrão de bandas, sendo eles o grupo A: 30, 31 e 34; grupo B: 22 e 28. Ambos os grupos apresentaram resistência à benzilpenicilina (penicilina G). Além disso, duas cepas de *S. aureus* (10 e 39) apresentaram percentual de identidade acima de 90%, sendo essas sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Figura 5).

Figura 5 - Relação clonal dos isolados de *S. aureus* pela ERIC-PCR



Fonte: (Da autora, 2020).

4.5 Patogenicidade

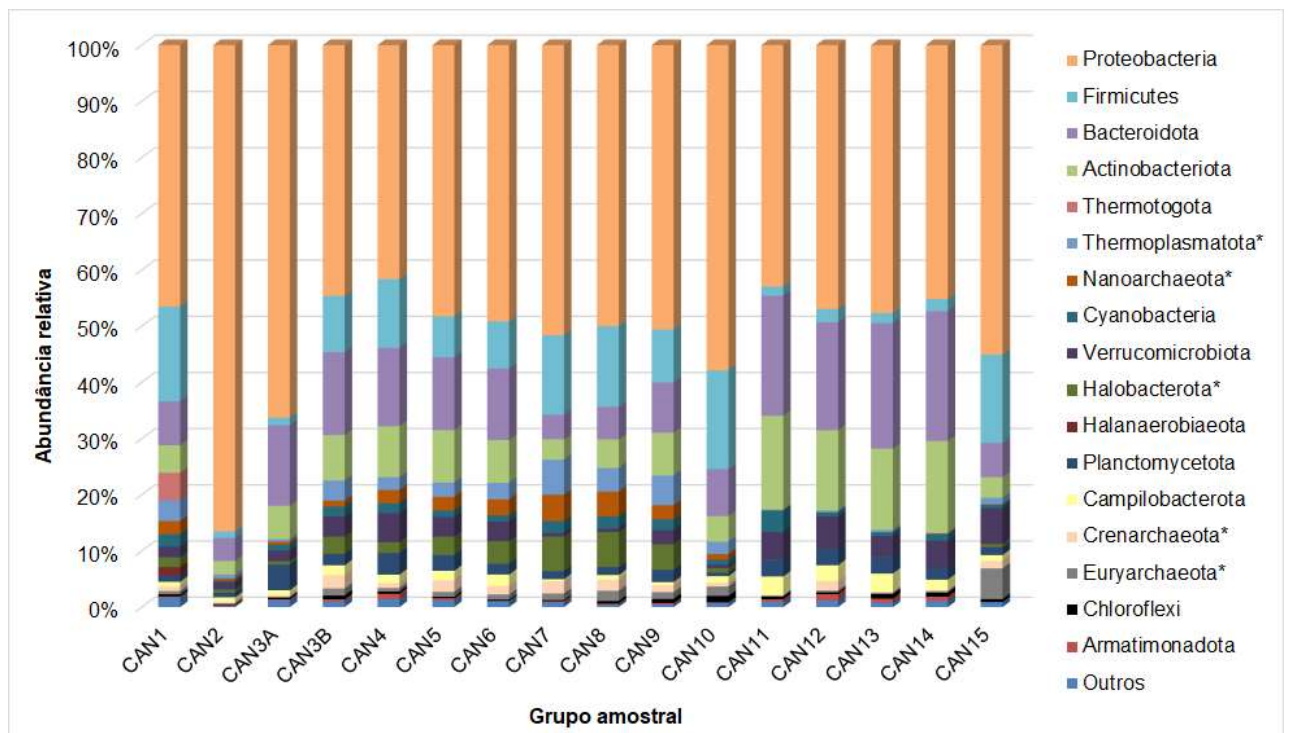
Foi verificada a atividade hemolítica em ágar sangue de todos os 60 isolados de *E. coli*, porém nenhum deles exibiu halo de hemólise ao redor do crescimento das colônias, ou seja, nenhuma apresentou essa patogenicidade. Além disso, esses isolados também foram analisados para verificar a presença de genes marcadores de

virulência (*eae*, *bfpA* e *stx*) característicos do patótipo EPEC e EHEC, mas nenhum apresentou esses genes.

4.6 Análise da composição da comunidade microbiana pela metagenômica

A análise metagenômica da composição da comunidade microbiana dos 16 grupos de amostras revelou que os extratos de *C. sativa* são dominados por organismos dos domínios Bacteria (79,7 a 99,4%) e Archaea (0,6 a 20,3%). Os filos bacterianos mais predominantes encontrados em todos os grupos amostrais foram: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota e Actinobacteriota. Já os filos arqueanos mais predominantes foram: Thermoplasmatota, Crenarchaeota e Euryarchaeota. Os filos microbianos que apresentaram comunidade total menor que 1% em todos os grupos amostrais e aqueles não classificados de acordo com banco de dados se enquadraram na categoria “outros” (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Abundância relativa dos filos microbianos identificados nos extratos medicinais de Cannabis



