

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Adna Rafaella Barbosa de Souza

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE DERIVADOS E ANÁLOGOS
DO CANABIDIOL**

Belo Horizonte

2023

Adna Rafaella Barbosa de Souza

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE DERIVADOS E ANÁLOGOS
DO CANABIDIOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira

Coorientadora: Dra. Janete Soares Coelho dos Santos

Belo Horizonte

2023

S729i

Souza, Adna Rafaella Barbosa de.

Investigação do potencial biológico de derivados e análogos do canabidiol [recurso eletrônico] / Adna Rafaella Barbosa de Souza. – 2023.

1 recurso eletrônico (136 f. : il.) : pdf

Orientadora: Renata Barbosa de Oliveira.

Coorientadora: Janete Soares Coelho dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Cannabis – Teses. 2. Canabidiol – Teses. 3. Antioxidantes – Teses. 4. Anti-inflamatórios – Teses. 5. Antineoplásicos – Teses. 6. Antinocicepção – Teses. I. Oliveira, Renata Barbosa de. II. Santos, Janete Soares Coelho dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.19



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA ADNA RAFAELLA BARBOSA DE SOUZA

Realizou-se, no dia 28 de abril de 2023, às 14:00 horas, na sala 3062, da Faculdade de Farmácia, a 389ª defesa de dissertação, intitulada INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE DERIVADOS E ANÁLOGOS DO CANABIDIOL, apresentada por ADNA RAFAELLA BARBOSA DE SOUZA, número de registro 2020658830, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Renata Barbosa de Oliveira - Orientadora (UFMG), Dr(a). Janete Soares Coelho dos Santos (FUNED), Dr(a). Luciana Maria Silva Lopes (FUNED), Prof(a). Caryne Margotto Bertollo (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 28 de abril de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Barbosa de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caryne Margotto Bertollo, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2023, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janete Soares Coelho dos Santos, Usuária Externa**, em 05/05/2023, às 10:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 15/05/2023, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2211770 e o código CRC 6B187116.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos aqueles que vieram antes de mim e sonharam para que eu pudesse chegar aqui, sem o suor, as lágrimas, a dor e o amor de vocês eu provavelmente não estaria aqui. Eu sou porque nós somos. Ubuntu!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu pai por ter sido um grande encorajador e tamanho suporte na minha vida acadêmica. À minha mãe que desde muito nova me ensinou o sabor e a delícia de estudar. Vocês dois são os pilares de quem eu sou, o que eu conquistei e minha caminhada. A minha irmã Rízia que me ouviu e acolheu em todos os momentos em que não me sentia capaz de continuar, te amo “my little pony”. A outra irmã, Rhuama, me ensinou que tudo pode ser bem bonito, muito obrigada por isso. E ao meu sobrinho Cauê que só é muito fofo mesmo.

Agradeço também a minha esposa, Natália, que desde o primeiro dia dessa jornada esteve comigo. Você foi a primeira pessoa a saber quando eu passei no mestrado, naquela época tinha medo de considerar a gente um casal, mas que bom foi você. Que bom que é você aqui comigo agora no final, como minha esposa. Espero que o universo entenda que é a primeira de tantas conquistas segurando sua mão, porque “we belong to you and me” e eu te amo pra sempre.

Agradeço tanto a Janiele, minha psicóloga, que se eu cheguei até aqui essa mulher veio me chutando a maior parte do caminho, num ótimo sentido, considerando que eu estava deitada em posição fetal a maior parte do processo. Brincadeiras a parte, você foi crucial para que eu conseguisse finalizar o mestrado e me visse pertencente a esse lugar que estou hoje.

Ao meu braço, Nicolas, você é essencial, não posso te perder de vista, porque eu me vejo em você. Ao meu ursinho, Ohana, você nunca me deixou esquecer o que eu consigo fazer e comemorar minhas conquistas comigo, isso foi crucial miga. Também agradeço a minha amiga lésbica biomédica, Bárbara, essa conquista é nossa por sobreviver aquele inferno de faculdade, os TCCs e caminhar tão longe.

Agradeço também aos técnicos de laboratório, auxiliares, porteiros, responsáveis pela limpeza, as profissionais que trabalharam tanto no bandeirão, quanto no refeitório da Funed, vocês são os pilares desses lugares e quem realmente faz tudo acontecer. A professora Renata obrigada pela paciência, sinto que aprendemos muito uma com a outra. Agradeço a Janete pela disposição e suporte, desde que nos conhecemos me senti confortável com você. Aos pesquisadores que me auxiliaram na execução dos ensaios antioxidantes, nociceptivo,

anti-inflamatório e antitumoral. Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro dedicado ao projeto.

Por último, gostaria de parafrasear o um discurso do Snoop Dog, de quando recebeu sua estrela na calçada da fama em Hollywood. Eu agradeço a mim mesma por acreditar em mim, por fazer todo trabalho duro, por não ter tirado folgas, por nunca desistir, por dar mais do que eu recebi e mesmo assim continuar dando, por tentar fazer mais o certo que o errado. Agradeço a mim mesma por todas as vezes que eu fui eu mesma, nesse ambiente acadêmico doentio, onde todo mundo vive com o ego inflado e disfarça com os tapinhas nas costas e um sorriso amarelo. Num ambiente em que não só fui questionada como mulher preta, mesmo todo mundo sendo desconstruído, mas também como cientista e pesquisadora, logo eu que sei que seria pesquisadora desde os 8 anos de idade. Então, eu agradeço a mim mesma, por continuar sonhando, por saber que terminei o primeiro passo de uma longa caminhada acadêmica, mas que poderia ser para o filme 'Corra', mas eu pelo menos espero me formar uma pesquisadora. Pois sim, eu me agradeço, mais do qualquer um, por te resistido, mesmo odiando resistir, por ter lutado contra opressão, mesmo odiando fazer parte de qualquer grupo oprimido, e por ter sido minha voz, mesmo odiando ter que gritar para ser escutada.

RESUMO

O Δ^9 -tetrahydrocannabinol e o canabidiol (THC e o CBD) são fitocanabinoides de grande potencial terapêutico. Presentes na *Cannabis sativa*, o primeiro é reconhecido por seus efeitos psicoativos; e o segundo pelo amplo efeito terapêutico. O CBD é um potente anticonvulsivante, antitumoral, anti-inflamatório e antinociceptivo. Todavia, apresenta baixa biodisponibilidade, após administração por via oral; e está disponível somente na forma de soluções oleosas. O planejamento de análogos do CBD é uma possibilidade para contornar as limitações relacionadas ao uso desta substância. No presente estudo, objetivou-se investigar o potencial antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório e antinociceptivo de oito derivados e análogos do CBD. A avaliação da atividade antioxidante foi feita usando três métodos químicos (FRAP, DPPH e ABTS). Como resultado, **MPP_CBD** e **CBD_R104** se destacaram nos testes de redução de ABTS e DPPH. O perfil antitumoral foi testado usando três linhagens de células tumorais: leucemia mielóide crônica (K-562), leucemia monocítica aguda (THP-1) e adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231), por meio da determinação do valor da concentração de inibitória 50% (CI₅₀). Dentre as substâncias analisadas, **MPP_CBD**, **CBD_R104**, **RAC6** e **RAC6_Ab** demonstraram valores de CI₅₀ próximos aos dos fármacos utilizados como controle positivo. A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi feita por meio da dosagem indireta do óxido nítrico (NO), em que todas as substâncias bloquearam a produção de NO. Foram avaliados os níveis interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator de Necrose Tumoral (TNF), interferon-gama (INF γ) e interleucina 17A (IL-17A) e **RAC6** e **RAC6_Ab** foram capazes de reduzir os níveis de IL-6. Por fim, o **RAC6** mostrou-se ativo quando administrado por via intraperitoneal na dose de 20 mg/kg, sem interferir na atividade motora dos animais, e o mecanismo proposto demonstrou que sua ação depende da interação com o receptor CB1. Dessa maneira, o presente estudo salientou que o planejamento de substâncias análogas ao CBD é promissor na busca por moléculas mais ativas e com melhor potencial farmacocinético.