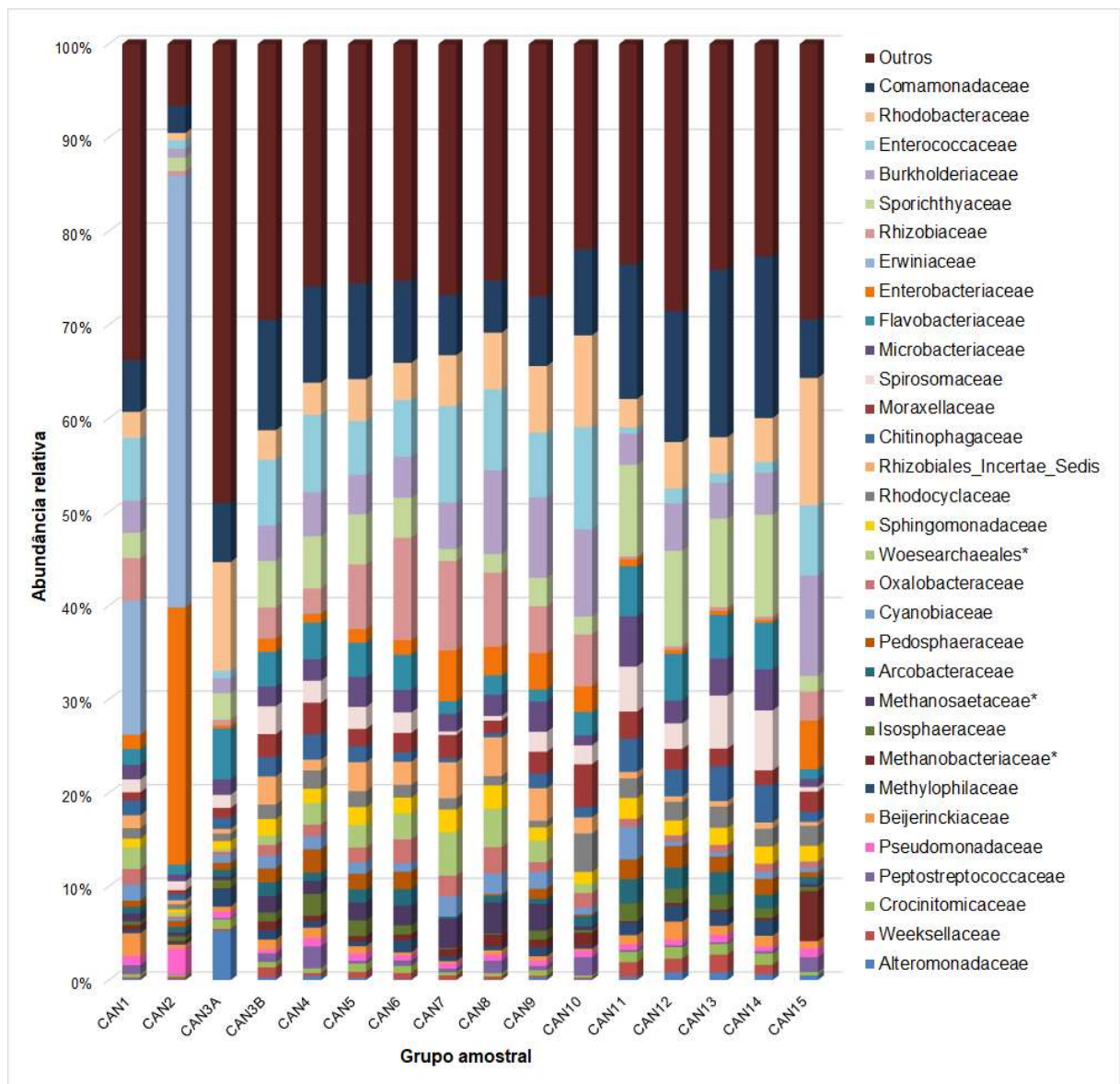
CAN 1-15: grupos amostrais dos extratos de Cannabis

*Filo pertencente ao domínio Archaea

Fonte: (Da autora, 2021).

Diversas famílias microbianas foram identificadas, como pode ser observado no gráfico 4, porém, as famílias que apresentaram comunidade total menor que 10% em todos os grupos amostrais e aqueles não classificados de acordo com banco de dados se enquadraram na categoria “outros”. As famílias mais abundantes foram: *Comamonadaceae*, *Rhodobacteraceae* e *Enterococcaceae*, sendo que no grupo CAN2 as famílias bacterianas mais prevalentes foram *Erwiniaceae* e *Enterobacteriaceae* (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Abundância relativa das famílias microbianas identificadas nos extratos medicinais de Cannabis



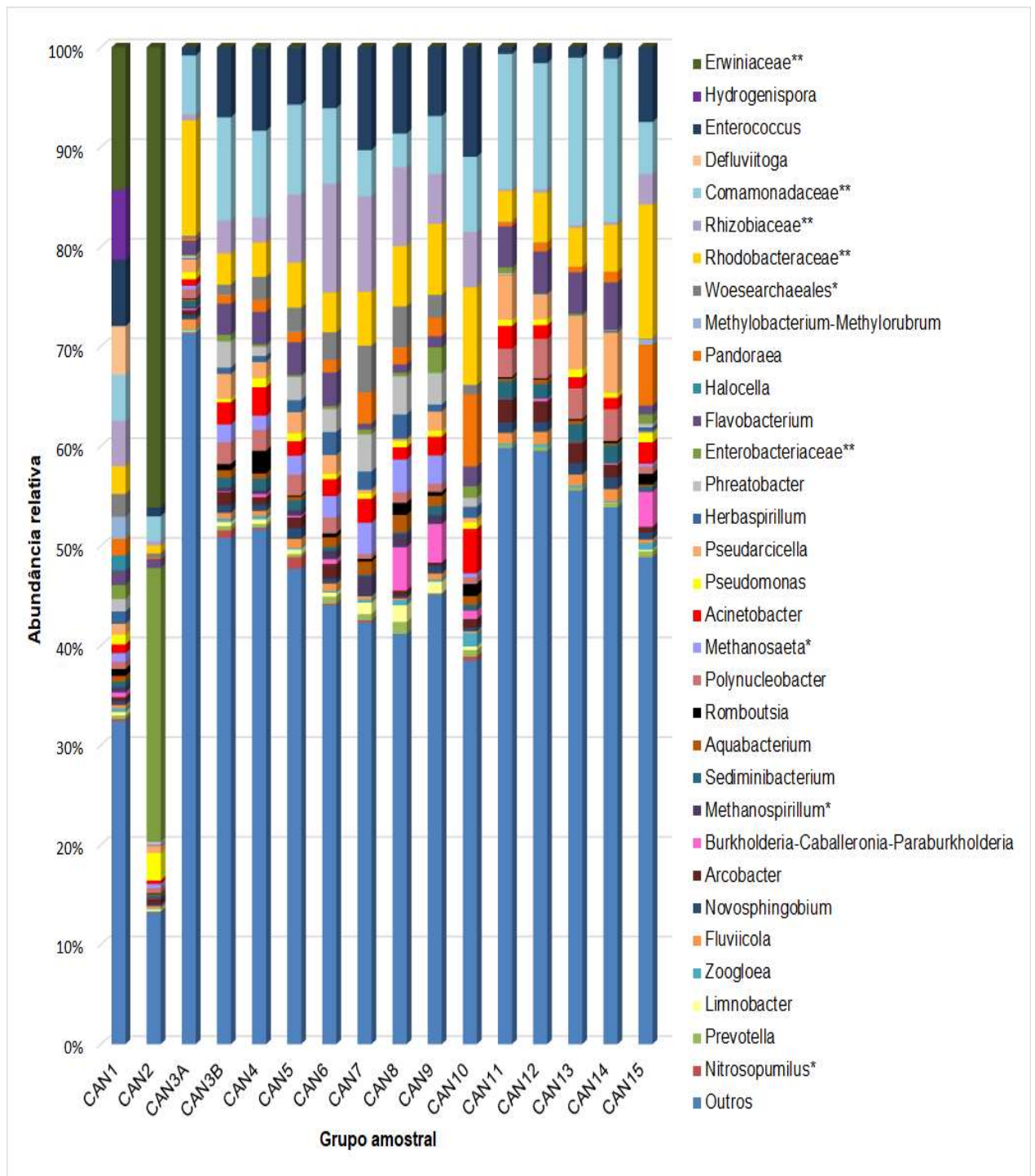
CAN 1-15: grupos amostrais dos extratos de Cannabis

*Família pertencente ao domínio Archaea

Fonte: (Da autora, 2021).

O mesmo pode ser observado no gráfico 5, entretanto, para identificação de gêneros microbianos. Alguns gêneros de Arquea foram identificados em grande quantidade. Gêneros bacterianos que não conseguiram ser identificados apareceram no gráfico apenas a Família, foram elas: *Erwiniaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae* e *Enterobacteriaceae*. Além disso, gêneros que não conseguiram fazer a diferenciação apareceram como dois ou três possíveis gêneros, como foi o caso dos *Methylobacterium-Methylorubrum* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*. Em “outros” foram adicionados gêneros microbianos que apresentaram comunidade total menor que 1% em todos os grupos amostrais e aqueles não classificados de acordo com banco de dados (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Abundância relativa dos gêneros microbianos identificados nos extratos medicinais de Cannabis



CAN 1-15: grupos amostrais dos extratos de Cannabis

*Gênero pertencente ao domínio Archaea

**Gênero não classificado

Fonte: (Da autora, 2021).

5 DISCUSSÃO

A análise microbiológica de extratos de *C. sativa* é essencial para garantir que usuários não sejam expostos a contaminantes prejudiciais à saúde. Embora, para indivíduos saudáveis, alguns contaminantes microbianos são relativamente inofensivos, para pacientes imunocomprometidos podem causar outros tipos de problemas ou até mesmo agravar a doença pré-existente. No presente estudo, algumas mães de pacientes que usaram os extratos *C. sativa* analisados relataram que seus filhos tiveram casos de diarreia e febre alta após consumo dos mesmos, o que pode estar relacionado à infecção microbiana. Além disso, febre e processos infecciosos podem desencadear crises convulsivas em pacientes epiléticos (MARANHÃO *et al.*, 2011).

A contaminação de extratos medicinais de *C. sativa* se dá principalmente por ser um produto preparado de forma artesanal e sem controle microbiológico. No presente estudo foi revelada a contaminação massiva por *E. coli* em amostras de extratos de *C. sativa*, preparados em 2017 e 2018. Vale destacar que esta bactéria é indicadora de contaminação fecal com capacidade de sobrevivência em ambientes distintos do trato gastrointestinal (JORGENSEN; PFALLER, 2015). A segunda espécie bacteriana mais encontrada nessas amostras foi *S. aureus*, um micro-organismo que habita principalmente membranas nasais e pele de animais de sangue quente, causando então infecções de pele e tecidos moles que são transmitidas através de contato direto (KUEHNERT *et al.*, 2005). Os extratos contaminados com essas bactérias foram considerados impróprios para uso, uma vez que a farmacopeia brasileira determina ausência desses micro-organismos em produtos de origem vegetal para uso oral contendo insumo ativo que foi submetido à pré-tratamento, que é o caso dos extratos artesanais de *C. sativa* (FARMACOPEIA ..., 2019).

Um estudo recente identificou e caracterizou 13 bactérias e 30 fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos de plantas de *C. sativa* provenientes de diferentes localizações geográficas. A maioria dos fungos isolados estavam na região apical ou botões laterais (16 isolados), seguidos por folhas (8 isolados) e galhos (6 isolados). O gênero *Penicillium* foi o mais abundante, seguido por *Chaetomium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*. Já na identificação bacteriana por sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA revelou a presença de *Bacillus* como o gênero mais abundante seguido por *Brevibacillus* e cepas não patogênicas de *Mycobacterium* (KUSARI *et al.*,

2017). Em outro estudo, isolados bacterianos endofíticos de raízes e rizosfera de *C. sativa* selvagens revelaram a presença de diversos gêneros como *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Microbacterium* e *Pseudomonas* (AFZAL *et al.*, 2015).

Um dado relevante no presente estudo foi que, embora os extratos de *C. sativa* de 2017-2018 tenham apresentado várias espécies bacterianas, das 30 amostras de extratos de 2019 e 2020, apenas sete (23,3%) apresentaram colonização por bactérias e fungos, sendo três amostras consideradas insatisfatórias por apresentarem contagem de fungos e bactérias Gram-negativas bile tolerantes acima dos limites preconizados pela farmacopeia brasileira. A maioria das amostras apresentou o quantitativo microbiológico dentro dos limites preconizados, porém gera um alerta, uma vez que a multiplicação microbiana se dá em escala exponencial. É importante ressaltar, que a técnica de preparo dos extratos influenciou bastante em relação à carga microbiana viável encontrada nas amostras analisadas. As amostras de extratos de 2017 e 2018 foram preparadas por extração oleosa, já amostras de 2019 e 2020 foram preparadas através de extração alcoólica ou quando preparados em laboratório, utilizou-se equipamentos Soxhlet e Fluido Supercrítico. Essa diferença na carga microbiana observada ao modificar o método de extração, pode evidenciar uma maior eficiência do controle de desenvolvimento de micro-organismos com a nova técnica implantada, uma vez que o álcool possui atividade bactericida.