Palavras-chave: CBD; análogos; derivados; antioxidante; anti-inflamatório; antitumoral; antinociceptiva

ABSTRACT

Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol (THC and CBD) are phytocannabinoids with great therapeutic potential. Present in *Cannabis sativa*, the former is recognized for its psychoactive effects, and the latter for its broad therapeutic effect. CBD is a potent anticonvulsant, antitumor, anti-inflammatory, and antinociceptive agent. However, it has low bioavailability after oral administration and is only available in the form of oily solutions. Planning CBD analogs is a possibility to overcome the limitations associated with the use of this substance. In this study, the aim was to investigate the antioxidant, antitumor, anti-inflammatory, and antinociceptive potential of eight derivatives and analogs of CBD. The evaluation of antioxidant activity was performed using three chemical methods (FRAP, DPPH, and ABTS). As a result, MPP_CBD and CBD_R104 stood out in ABTS and DPPH reduction tests. The antitumor profile was tested using three tumor cell lines: chronic myeloid leukemia (K-562), acute monocytic leukemia (THP-1), and human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), by determining the value of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀). Among the substances analyzed, MPP_CBD, CBD_R104, RAC6, and RAC6_Ab demonstrated IC₅₀ values close to those of drugs used as positive controls. In vitro anti-inflammatory activity was determined by indirectly measuring nitric oxide (NO) levels, where all substances blocked NO production. Levels of interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), Tumor Necrosis Factor (TNF), interferon-gamma (IFN γ), and interleukin 17A (IL-17A) were evaluated, and RAC6 and RAC6_Ab were able to reduce IL-6 levels. Finally, RAC6 showed activity when administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg, without interfering with the animals' motor activity, and the proposed mechanism demonstrated that its action depends on interaction with the CB1 receptor. Thus, the present study highlighted that planning substances analogous to CBD is promising in the search for more active molecules with better pharmacokinetic potential.

Keywords: CBD; analogs; derivatives; antioxidant; anti-inflammatory; antitumor; antinociceptive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Propaganda de Cigarros Grimault	27
Figura 2 - Dois exemplares do extrato fluído da planta, datados da década de 1930	27
Figura 3- Trecho do texto do prefácio e capa da Coletânea de Trabalhos Brasileiros de título Maconha	28
Figura 4 - Cartaz do filme educativo ‘Marijuana’, sobre os perigos do uso da maconha	29
Figura 5 - Desenho das formas da planta <i>Cannabis sativa</i>	31
Figura 6 - Algumas diferenças estruturais entre as espécies de <i>Cannabis spp.</i>	32
Figura 7 - Esquema demonstrativo da sequência de síntese dos compostos bioativos	34
Figura 8 - Estrutura dos endocanabinoides AEA e 2-AG	35
Figura 9 - Estrutura do THC	36
Figura 10 - Estrutura do CBD	37
Figura 11 - Gráfico com o número de publicações sobre <i>Cannabis</i> e CBD de 1963-2007	38
Figura 12 - Esqueleto estrutural do CBD	45
Figura 13- Derivados naturais do CBD	46
Figura 14 - Derivados sintéticos do CBD	46
Figura 15 - Estruturas dos derivados hidrogenados do CBD	48
Figura 16- Estrutura dos derivados dimetilados do CBD	49
Figura 17- Estrutura dos derivados fluorados do CBD	50
Figura 18- Estrutura dos derivados di- e triacetilados do CBD	50
Figura 19 - Estruturas químicas e respectivos códigos de identificação dos derivados do CBD estudados neste trabalho	52
Figura 20 - Estruturas químicas e respectivos códigos de identificação dos análogos do CBD estudados neste trabalho	53
Figura 21 - Gráfico com curva-padrão de Trolox. O eixo <i>y</i> é a absorbância e o eixo <i>x</i> demonstra as concentrações correspondentes. Está apresentado no gráfico a equação da reta e o valor de R ² . As três curvas representam os resultados da leitura das soluções preparadas em triplicata e os valores obtidos são resultado da média dos valores.	57

- Figura 22** - Desenho esquemático da placa de 96 poços para dosagem indireta de NO. Observa-se os controles em verde, as substâncias com suas respectivas concentrações encontradas em cada poço com e sem LPS. 65
- Figura 23 - Gráfico da curva-padrão de NaNO_2 usada para os cálculos de concentração do ensaio de dosagem de NO. No gráfico há também a equação da reta e o valor de R^2 . 67
- Figura 24- Esquema mostrando a formação do complexo com as *Beads*, amostras e o anticorpo acoplado ao FE 68
- Figura 25 - Linha do tempo da administração das substâncias usadas no modelo murino de DN. 71
- Figura 26- Representação da reação de redução do íon Fe^{3+} a Fe^{2+} no complexo TPTZ com a variação de cor à medida que a reação se processa no início, meio e fim do ensaio. 74
- Figura 27- Estrutura do Trolox 75
- Figura 28 – Gráfico do resultado do ensaio do FRAP, com os resultados em μM de TE/ mM de substância. ** representa valor de $p < 0,005$, demonstrando que houve diferença significativa entre a atividade as substâncias e a do CBD. 77
- Figura 29- Reação de redução do radical DPPH, com esquema do que é esperado da diferenciação de cor no início, meio e fim do ensaio. 79
- Figura 30 – Representação da estabilização por ressonância do radical DPPH (A) e de um radical semiquinona (B) originado a partir da reação de uma substância fenólica antioxidante. R = substituinte não especificado. 79
- Figura 31- Gráfico do resultado do ensaio de redução de DPPH. No eixo y observa-se a % AAT e no x mostra-se os nomes das substâncias. Os valores com ** apresentam diferença significativa do CBD e as substâncias com *** apresentam diferença significativa ao trolox, o controle positivo. O valor de $p < 0.005$ foi considerado para determinar o grau de diferença. 81
- Figura 32- Reação da formação do radical ABTS a partir da reação com persulfato de potássio, seguido de redução pelo agente antioxidante. O esquema do que é esperado da diferenciação de cor no início e ao fim do ensaio. 82
- Figura 33- Gráfico representando o resultado do ensaio de redução do ABTS. No eixo y observa-se a % AAT, calculado por meio das absorbâncias das substâncias, e no eixo x a identificação de cada uma das substâncias testadas. O valor de $p < 0.005$ foi considerado para

apontar que houve diferença significativa entre as substâncias e o trolox, sinalizado com ***, e o CBD, sinalizado com **.	84
Figura 34- Estruturas do CBD e da MPP_CBD com o grupo 4-metilpiperidina em destaque	85
Figura 35- Estrutura da substância CBD_R104 com destaque a redução da insaturação.	86
Figura 36- Reação de redução do MTT em formazan resultado da ação das enzimas mitocondriais.	87
Figura 37- Estrutura da quinona HU-311-V (a) comparada a estrutura do CBD (b)	91
Figura 38 - Esquema da redução da resazurina em resorufina	92
Figura 39- Média da porcentagem de morte celular nas concentrações de 200 e 300 μ M, nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-tratamento com as substâncias DeT_CBD, MPP_CBD, CBD_R104, RAC6, RAC6_Ab e CBD.	93
Figura 40- Etapas de reações utilizando o reagente de Griess para dosagem de NO_2^- nas amostras.	95
Figura 41- Estrutura dos derivados hidrogenados do CBD.	98
Figura 42 - Esquema mostrando os macrófagos M1 e M2 com o estímulo e as citocinas que cada tipo pode expressar. A seta em curva significa o tipo de estímulo necessário para a polarização dos macrófagos.	100
Figura 43- Gráfico do resultado da dosagem da citocina TNF- α nas células sem estímulo, estimuladas por LPS e tratadas com as substâncias CBD, DeT_CBD, CBD_R104, RAC6 e RAC6_Ab. Nos eixos x representa a identificação das substâncias, nos eixos y nota-se a concentração das citocinas em pg/mL. Os resultados foram obtidos por meio do Software FCAP BDBiosystems.	101
Figura 44 – Estrutura das substâncias do presente estudo RAC6 e DeT_CBD, e a dos derivados hidrogenados DMH do CBD estudados por BEN SHABAT et al. (2006) para determinação do potencial de ação frente à inflamação. As substâncias mostradas demonstraram potencial de ação pró-inflamatória não suprimindo a expressão de TNF- α .	102
Figura 45 -Estruturas das substâncias CBD_R104 e RAC6_Ab, e a dos derivados hidrogenados do CBD.	103
Figura 46 - Gráfico apresenta o resultado da dosagem da citocina IL-6 nas células sem estímulo, estimuladas por LPS e tratadas com as substâncias CBD, DeT_CBD, CBD_R104, RAC6 e RAC6_Ab. No eixo x estão identificadas as substâncias e no eixo y a concentração	

das citocinas em pg/mL. Os resultados foram obtidos utilizando o Software FCAP BDBiosystems.	104
Figura 47- Estrutura das substâncias CBD_R104 e DeT_CBD	105
Figura 48 - Estrutura do RAC6 e RAC6_Ab e do DMH-CBD descrito como potencial anti-inflamatório por JUKNAT <i>et al.</i> (2016)	106
Figura 49 - Estruturas dos antagonistas usados neste estudo: naltrexona é o antagonista do receptor opióide e AM251 é um antagonista do receptor CB1.	108
Figura 50 - Gráficos dos níveis de alodinia avaliados pelo ensaio de Von Frey para o análogo RAC6 nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg o CBD 20 mg/kg, pregabalina 30 mg/kg, e o veículo. O gráfico (a) demonstra a relação do tempo de movimentação da pata mediante o estímulo à dor após o tempo de tratamento de 1, 3, 5 e 7 horas. No gráfico (b) observa-se a área sob a curva de cada composto analisado nas respectivas concentrações. O valor de significância considerado foi de $p < 0,005$. Os resultados com *** demonstram valores com diferença significativa em relação ao controle, e ** em relação ao controle.	109
Figura 51- Estrutura do CBD e o análogo RAC6	110
Figura 52 - Gráfico representando o potencial de relaxamento muscular das substâncias testadas mediante o tempo de permanência dos animais na manilha do aparelho ROTA-ROD, após 1, 3, 5 e 7 horas do tratamento, inferindo alteração no movimento. O fármaco utilizado como controle para o teste foi o fenobarbital na dose de 50 mg/kg. O CBD e o RAC6 foram avaliados na dose de 20 mg/Kg. A significância foi determinada no valor de $p < 0,005$. Os dados com ** e *** apresentam diferença significativa em relação ao controle.	111
Figura 53 - Gráfico da avaliação dos níveis de alodinia avaliadas pelo ensaio de Von Frey com o análogo RAC6, nas doses de 20 mg/Kg, o antagonista do receptor CB ₁ , AM251, nas doses de 4 e 8 mg/Kg e o veículo CMC 0,5%. Gráfico a representa o tempo de movimentação da pata mediante o estímulo à dor X tempo de tratamento de 1, 3, 5 e 7 horas. Gráfico b representa a área sob a curva de cada substância analisada nas diferentes concentrações. O valor de significância considerado foi de $p < 0,005$. ** e *** demonstram valores com diferença significativa.	113
Figura 54 - Estrutura do DH-CBD	114
Figura 55- Gráficos da avaliação dos níveis de alodinia pelo ensaio de Von Frey utilizando RAC6 na dose de 20 mg/Kg, o antagonista do receptor opióide, naltrexona, nas doses de 5 e 10	

mg e o veículo CMC 0,5%. Gráfico (a) - relação do tempo de movimentação da pata mediante o estímulo à dor após 1, 3, 5 e 7 horas de tratamento. Gráfico (b) - área sob a curva de cada grupo estudado. O valor de significância considerado foi de $p < 0,005$. ** e *** demonstram valores com diferença significativa.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos fitocanabinoides (continua)	33
Tabela 1 - Classificação dos fitocanabinoides (conclusão)	34
Tabela 2 - Descrição dos parâmetros descritivos das substâncias sintéticas (continua)	53
Tabela 2 - Descrição dos parâmetros descritivos das substâncias sintéticas (conclusão)	54
Tabela 3 - Escala de diluição da solução de Trolox para construção da curva-padrão	56
Tabela 4- Concentrações usadas para a determinação da CC_{50}	64
Tabela 5- Concentrações usadas no estudo de dosagem indireta de NO	65
Tabela 6 - Concentrações de $NaNO_2$ usadas na construção da curva-padrão de nitrito para o experimento de dosagem de NO.	67
Tabela 7 - Concentração padrão para calibração do CBA	69
Tabela 8- Dados dos resultados dos testes da atividade antioxidante do ensaio FRAP	76
Tabela 9- Dados dos resultados do ensaio de DPPH. Valores expressos em % AAT e o desvio padrão (DP) das médias.	80
Tabela 10- Resultados do ensaio de redução do ABTS. Os resultados estão em % AAT junto dos DP de cada média.	83
Tabela 11- Valores de CI_{50} das substâncias frente às diferentes linhagens de células tumorais (continua)	87
Tabela 11- Valores de CI_{50} das substâncias frente às diferentes linhagens de células tumorais (conclusão)	88
Tabela 12- Valores de CC_{50} das substâncias testadas	94
Tabela 13- Concentração de nitrito mensurado nas células tratadas com as substâncias e estimuladas com LPS. Observa-se as médias das concentrações e seus respectivos DPs (continua)	96
Tabela 13- Concentração de nitrito mensurado nas células tratadas com as substâncias e estimuladas com LPS. Observa-se as médias das concentrações e seus respectivos DPs (conclusão)	97