No presente estudo, foi determinado o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados obtidos, uma vez que a resistência microbiana também pode impactar negativamente o tratamento de pacientes. Os isolados de *E. coli* (n = 60) apresentaram resistência a quatro antimicrobianos: cefuroxima (51,7%), pertence à classe dos β -lactâmicos e subclasse das cefalosporinas de 2ª geração; ciprofloxacino (10%), pertence a classe das quinolonas; tigeciclina (8,3%), pertence a classe da glicilciclina; aztreonam (6,7%) pertence à classe dos β -lactâmicos e subclasse dos monobactâmicos. Com exceção do aztreonam, que apresenta atividade contra a maioria dos bacilos Gram-negativos aeróbicos, os outros três antimicrobianos são de amplo espectro utilizado para o tratamento de patologias causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos sensíveis (HELLINGER; BREWER, 1999).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos ocorre principalmente pela produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) em enterobactérias (ARISTIZÁBAL-

HOYOS *et al.*, 2019). Já as quinolonas são amplamente utilizadas para tratar infecções causadas por *E. coli*. O uso extensivo dessa classe levou ao aumento da resistência em *E. coli* mediada por modificação do alvo e as mudanças na permeabilidade da membrana. Além disso, os genes *qnr* mediados por plasmídeo também podem facilitar a resistência, com os grupos *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* como os principais determinantes (DÜZGÜN *et al.*, 2019). Recentemente, um novo mecanismo enzimático de resistência à tigeciclina mediado por plasmídeo, Tet (X), foi relatado em *E. coli* na China (SUN *et al.*, 2019).

Em relação aos isolados de *S. aureus* (n = 20), oito apresentaram resistência à benzilpenicilina (penicilina G), antimicrobiano utilizado para tratar infecção causada por bactérias Gram-positivas, mas também em alguns casos por bactérias Gram-negativas como *Neisseria* spp. A benzilpenicilina apresenta maior atividade antimicrobiana entre as penicilinas e é a única penicilina natural usada na área clínica (GALVÃO, 2014). *Staphylococcus aureus* está entre os patógenos mais comuns de seres humanos e é o principal patógeno implicado em infecções de pele e tecidos moles. Há relatos de produção da enzima penicilinase em *S. aureus* que confere resistência a benzilpenicilina, uma vez que essa enzima é capaz de hidrolisar e inativar esse antimicrobiano (KANG *et al.*, 2020).

Todos os isolados de *E. coli* e *S. aureus* obtidos no presente estudo foram analisados em relação à similaridade genética entre os isolados. Em relação aos isolados de *E. coli*, duas cepas apresentaram-se com 100% de similaridade, indicando serem o mesmo clone, e outras duas cepas apresentaram percentual de identidade acima de 90%. Os outros 56 isolados apresentaram perfil de similaridade abaixo de 90%, ou seja, apresentaram alta variabilidade genética. O resultado da tipificação dos 20 isolados de *S. aureus* não foi muito diferente dos de *E. coli*. Dois grupos de cepas apresentaram o mesmo padrão de bandas, com 100% de similaridade, além disso, duas cepas apresentaram percentual de identidade acima de 90%. O restante dos isolados apresentaram perfil de similaridade abaixo de 90%, com alta variabilidade genética.

A grande variabilidade genética entre as bactérias observada nesse estudo já era esperada, uma vez que os micro-organismos foram isolados de diferentes amostras provenientes de locais distintos. Por outro lado, um estudo realizado por Ibenyassine e colaboradores (2006), mostrou alta similaridade de perfis de bandas através da ERIC-PCR, entre as cepas de *E. coli* isoladas de amostras de vegetais,

solo e água obtidas de uma mesma área de plantação em Marrocos, sugerindo que as mesmas cepas persistiram durante períodos muito longos.

No presente estudo, a análise metagenômica dos extratos de *C. sativa*, dentre os 16 grupos amostrais analisados, todos seguiram um padrão de comunidade microbiológica, com exceção dos grupos CAN1 e CAN2. No grupo CAN1 estavam compreendidas seis amostras de extratos de Cannabis provenientes de uma mesma ONG e produzidos pela técnica de extração oleosa. Ao realizar análise de pesquisa nessas seis amostras, foram isolados dois micro-organismos, sendo eles *S. aureus* e *B. circulans*. Entretanto, quando esse conjunto de amostras foi analisado pela metagenômica, diversos gêneros bacterianos foram identificados, como por exemplo, *Hydrogenispora* e *Enterococcus*, além de bactérias da família *Erwiniaceae* que ainda não foram classificadas no banco de dados.

Hydrogenispora sp. é uma bactéria anaeróbia, formadora de esporos, termofílica, co-produtora de etanol-hidrogênio, pertencente ao filo Firmicutes e já foi isolado de amostra ambiental de lodo anaeróbico (LIU *et al.*, 2014) e de cultivares de espécie arroz (*Oryza sativa* L.) (KUNDA; DHALA; MUKHERJEE, 2018). Já *Enterococcus* sp. é a principal causa de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS) em todo o mundo, em particular do trato urinário, tecidos moles e infecções associadas ao uso de dispositivos invasivos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Assim como *Hydrogenispora* sp., *Enterococcus* sp. também é uma bactéria termofílica, o que pode ter facilitado para o desenvolvimento dessas bactérias nos extratos de Cannabis, uma vez que estes são submetidos a temperaturas elevadas no momento da preparação.