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Fórmula para o cálculo de concentração	55
Equação 2 - Equação da reta	57
Equação 3 - Cálculo do volume da solução	58
Equação 4 - Cálculo da porcentagem da atividade antioxidante	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% AAT: porcentagem de atividade antioxidante

2-AG: 2-araquidonoil glicerol

5-HT1a: Receptor de serotonina endógeno subtipo 1a

ABTS: 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)

ABRACE Esperança: Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança

AEA: anandamida

ANOVA: análise de variância

AP-1: complexo ativador de proteínas-1

AVC: Acidente vascular cerebral

CBA: Ensaio citométrico de Beads (Cytometric bead array)

CBC: Canabicromeno

CBD: Canabidiol

CBD-7-COOH-: Ácido carboxílico 7-hidroxilado do CBD

CBD-7-OH-: derivado CBD 7-hidroxilado

CBDA: Ácido canabiolico

CBD-C1: Canabidiorcol

CBD-C4: nor-CBD

CBDM: Éter monometil do CBD

CBDV: Canabidivarina

CBDVA-C3: Ácido canabidivarinico

CBE: Canabielsoin

CBG: Canabigerol

CBL: Canabiciolol

CBN: Canabinol

CBND: Canabinodiol

CBT: Canabitriol

CC50: Concentração mínima de citotoxicidade de 50% das células

CI50: concentração mínima que inibiu em 50% a viabilidade celular

CMC: Carboximetilcelulose

COX-2: Ciclooxygenase tipo 2
CYP450: Enzimas do citocromo P450
DAG-Lipase: Lipase do diacilglicerol
DH-CBD: desidroxil-CBD
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMH-CBD: Dimetil heptil-CBD
DMSO: Dimetilsulfóxido
DN: Dor neuropática
DNIQ: Dor neuropática induzida por quimioterápico
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EM: Esclerose múltipla
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FAAH: Hidrolase de amida de ácido graxos
FRAP: Ferric reducing antioxidant power
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GlyR: receptores de Glicina
GPR: Receptor acoplado a proteína G
GPR55: Receptor acoplado a proteína G 55
GTPase: enzimas que promovem lise de Guanosina
HCA: Hierarchical Cluster Analysis
IL-10: interleucina 10
IL-17A: interleucina 17A
IL-2: interleucina 2
IL-2: interleucina 2
IL-4: interleucina 4
IL-6: interleucina 6
iNOS: NO sintase induzida
i.p.: via intraperitoneal
K-562: leucemia mielóide crônica
LPS: lipossacarídeo
LUMO: Orbital molecular desocupado de menor energia

MAGL: Monoacilglicerol lipase
MDA-MB-231: Adenocarcinoma de mama humano
mTOR: alvo molecular da Rapamicina em mamíferos (Mammalian target of rapamycin)
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NAPE-PLD: *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina fosfodiesterase, específica da fosfolipase D
NED: *N*-(1-naftil)-etileno-diamina
NFAT: fator de transcrição fator nuclear de células T ativadas
NF-κB: fator nuclear Kappa-B
NO: Óxido nítrico
NOX: NADPH-oxidase
Nrf2: fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2
NSAIDs: medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais
PAC: Paclitaxel
p.o.: *per os*
PKA: proteína quinase dependente de AMP_c
PPAR: proteínas poli-polimerase
PPAR_γ: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
Receptores CB1/CB2: Receptores canabinóides do tipo 1/tipo 2
RhoA: enzimas família Rho do tipo A (RhoA)
SEC: Sistema endocanabinoide
SFB: soro fetal bovino
SNC: Sistema nervoso central
SNP: Sistema nervoso periférico
TE: equivalente de Trolox
THC/ Δ9-THC: Δ9-trans-tetraidrocanabinol
THP-1: leucemia monocítica aguda
TNFα: Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ: 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TRPV1: Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1
Δ8-THC: Δ8-trans-tetraidrocanabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Cannabis sativa	25
2.2 Fitocanabinoides	30
2.3 CBD	37
2.3.1 Atividade antioxidante	39
2.3.2 Ação antitumoral	40
2.3.3 Potencial anti-inflamatório	41
2.3.4 Atividade contra dor neuropática	43
2.4 Derivados e análogos do CBD	44
2.4.1 Potencial biológico de derivados e análogos de origem natural ou sintética	48
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo Principal	52
3.2 Objetivos Específicos	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Obtenção dos análogos e derivados do CBD	53
4.2 Avaliação da atividade antioxidante	55
4.2.1 FRAP	55
4.2.2 DPPH	58
4.2.3 ABTS	60
4.3 Avaliação da atividade antitumoral	62
4.3.1 Linhagens celulares K-562, THP-1 e MDA-MB-231	62
4.3.2 Ensaio de viabilidade celular	62
4.3.3 Determinação do CI50 para as linhagens celulares	63
4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória em macrófagos murino RAW 264.7	63
4.4.1 Cultivo e manejo das culturas dos macrófagos RAW 264.7	63
4.4.2 Preparo das substâncias	64
4.4.3 Determinação da concentração do composto que inibe 50% da viabilidade celular (CC50)	64
4.4.4 Avaliação da atividade inflamatória das substâncias pela dosagem de NO	65
4.5 Avaliação da atividade da modulação da dor neuropática in vivo	71
4.5.1 Animais	71
4.5.2 Preparo de soluções	71
4.5.3 Modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel	72
4.5.4 Avaliação da alodinia mecânica	73
4.5.5 Avaliação dos efeitos induzidos sobre a coordenação motora	73
4.5.6 Avaliação da via mecanística	74
4.6 Análise estatística	74

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos derivados e análogos do CBD	75
5.1.1 Resultado do ensaio de FRAP	75
5.1.2 Resultado do ensaio de redução do DPPH	79
5.1.3 Ensaio de redução do ABTS	82
5.1.4 Discussão dos resultados dos ensaios de atividade antioxidante	85
5.2 Avaliação da atividade citotóxica das substâncias em diferentes linhagens de células tumorais	87
5.2.1 Discussão dos resultados de atividade na linhagem THP-1	89
5.2.2 Discussão dos resultados de atividade na linhagem K-562 e discussão	90
5.2.3 Discussão dos resultados de atividade na linhagem MDA-MB-231	90
5.3 Determinação do potencial anti-inflamatório das substâncias sintéticas em células da linhagem RAW 264.7 estimuladas por LPS	92
5.3.1 Resultados do ensaio de citotoxicidade e CC50	92
5.3.2 Discussão dos resultados do ensaio de dosagem de NO2-	95
5.3.3 Resultados e discussão da dosagem de citocinas	99
5.4 Avaliação da atividade do RAC6 em modelo de dor neuropática e proposição de uma possível via mecanística	108
CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1 INTRODUÇÃO

Existe atualmente uma especialidade voltada para a natureza e causa das doenças, conforme observações de alterações na estrutura e/ou na função de células e tecidos causadas pelo processo patológico que não podem ser tratados em razão da falta de algum fármaco efetivo e seguro. A pandemia do novo coronavírus foi um exemplo palpável de como a ausência de tratamento para uma doença pode ser devastadora. Para além do estado pandêmico vivido recentemente, essa é a realidade de algumas pessoas que vivem com doenças que não é possível curar. Entretanto, o CBD é um fármaco com um amplo espectro de ação, e até o presente momento, apresenta um bom perfil de segurança. Desde que foi ‘redescoberto’, vem sendo amplamente estudado e demonstrado resultados promissores. Por conseguinte, o fármaco já foi descrito como anti-inflamatório, neuroprotetor, antioxidante, analgésico, anticonvulsivante, antimicrobiano, laxativo, ansiolítico, antidepressivo, antipsicótico dentre outras atividades (WHITE, 2019; WHO, 2017).

Porém, os estudos enfrenam resistência por parcelas da sociedade, inclusive do Poder Judiciário, já que o CBD é isolado de uma planta considerada ilegal na maior parte dos países da América Latina, e seu uso passível de prisão (ROSSI, 2018). Entretanto, em países como os Estados Unidos, o CBD, mesmo sendo ilegal em inúmeros estados e para a legislação federal, vem sendo testado em balas de gelatina com melatonina (COHEN *et al.*, 2023). O CBD, junto a quase outras 400 substâncias químicas, está presente nas diferentes espécies de *Cannabis spp.* e acredita-se que seja especificamente mais facilmente encontrado nas fibras da espécie *Cannabis ruderalis* (ANDRE *et al.*, 2016). Existem outras espécies da planta ricas em outros fitocanabinoides, como no caso da espécie *Cannabis sativa* que produz uma maior concentração de Δ^9 -THC, sendo este o responsável pelos efeitos psicotrópicos observados com o uso da planta (ANDRE *et al.*, 2016; AIZPURUA-OLAIZOLA, *et al.*, 2020).

Para além do seu efeito psicotrópico, a Cânabis é uma planta que no Novo Mundo estava associada a pessoas escravizadas e posteriormente a hispânico descendentes. No Brasil, o primeiro país a proibir o uso da planta, ela era considerada ‘droga de preto’. Tanto que o nome popular da droga, ‘Maconha’ e ‘Diamba’ são nomes de origem Kimbundu, uma língua falada em Moçambique. Em 1933, ocorre a instauração da lei da vadiagem, que basicamente proibia ser preto, uma ferramenta para manutenção de poder sobre corpos pretos. Daí o uso da

erva passou a ser considerado crime no Brasil e hoje a apreensão por tráfico de drogas é um dos principais motivos para o encarceramento em massa. Sabe-se que atualmente o país possui a terceira maior população carcerária do mundo, e assim como nos Estados Unidos, a maior população em cárcere privado mundial é constituída por pessoas pretas. Além disso, ainda hoje acusações de crimes relacionados ao tráfico de drogas é o maior fator encarcerador da juventude preta e pobre (CARLINI 2010; ZUARDI, 2006).

Estudos cerceando a utilização do CBD e a comprovação de tal como fármaco, trouxeram novamente o cunho medicinal da Cânabis em voga. Então, desde a elucidação de sua estrutura em 1964, e posteriormente estudos do uso do composto como um anticonvulsivante em 1980, proporcionaram um crescimento na pesquisa sobre o seu uso em diversas patologias. Reverberando seu uso como panaceia, como feito na medicina Ayurvédica e Tradicional Chinesa, que contam basicamente com a utilização de plantas no tratamento de inúmeras doenças. Por outro lado, é evidente que a elucidação e estudos acerca do $\Delta 9$ -THC e seus efeitos psicoativos foram de grande importância para que o CBD possuísse a imagem e aceitação que possui hoje, tendo em vista que o nome Cannabis medicinal deve-se justamente aos tratamentos atribuídos a ação do CBD (MECHOULAM *et al.*, 2014; TOUW, 1981).

É crucial ressaltar a importância do sistema endocanabinoide na compreensão e estudo do mecanismo de ação dos fitocanabinoides. O THC possui afinidade pelos receptores canabinóides do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2), que estão presentes no sistema nervoso central (CB1) e nas regiões periféricas do organismo (CB2), como o trato gastrointestinal e o sistema imune. É justamente o fato do THC se ligar ortostericamente ao CB1 que gera sintomas psicotrópicos com o uso dessa substância. Todavia, o CBD não se liga aos receptores da mesma forma, apresentando até mesmo uma ação antagonista nos receptores CB2. Também, a capacidade de atuar como agonista inverso ou antagonista dos receptores, confere ao CBD um potencial terapêutico em diversas condições. Além disso, o composto possui outros sítios de ação, se liga a outros receptores, possuindo ação direta e indireta nos receptores canabinóides, podendo atuar até mesmo no controle da recaptura da anandamida (AEA), um endocanabinoide (WU, 2019).

Assim, o CBD pode atuar tanto no sistema endocanabinoide quanto nos receptores adrenérgicos. Entretanto, parte significativa da atuação do composto segue inexplicada, como, por exemplo, sua ação como anticonvulsivante. Por outro lado, o CBD tem o mecanismo de

ação bem claro quando se trata da ativação dos receptores adrenérgicos, em vias neuroprotetoras. Também é bem conhecido que este fitocanabinóide apresenta afinidade por outros receptores acoplados à proteína G (GPRs), além de sua participação no processo de sensibilização e dessensibilização de canais de sódio (MECHOULAM *et al.*, 2002b).

Os pontos desfavoráveis do estudo e uso do CBD são justamente suas propriedades farmacocinéticas, como a alta lipofilia e baixa absorção. Além disso, devido ao seu caráter lipofílico, a manipulação e o desenvolvimento de formulações para obtenção de um medicamento são altamente laboriosos. Outro fator que dificulta esse manejo é a semelhança estrutural entre o CBD e o THC e a possibilidade de conversão do CBD em THC em meio ácido, como no estômago (pH entre 1,5 e 2). Esse ponto é extremamente desfavorável, considerando que alguns pacientes que usam o composto o fazem como forma de tratamento a dependência ao THC e outras drogas. A alta lipofilia também confere ao composto uma baixa absorção, necessitando a administração de doses elevadas para alcançar o efeito esperado (MECHOULAM & HANUS, 2002; WHO, 2017).

Derivados e análogos que mimetizam os efeitos do CBD, mas com melhores propriedades farmacocinéticas são alvos na pesquisa por novos fármacos no tratamento de doenças envolvendo processos inflamatórios, por exemplo. Derivados do CBD já vêm sendo usados no tratamento de algumas patologias, como a canabidivarina, usada como medicamento órfão para doenças convulsivas graves. Todavia, a busca por novos candidatos a fármacos é necessária, principalmente considerando os resultados promissores do CBD (HILL *et al.*, 2012; MORALES *et al.*, 2017a).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cannabis sativa*

Cannabis sativa é considerada uma das cinco ervas sagradas deixadas pelos deuses e suas folhas são moradas para o anjo da guarda, segundo o sânscrito hindu Atbarva Veda. Além disso, acreditava-se que a erva foi deixada pelos deuses para a humanidade para que pudesse obter prazer, perder o medo e ter desejo sexual, segundo outro sânscrito hindu, Raja Valabbha. Na China, era considerada um dos cinco grãos essenciais, junto ao arroz, soja, cevada e milho. Achados arqueológicos, datados de 2000 a. C., sugerem seu uso na fabricação têxtil na China e em colônias chinesas. Adicionalmente, a ação medicinal da Cânabis é descrita no Pen-Ts'ao Ching, um compilado de registros da medicina tradicional chinesa, datado de 100 d. C. Além disso, existem indícios de que a planta tenha sido citada no Velho Testamento, na sua tradução em Aramaico, na passagem em que Deus direciona Moisés a fazer um óleo santo. Dentre as ervas escolhidas para perfumar o óleo, encontra-se *kene bosm*, que significa 'cheiro bom'. Considerando a familiaridade do nome em outros idiomas, por exemplo, *kanab*, do Persa, associada a popularidade da planta entre os semitas na época, os indícios são grandes de que se tratava da Cânabis. Nesse sentido, observa-se que a planta esteve associada ao homem durante a história, sendo usada na fabricação de roupas e papéis, como medicamento e um alucinógeno (AMIN & ALI, 2019; TUOW, 1981).