No grupo CAN2, estava compreendida apenas uma amostra de extrato de Cannabis que foi proveniente da mesma ONG do grupo CAN1, porém esse extrato foi preparado utilizando a técnica da extração oleosa combinada com adição de álcool e não apresentou crescimento bacteriano. Porém, quando analisado pela metagenômica, diversas bactérias foram identificadas, principalmente pertencentes à família *Erwiniaceae* e *Enterobacteriaceae*. A família *Erwiniaceae* contém muitas espécies de importância agrícola e clínica e a *Enterobacteriaceae* é uma família de bactérias que comumente causam infecções em estabelecimentos de saúde, bem como na comunidade (JACOB *et al.*, 2013; MARIKE *et al.*, 2018). Já no estudo desenvolvido por Mckernan e colaboradores (2016), observou-se uma variedade de potenciais patógenos humanos, utilizando análise metagenômica, incluindo

Acinetobacter baumannii, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*, *Salmonella enterica*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Clostridium botulinum*, em flores de plantas medicinais de cannabis cultivadas em instalações internas nos EUA.

No presente estudo também foi observado, através da metagenômica, alta abundância relativa do filo Proteobacteria em todos os grupos amostrais. Um dos maiores filios do domínio Bacteria, composto por bactérias Gram-negativas, apresenta uma grande diversidade metabólica e morfológica, com aproximadamente 528 gêneros já descritos (GARRITY *et al.*, 2004). Compreende uma grande variedade de agentes patogênicos, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio* e *Helicobacter* (MADIGAN; MARTINKO, 2005).

As famílias bacterianas mais abundantes nas amostras de extratos de Cannabis identificadas, conseqüentemente, pertencem ao filo Proteobacteria. Algumas dessas famílias incluem patógenos vegetais ou aqueles que apenas habitam ambientes aquáticos e/ou solo, como *Rhodobacteraceae*, *Erwiniaceae* e *Rhizobiaceae*; porém, outras famílias estão associadas com patógenos de seres humanos, como *Enterobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Burkholderiaceae* e *Moraxellaceae* (GARRITY *et al.*, 2004).

Um estudo realizado na Indonésia obteve 16 isolados de bactérias endofíticas de oito espécies de plantas medicinais (*Annona muricata*, *Artocarpus altilis*, *Brucea javanica*, *Citrus aurantifolia*, *Cheilocostus speciosus*, *Manilkara zapota*, *Morinda citrifolia* e *Tinospora crispa*). A identificação dos 16 isolados mostrou que Firmicutes foi o filo dominante (64,3%), seguido por Proteobacteria (28,6%) e Actinobacteria (7,1%). O filo Firmicutes consistiu em *Bacillus indicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*; filo Proteobacteria consistiu em *Pantoea agglomerantes*, *Pantoea stewartii*, *Pseudomonas oryzihabitans*, e *Pseudomonas psychrotolerans*; e o filo Actinobacteria consistiu em *Kocuria kristinae* (ZAM *et al.*, 2019).

Com os resultados obtidos pela metagenômica foi possível revelar a presença de bactérias cultiváveis e, principalmente, não cultiváveis em laboratório, além de fornecer uma visão da comunidade microbiana sem o viés da cultura. A semelhança entre o gene *rrs* do 16S rRNA pode apresentar algumas limitações na diferenciação entre espécies, mas em nível de gênero pode-se ter uma noção mais acurada das comunidades bacterianas colonizando aquelas amostras e sua abundância relativa em cada grupo amostral.

Além de bactérias, também foi possível identificar algumas arqueas presentes nos extratos de *C. sativa* através da metagenômica. As arqueas são organismos procariontes e diferenciam-se das bactérias principalmente pelo fato de suas paredes celulares não apresentarem peptidoglicanas. A maioria das arqueas são autotróficas quimiossintetizantes e essa característica permite que elas vivam em locais extremos, como por exemplo com alta temperatura ou acidez, assim como em ambientes comuns como solo e água, o que pode justificar sua presença nesses produtos (FORTERRE; BROCHIER; PHILIPPE, 2002).

Um estudo desenvolvido por Yadav e colaboradores (2017) demonstrou que algumas bactérias, fungos e arqueas podem atuar como promotores de crescimento de plantas, sendo uma ferramenta promissora e importante para a agricultura sustentável. O estudo da biodiversidade microbiana em plantas revelou a presença de arqueas pertencentes ao filo Euryarchaeota, o mesmo filo também encontrado no presente estudo em amostras de extratos de *C. sativa*.

Contaminantes microbiológicos representam uma ameaça potencial para os consumidores de extratos de Cannabis. Mesmo organismos mortos podem desencadear alergias e asma. Desta forma, a análise metagenômica aqui realizada foi capaz de quantificar e identificar com precisão um amplo espectro de microorganismos presentes nos extratos de *C. sativa*. Além disso, foi verificada significativa diferença na recuperação de bactérias viáveis nos extratos, de acordo com as técnicas de extração empregadas. Com isso, concluímos que o uso da abordagem molecular associada a análise microbiológica nos permitiu conhecer melhor a comunidade microbiana dos extratos de *C. sativa* e avaliar possíveis danos aos pacientes.