Outrossim, a planta foi primeiramente difundida e usada em países da Ásia. Por exemplo, na medicina Ayurvédica existem diversas preparações usando a semente, folha ou flor da *Cannabis*. Todavia, estudos nos padrões da medicina ocidental iniciaram-se no século 19, em que se encontram alguns relatórios de seu uso. Em meados do mesmo século, o médico irlandês O'Shaughnessy publicou seu trabalho, descrevendo formas populares de preparo para o consumo. Nos documentos médicos produzidos por O'Shaughnessy constam informações sobre a toxicidade da planta em animais e humanos, assim como sua eficácia no tratamento de reumatismo, convulsões e espasmos musculares. Esses trabalhos foram publicados no livro do médico Jacques-Joseph Moreau, que também trabalhou com a planta na forma de haxixe, a resina da planta, no tratamento de doenças da mente. Pode-se inferir a tamanha influência dos dois trabalhos, apresentando a Cânabis ao mundo ocidental, pelo fato de que, na segunda

metade do mesmo século, foram publicados mais 100 artigos sobre a importância terapêutica da planta. Infelizmente, os anos que viriam levariam ao declínio das pesquisas e isso se deve a alguns fatores, como a dificuldade na reprodutibilidade, devido à variação das safras, espécies e preparo da planta. Então, percebe-se o interesse da medicina ocidental pela Cânabis como um medicamento, porém mesmo avançando nos estudos algumas variáveis precisavam ser eliminadas (ZUARDI, 2006).

Entretanto, com a chegada do século XX chegou também um novo olhar sobre a planta, que, devido aos efeitos psicoativos, passou a ser considerada uma droga ilícita, e então o uso proibido e punido legalmente. Cabe ressaltar que, seguindo a linha do autor Elisandro Carlini (2006) que usa o nome popular maconha para designar Cânabis, este termo será utilizado neste trabalho, por reconhecer a importância do nome para a relevância histórica e social da planta (CARLINI, 2006; CARLINI, 2010). O Brasil foi pioneiro na criminalização da maconha e na década de 30 já eram realizadas as primeiras prisões por posse e tráfico dessa droga. Além disso, em 1924, na 2ª Conferência Internacional do Ópio, formada para discutir sobre ópio e cocaína, o delegado Pernambucano foi bem enérgico ao afirmar que a maconha era ainda mais perigosa que as duas drogas em questão. Porém, tudo isso era controverso até mesmo para comunidade médica da época, que segundo registros encontrados, indicava a utilização da fumaça dos Cigarros Grimault no tratamento de asma, inclusive em pacientes pediátricos (**Figura 1**). Existia também o uso do extrato da planta no tratamento de inúmeros sintomas e patologias, tendo no rótulo do frasco a indicação do seu poder sedativo e alucinógeno, além da dose a ser administrada para alcançar estes efeitos (**Figura 2**) (ZUARDI, 2006).

Figura 1- Propaganda de Cigarros Grimault



FONTE: Carlini (2006, p.2)

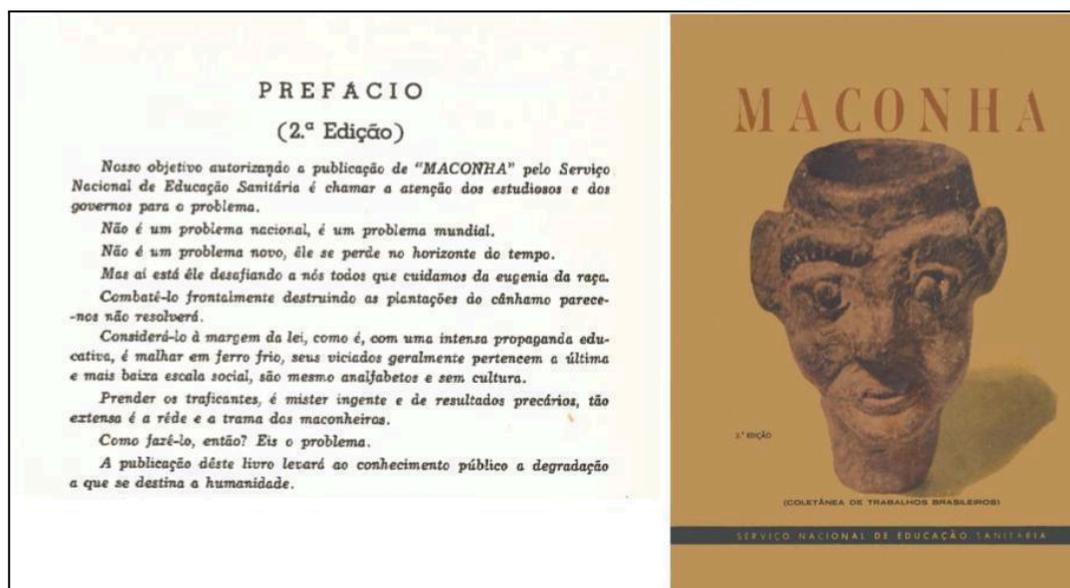
Figura 2 - Dois exemplares do extrato fluído da planta, datados da década de 1930



FONTE: https://americanhistory.si.edu/collections/search/object/nmah_718525 (acessado Out/2022)

Fato é que realmente a maconha era perigosa, pois era usada de forma recreativa por povos não brancos no Brasil. A maconha era associada a pessoas negras porque foram elas que introduziram a planta no continente, e foram apreendidas pelo uso da maconha a partir de 1930 (CARLINI, 2010). Por conseguinte, há registros científicos de como era esse racismo principalmente na comunidade médica, como no texto de prefácio da ‘MACONHA - Coletânea de Trabalhos Brasileiros’, promovido pelo Serviço Nacional de Educação Sanitária, do ano de 1958 (**Figura 3**), em que declara que o problema da maconha é um problema na manutenção da eugenia da raça e coloca seus usuários como seres inferiores, além de ser possível encontrar nos trabalhos, sem esforço, a descrição animalesca, como faziam com escravizados, dos objetos de estudo, por se tratar de pessoas negras (CARLINI, 2010; MIN. DA SAÚDE, 1958).