6 CONCLUSÃO

- Todos os 60 isolados de *E. coli* e 20 isolados de *S. aureus* em amostras de extratos de *C. sativa* foram confirmados na análise molecular;
- Alguns isolados de *E. coli* e *S. aureus* apresentaram resistência antimicrobiana. Extratos de Cannabis contaminados com micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos podem agravar ainda mais o estado de saúde do paciente e dificultar o tratamento;
- A tipificação dos isolados de *E. coli* e *S. aureus* através da ERIC-PCR apresentou grande variabilidade genética, visto que são isolados provenientes de amostras distintas;
- Os isolados de *E. coli* não apresentaram patogenicidade em relação aos genes marcadores de virulência (*eae*, *bfpA* e *stx*) característicos de EPEC e EHEC, e, além disso, não apresentaram atividade hemolítica. Por serem isolados de amostras provenientes de planta, não há muita pressão seletiva que justifique o desenvolvimento dessas patogenicidades;
- A contagem e identificação fenotípica de micro-organismos nas 30 amostras recebidas em 2019 e 2020 revelou uma queda da carga microbiana viável presente nos extratos artesanais, indicando uma possível influência da nova técnica (extração alcoólica) orientada;
- A avaliação da composição da comunidade microbiana pela abordagem metagenômica gerou dados significativamente superiores àqueles obtidos pela abordagem microbiológica, apresentando como gênero mais abundante *Enterococcus*. O que reforça a importância da utilização de diferentes abordagens na pesquisa de comunidades microbianas;
- Os extratos artesanais de *C. sativa* requerem uma atenção maior em relação à qualidade microbiológica, uma vez que são utilizados por pessoas imunocomprometidas. Os cuidados devem ocorrer desde a etapa do plantio até a extração e posteriormente armazenamento, a fim de evitar contaminação microbiana, diminuir riscos à saúde dos pacientes e garantir qualidade, segurança e eficácia do produto.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. *et al.* Structure of cannabidiol, a product isolated from the marijuana extract of Minnesota wild hemp. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 01, p. 196-200, jan.1940.

ADZITEY, F.; HUDA, N.; ALI, G. R. R. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. **3 Biotech**, v. 3, n. 2, p. 97-107, jun. 2013.

AFZAL, I.; SHINWARI, Z.K.; IQRAR, I. Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. **Pak. J. Bot.**, v. 47, n. 5, p. 1999–2008, 2015.

ALI, E. M. M. *et al.* Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L. **Chinese Medicine**, v. 03, n. 01, p.61-64, 2012.

ALVARENGA, K. G. de *et al.* 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. **Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiology**, Porto Alegre, v. 13, n. 02, p. 71-74, maio 2007.

ANDREWS, S. *et al.* FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.

ANVISA. Consulta Pública nº 654, de 13 de junho de 2019. Dispõe sobre o procedimento específico para registro e monitoramento de medicamentos à base de *Cannabis* spp., seus derivados e análogos sintéticos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 17 junho 2019

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Consulta Pública nº 655, de 13 de junho de 2019**. Proposta de Requisitos técnicos e administrativos para o cultivo da planta *Cannabis* spp. para fins medicinais e científicos, e dá outras providências. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 17 junho 2019

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Maconha**: Anvisa não é contra uso para fins medicinais. Brasília: ANVISA, 2017. Nota Técnica da Anvisa explica regulamentação do uso medicinal de derivados da maconha e a possibilidade de plantio de Cannabis sativa. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/maconha-anvisa-nao-e-contra-uso-para-fins-medicinais>. Acesso em: 18 maio 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Nota Técnica nº 01/2017/GMESP/GGMED**. Esclarecimentos a respeito do registro do medicamento Mevatyl. Processo nº 25351.738074/2014-41. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351923/NT++01+-+2017+-+Mevatyl.pdf/4e02e67a-34b6-48d6-9c34-d0aa4a5dd1fd>. Acesso em: 05 nov. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC Nº 3, DE 26 DE JANEIRO DE 2015**. 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. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32132854/do1-2015-01-28-resolucao-rdc-n-3-de-26-de-janeiro-de-2015-32132677. Acesso em: 15 out. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC Nº 17, de 06 de maio de 2015**. Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinoides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2015/rdc0017_06_05_2015.pdf. Acesso em: 16 out. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC Nº 66, de 18 de março de 2016**. 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. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=317687>. Acesso em: 16 out. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC Nº 130, de 2 de dezembro de 2016**. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=05/12/2016&jornal=1&pagina=33&totalArquivos=64>. Acesso em: 16 out. 2018.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019**. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-dadiretoria-colegiada-rdc-n-327-de-9-de-dezembro-de-2019-232669072> Acesso em: 19 dez. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **RDC nº 335, 24 de janeiro de 2020**. 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. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-335-de-24-de-janeiro-de-2020-239866072>. Acesso em: 22 fev. 2021.

APPENDINO, G. *et al.* Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A Structure–Activity Study. **Journal Of Natural Products**, v. 71, n. 8, p.1427-1430, ago. 2008.

ARISTIZÁBAL-HOYOS, A. M. *et al.* High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Management**, v. 245, p. 37–47, may 2019.

BAUM, H. V.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 503-511, oct. 2005.

BEJ, K.A. *et al.* Detection of *Escherichia coli* and Shigella In Water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. **Applied and environmental microbiology**, v.57, n.4, p.1013-1017, 1991.

BHANDARE, S. The Microbiological testing regulations for cannabis products in Canada: are they enough from food safety and public health point of view? **Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene**, v. 5, p. 143. 2020.

BLAIR, A. M. J. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p.42– 5, 2015.

BLAKE, D. R. *et al.* Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 45, n. 1, p.50-52, jan. 2006.

BREVES, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e vancomicina (VRSA) em profissionais da saúde e artigos médicos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 51, n. 3, p.143-152, jun. 2015.

BRYAN, A.; YOUNGSTER, I.; MCADAM, A.J. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 247-272. 2015.

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

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335–336, apr. 2010.

CARMO, J. S. **Avaliação da qualidade microbiológica das flores e dos extratos medicinais de *Cannabis sativa***. 2019. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

- CARVALHO, V. M.; BRITO, M.; GANDRA, M. Mães pela cannabis medicinal em um Brasil aterrorizado entre luzes e fantasmas. **Forum sociológico**, n. 30, p. 57- 66, dez. 2017.
- CARVALHO, V. M. *et al.* Quantificação de canabinoides em extratos medicinais de cannabis por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 90-97, mar. 2020.
- CASAREZ, E. A.; PILLAI, S. D.; GIOVANNI, G. D. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. **Water research**, v. 41, n. 16, p. 3643-3648, may 2007.
- CEBULA T. A., PAYNE, W. L., FENG, P. Simultaneous Identification of Strains of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Their Shiga-Like Toxin Type by Mismatch Amplification Mutation Assay-Multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 248–250, jan. 1995.
- CHILE. FUNDACIÓN DAYA. Disponível em: <http://www.fundaciondaya.org/>. Acesso em: 08 nov. 2019.
- CHILE. MINISTERIO DE SALUD. **Decreto N° 84, de 30 de outubro de 2015**. Disponível em: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/decreto_84_15_sp.pdf. Acesso em: 08 nov. 2019.
- CHUNG, Y. *et al.* Usefulness of Multiplex Real-Time PCR for Simultaneous Pathogen Detection and Resistance Profiling of Staphylococcal Bacteremia. **BioMed Research International**, Article ID 6913860, p. 1-7, jun. 2016.
- COLÔMBIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE E PROTEÇÃO SOCIAL. **Decreto nº 2467, de 22 de dezembro de 2015**. (2015). Disponível em: <http://wp.presidencia.gov.co/sitios/normativa/decretos/2015/Decretos2015/DECRET O%202467%20DEL%2022%20DE%20DICIEMBRE%20DE%202015.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2019.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (Brasil). **RESOLUÇÃO CFM N° 2.113, de 16 de dezembro de 2014**. Aprova o uso compassivo do canabidiol para o tratamento de epilepsias da criança e do adolescente refratárias aos tratamentos convencionais. Disponível em: http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/CFM/2014/2113_2014.pdf. Acesso em: 15 out. 2018.
- COSTA, T. M. *et al.* Características clínicas e Esquema de Tratamento medicamentoso de Infecções por *Staphylococcus aureus*: uma possível proposta de identificação para o laboratorista e tratamento para o clínico. **Revistapraxis**, v. 3, n. 5, 2011.
- D’COSTA, V. M. *et al.* Sampling the antibiotic resistome. **Science**, New York, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 2006.
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

DÜZGÜN, A. Ö. *et al.* Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from Turkish patients with urinary tract infection. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 52, p. 1-5, jun. 2019.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance in Bacteria. **Food Technol Biotechnol**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

ECKERT, C. *et al.* Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.48, p. 1249-1255,2004.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.

EUROPA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Orphan maintenance assessment report**. EMA, 2019. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-maintenance-report/epidyolex-orphan-maintenance-assessment-report-initial-authorisation_en.pdf. Acesso em: 06 nov. 2019.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. 1 v.

FERNANDEZ, L.; BREIDENSTEIN, E. B.; HANCOK, R. E. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug Resist Updat**, v.14, n.1, p.1-21. 2011.

FERNANDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **ClinMicrobiol Ver**, v.25, n.4, p.661-681, 2012.

FLORES, C. *et al.* Detecção de genes de resistência a antimicrobianos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases e carbapenemases por culturas de vigilância de pacientes em uma unidade de terapia intensiva no Rio de Janeiro, Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 52, n. 5, p. 284-292, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy**. EUA: FDA, 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms>. Acesso em: 06 nov. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD)**. EUA: FDA, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd#dietarysupplements>. Acesso em: 06 nov. 2019.

FOGAÇA, M. V. *et al.* Effects of intra-prelimbic pré-frontal córtex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous

stressful experience. **European Neuropsychopharmacology**, Ribeirão Preto, p. 410-419, jan. 2014.

FORTERRE, P.; BROCHIER, C.; PHILIPPE, H. Evolution of the Archaea. **Theoretical population biology**, v. 61, n. 4, p. 409-422, feb. 2002.

GALVÃO, T. Segurança da Benzilpenicilina benzatina na atenção básica em saúde. **Boletim farmacoterapêutico**, jan. 2014

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1-28, apr. 2019.

GARRITY G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag. 2004.

GONZALEZ, A. M. *et al.* Diversity of bacterial communities related to the nitrogen cycle in a coastal tropical bay. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3401-3407, apr. 2012.

GREENCAMP. **14 best cbd strains for anxiety**. 2019. Disponível em: <https://greencamp.com/marijuana-for-anxiety/>. Acesso em: 28 out. 2019.

GUNZBURG, S.T.; TORNIEPORT, N.G.; RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1375-1377, may 1995.

HELLINGER, W. C.; BREWER, N. S. Carbapenems and Monobactams: Imipenem, Meropenem, and Aztreonam. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 4, p. 420-434, Apr. 1999.

HONÓRIO, K. M. *et al.* Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 318-325, 2006.

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

IBENYASSINE, K. *et al.* Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated irrigation water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 528-533, sep. 2006.

ISRAEL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. Disponível em: https://www.health.gov.il/English/Topics/cannabis/patients_and_physicians/Pages/default.aspx. Acesso em: 31 mar. 2020.

IUVONE, T. *et al.* Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on b-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. **Journal Of Neurochemistry**, v. 89, n. 01, p. 134-141, mar. 2004.

JABOB, J. T. *et al.* Vital Signs: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 62, n. 09, p. 165-170, mar. 2013.

JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. More extended spectrum β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 35, p. 1697-1704, sept. 1991.

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

KANG, J. W. *et al.* Rapid Determination of Benzylpenicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Bacteraemia Model. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1601–1606, jun. 2020.

KOZICH, J. J. *et al.* Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p.5112-5120, jun. 2013.

KUEHNERT, M. J. *et al.* Methicillin-resistant– *Staphylococcus aureus* Hospitalizations, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 868-872, jun. 2005.

KUHNERT, P.; BOERLIN P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.

KUNDA, P.; DHAL, P. K.; MUKHERJEE, A. Endophytic bacterial community of rice (*Oryza sativa* L.) from coastal saline zone of West Bengal: 16S rRNA gene based metagenomics approach. **Meta Gene**, v. 18, p. 79-86. aug. 2018.

KUSARI, P. *et al.* Cannabis Endophytes and Their Application in Breeding and Physiological Fitness. In S Chandra, H Lata, MA ElSohly (Eds.), **Cannabis sativa L- Botany and Biotechnology**, p. 419-437, 2017.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471-1485, jul.2005.