Figura 3- Trecho do texto do prefácio e capa da Coletânea de Trabalhos Brasileiros de título Maconha



FONTE: Ministério da Saúde (1958)

Sabe-se que a guerra contra a maconha foi travada no mundo todo e a repressão não existiu somente no Brasil. Nos Estados Unidos da América, em 1937, foi instaurado o *Marijuana Tax Act* que previa legalmente o pagamento para posse da erva, sendo cem vezes

maior o valor para uso não médico. Outro ponto importante de ressaltar é que os maiores usuários da planta nesse momento e até o fim do século 20, eram pessoas hispânicas e afro-americanas. Assim, a repressão foi tão severa que *Cannabis sativa* foi retirada da farmacopeia estadunidense (ZUARDI, 2006). Como resultado a essa criminalização, instaurou-se uma forte naquele momento e a disseminação do discurso que maconha era uma droga mais nociva que o ópio. A planta adquire sua má fama, sendo renomeada nos Estados Unidos para Marijuana, nome popular da erva entre pessoas latino-americanas, dando a planta e aos hispânicos uma imagem negativa. Entre médicos e serviços de promoção à saúde, a planta se tornou um entorpecente temido, e materiais de conscientização (**Figura 4**) eram usados para alertar as pessoas do perigo da droga (CARLINI 2006).

Figura 4 - Cartaz do filme educativo ‘Marijuana’, sobre os perigos do uso da maconha



FONTE: <https://www.nlm.nih.gov/exhibition/pickyourpoison/exhibition-marijuana.html> (acessado Out2022)

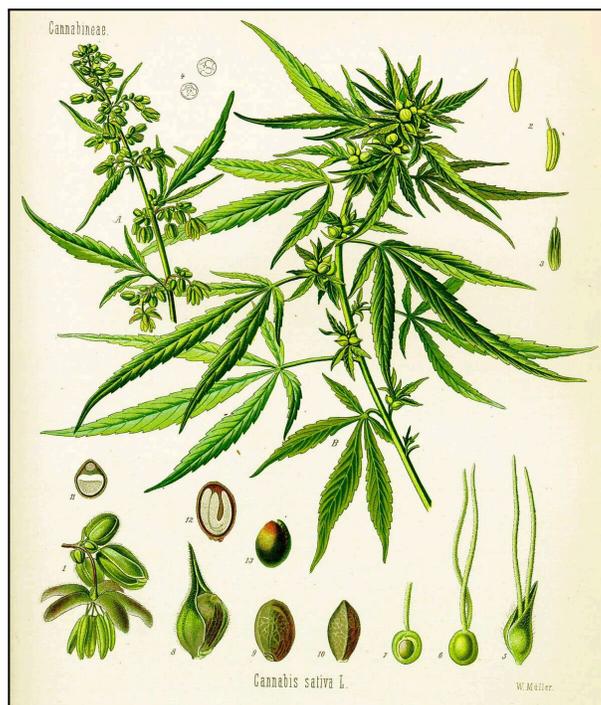
Entretanto, o cenário atual encontra-se um pouco mais animador legalmente e socialmente que o visto no século passado. Por conseguinte, alguns Estados Estadunidenses, como Alaska, já liberam o uso da planta recreativamente, em alguns como Alabama o uso é somente medicinal, e em outros, como Georgia, o uso é criminalizado (KIM *et al.*, 2020). No Canadá e Uruguai existe um consenso nacional quanto ao uso adulto ser legalizado (CANADA, 2018; QUEIROLO *et al.*, 2018). No Brasil, entre progressos e retrocessos existem

brechas que permitem o uso medicinal, mas o plantio e produção do óleo expõe o paciente ou produtor a punição legal, pelo fato de que essas liminares são passíveis de revogação e cassação, como no caso da ABRACE Esperança em 2021 (OLIVEIRA, 2021). Mesmo assim, existem atualmente no Brasil diversas empresas em diferentes setores de uso da Cânabis, como cosmético, mapeamento genético do perfil canabinoide, melhoramento genético de sementes, produtos homeopáticos, fabricação têxtil, dentre outros (CASTRO, 2020).

2.2 Fitocanabinoides

De acordo com Thomas & ElSohly (2016), a Cânabis foi uma das primeiras plantas cultivadas pelo ser humano sem o propósito alimentar, sendo usada como medicamento, entorpecente e fabricação têxtil. A planta do gênero *Cannabis spp.* (**Figura 5**) pertence à família das *Cannabinaceas* é originária do sudeste da Ásia. Cabe ressaltar que é uma planta herbácea com florada anual, ou seja, suas flores e maturação acontecem uma vez ao ano, sendo variável a localidade (THOMAS & ELSOHLI, 2016). Sobre as espécies, há divergência nos critérios científicos em que alguns pesquisadores defendem que a Cânabis possui somente uma espécie, *Cannabis sativa*, com as variações principais var. *indica* e var. *ruderalis*, enquanto outros acreditam se tratar de uma planta politípica existindo, dentre outras, as espécies *Cannabis ruderalis* e *Cannabis indica* (**Figura 6**). De todo modo, pode ocorrer variações muito grandes entre ambas as espécies, desde diferenças no tamanho e disposição das folhas e fibras, e a proporção de fitocanabinoides presentes (SCHULTES *et al.*, 1975).

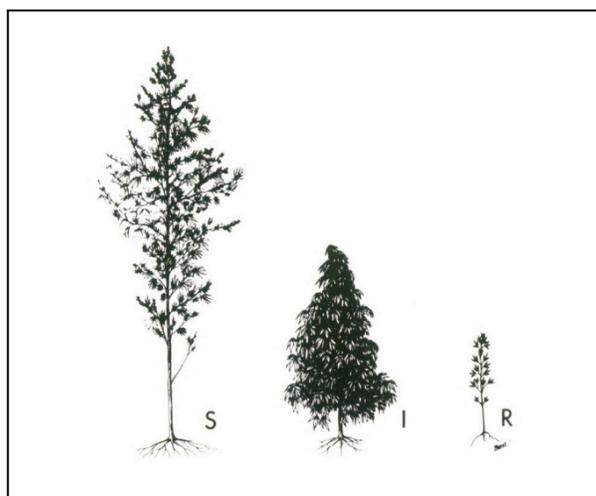
Figura 5 - Desenho das formas da planta *Cannabis sativa*



FONTE: Kohler (1887)

A diferença nas folhas e tamanhos dos caules, ou sua prevalência, são fatores importantes para o reconhecimento da planta, por exemplo, a espécie *C. ruderalis*, é um tipo selvagem, crescendo em regiões de mata da Sibéria, e além dela as outras subespécies têm variações que são domesticadas e selvagens. A espécie *C. sativa* apresenta folhas mais compridas e o pé fica mais alto. A espécie ou variação *indica* possui folhas mais largas e seu tronco fica mais espesso e mais baixo, sendo muito semelhante a um arbusto, como observado na **Figura 6**. Além disso, acredita-se que os níveis dos fitocanabinoides e outros compostos químicos são indicadores de espécies diferentes (ANDERSON, 1980; SMALL & CRONQUIST, 1976).