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

LIU, Y. *et al.* *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1756–1762, may 2014.

LOUKIADIS, E. *et al.* Characterization of Shiga Toxin Gene (stx)- Positive and Intimin Gene (eae)-Positive Escherichia coli Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3245-3251.2006.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. (ed.). **Brock Biology of Microorganisms**. 11th ed. [S.l.]: Prentice Hall, 2005.

MARANHÃO, M. V. M.; GOMES, E. A.; CARVALHO, P. E. Epilepsia e Anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, mar, 2011.

MARCHETTI, R.L. *et al.* Transtornos mentais associados à epilepsia. **Rev. Psiq. Clín**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 170-182, jun. 2005.

MARIKE, P. *et al.* Mixta gen. nov., a new genus in the Erwiniaceae. **Microbiology and Plant Pathology**, p. 1-23, 2018.

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

MARINI, E. *et al.* Attenuation of Listeria monocytogenes virulence by Cannabis sativa L. essential oil. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 8, p. 293. 2018.

MCCALL, C. Momentum grows for medical use of cannabis. **World Report**, v. 386, n. 10004, p. 1615-1616, oct. 2015.

MCKERNAN, K. *et al.* Metagenomic analysis of medicinal Cannabis samples; pathogenic bacteria, toxigenic fungi, and beneficial microbes grow in culture-based yeast and mold tests. **F1000Research**, v. 5, n. 2471, p. 1-20, oct. 2016.

MCKERNAN, K. *et al.* Microbiological examination of nonsterile cannabis products: molecular microbial enumeration tests and the limitation of colony forming units. (Charlottesville, VA: OSF). 2018.

MCPARTLAND, J. M.; MCKERNAN, K. J. Contaminants of Concern in Cannabis: Microbes, Heavy Metals and Pesticides. Cannabis Sativa L. **Botany and Biotechnology**, p. 457-474. 2017.

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

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

MECHOULAM, R.; SHVO Y.; Hashish: The structure of cannabidiol. **Tetrahedron Rehovoth**, Israel, v. 19, p. 2073-2078, may1963.

MONTENEGRO, D. *et al.* Uncovering potential 'herbal probiotics' in Juzen-taiho-to through the study of associated bacterial populations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 466-469, fev. 2015.

MONTOYA, Z. *et al.* Cannabis Contaminants Limit Pharmacological Use of Cannabidiol. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1439, 2020.

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

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: D9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and D9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, Aberdeen, Reino Unido, v. 153, n. 02, p. 199-215, jan. 2008.

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

QUEIROZ, R. *et al.* Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Rev Bras Clin Med**, São Paulo, v.10, n.2, p. 132-138, abr. 2012.

REID, S.D.; BETTING, D.J.; WHITTAM, T.S. Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic Escherichia coli by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2719-2722, mar. 1999.

RIESENFELD, C. S. *et al.* METAGENOMICS: genomic analysis of microbial communities. **Annu. Rev. Genet.** v. 38, p. 525-552, dec. 2004.

ROBSON, P. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, n. 02, p. 107-115, fev. 2001.

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

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

SANTOS, A. L. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **TextoContexto –Enferm.**, Florianópolis, v. 13, n. spe, p. 64-70, fev. 2004.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 73-89, 2012.

- SILBERT, S. *et al.* Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.47, n.4, p.619-21, dec. 2003.
- SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223-229, feb.2013.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492-498, oct.2004.
- SUN, J. *et al.* Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1457–1464, jun. 2019.
- SZAFLARSKI, J. P.; BEBIN, E. M.; Cannabis, cannabidiol and epilepsy – From receptors to clinical response. **Epilepsy&Behavior**. Alabama, EUA. v. 41, p. 277-282, dec. 2014.
- TAKAHASHI, E. *et al.* Properties of Hemolysin and Protease Produced by *Aeromonas trota*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p.1-8, mar. 2014.
- TEIXEIRA, J. P. *et al.* Uso de PCR Duplex para detecção dos genes femA e mecA e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 272-279, sep. 2014.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, jun. 2006.
- TRINDADE, P. A. *et al.* Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 32-43, feb. 2003.
- TSAI, H. *et al.* Multidrug-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a subtropical river contaminated by nearby livestock industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110724, may 2020.
- TURQUE, A. S. *et al.* Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. **PLoSOne**, v. 5, n.12, p. 1-10, dec. 2010.
- UNODC. **World drug report**. jun. 2019. Disponível em: https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19_Booklet_5_CANNABIS_HALLUCINOGENS.pdf. Acesso em: 26 mar. 2020.
- URUGUAI. **Lei nº 19.172: Marihuana y sus derivados, 10 de dezembro de 2013**. Disponível em: http://www.correo.com.uy/otrosdocumentos/pdf/Ley_19.172.pdf. Acesso em: 06 nov. 2019.
- VAN BELKUM, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. s3, p. 1-46, oct. 2007.

VAN DUIN, D.; PATERSON, D. L. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 30, n. 2, p. 377–390, 2016.

VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, dec. 1991.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 4, p. 1787-1789, dec.2004.

WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genotyping of Campylobacter spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, jan. 2000.

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

YADAV, A. N. *et al.* Plant microbiomes and its beneficial multifunctional plant growth promoting attributes. **Int J Environ Sci Nat Resour**, v. 3, n. 1, p. 1-8, jun. 2017.

ZAM, S. I. *et al.* The diversity of endophytic bacteria from the traditional medicinal plants leaves that have anti-phytopathogens activity. **Journal of Tropical Life Science**, v. 9, n. 1, p. 53-63, 2019.

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

ZUARDI, A. W. *et al.* Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 421-429, apr. 2006.

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

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C. *Cannabis sativa*: a planta que pode produzir efeitos indesejáveis e também tratá-los. [editorial]. **Rev. bras. Psiquiatria**, São Paulo, v. 32, n. s1, p. 51-52, maio 2010.