Figura 6 - Algumas diferenças estruturais entre as espécies de *Cannabis spp.*

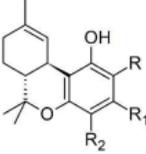
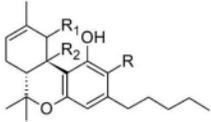
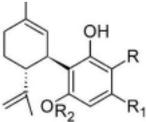
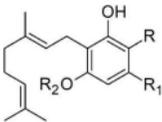
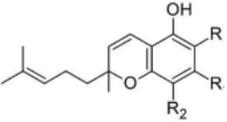
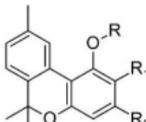
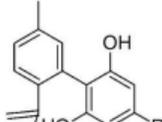


S: *C. sativa*; I: *C. indica*; R: *C. ruderalis*

FONTE: Anderson (1980, p.6)

Os fitocanabinoides representam um grupo de compostos terpeno-fenólicos contendo 21 carbonos (C₂₁) produzidos predominantemente na C^{an}abis, dispostos em concentrações diferentes, em partes distintas da planta (ANDRE *et al.*, 2016). Por exemplo, a concentração de THC nas flores é maior que nos caules e folhas. Existem 11 subclasses, dentre as quais os mais de 100 fitocanabinoides estão divididos, e reconhece-se o *CBD-type* como uma classe de compostos com a estrutura base semelhante à do CBD (**Tabela 1**). Porém, não existem somente fitocanabinoides na planta, ela é composta por outras duas classes de substâncias com atividade biológica, terpenoides e flavonoides, que também modulam o seu efeito psicoativo. Na **Figura 7** está ilustrada a síntese dos principais compostos produzidos na maconha. Dessa forma, a planta possui mais de 500 compostos químicos, e dentre os que possuem atividade biológica, os fitocanabinoides abrangem os compostos mais proeminentes, como o THC e o CBD (FILUPIUC *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Classificação dos fitocanabinoides (continua)

Classes dos Compostos	Nº de Compostos	Estrutura base
Δ^9 -THC-type	25	
Δ^8 -THC-type	5	
CBD-type	10	
Canabinerol (CBG)-type	16	
Canabicromeno (CBC)-type	9	
Canabinol (CBN)-type	11	
Canabinodiol (CBND)-type	2	

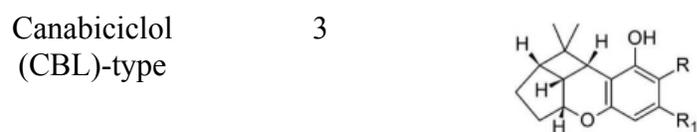
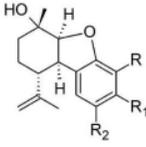
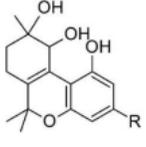
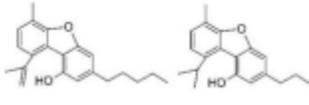
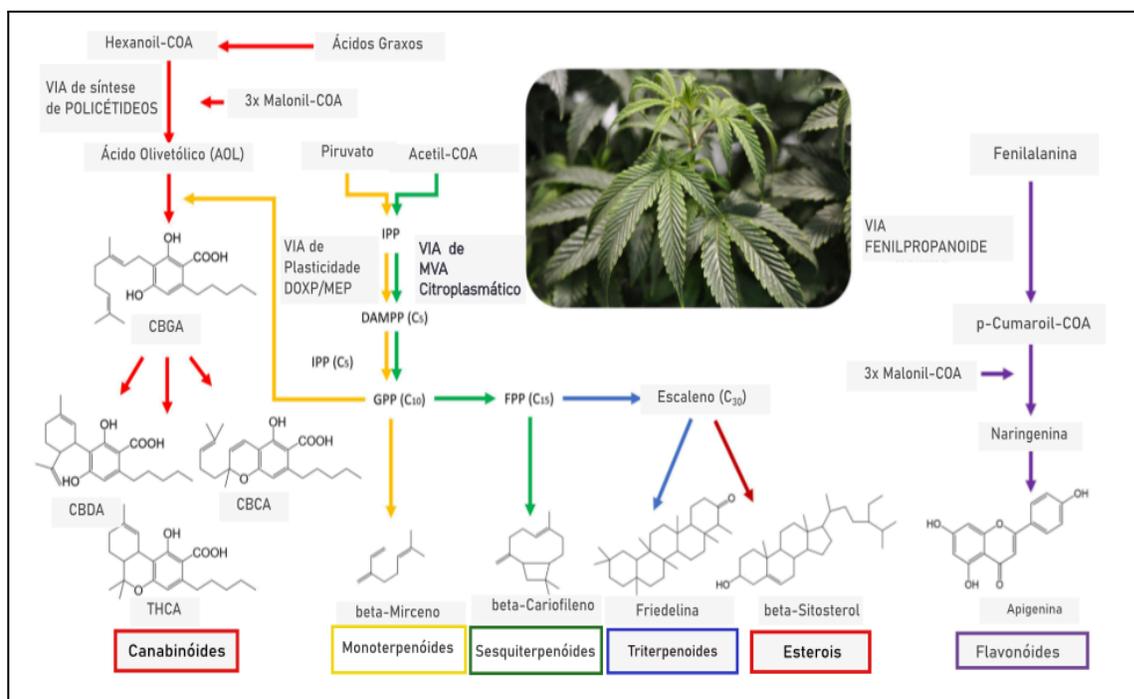


Tabela 2 - Classificação dos fitocanabinoides (conclusão)

Classes dos Compostos	N° de Compostos	Estrutura base
Canabielsoin (CBE)-type	5	
Canabitríol (CBT)-type	9	
Outros tipos não-classificados	30	

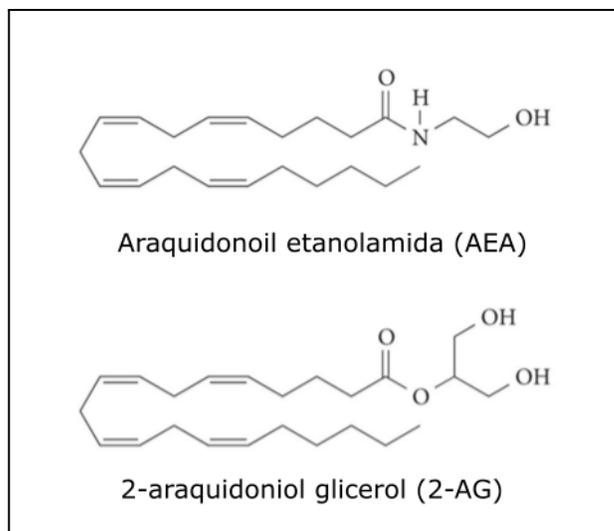
Adaptado Filipiuc (2020)

Figura 7 - Esquema demonstrativo da sequência de síntese dos compostos bioativos



FONTE: Jin *et al.* (2020, p.2)

Quando os primeiros fitocanabinoides foram isolados eles eram chamados somente de canabinóides. Porém, o cenário muda com a descoberta do sistema endocanabinoide (SEC), que consiste num complexo conjunto de neurotransmissores, receptores e enzimas, intrínseco ao corpo humano. Supunha-se, inicialmente, que o THC atuava por meio da interação com os lipídeos de membrana e, posteriormente, por meio da interação com os supostos receptores canabinóides. Assim, em 1988, os estudos farmacológicos aplicados ao conhecimento sobre receptores de membrana para hormônios e neurotransmissores, muito em alta por volta da década de 70 e 80, possibilitaram a descoberta do primeiro receptor canabinoide, CB1. Desde a elucidação do primeiro receptor, elementos constituintes do sistema vêm sendo descobertos (MECHOULAM *et al.*, 2013). Todavia, o sistema é composto principalmente por receptores CB1 e CB2, pelos endocanabinóides, anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (**Figura 8**) e por enzimas responsáveis pela síntese, NAPE-PLD e DAG-Lipase, e as enzimas de degradação, a hidrolase de amida de ácido graxos (FAAH) e a monoacilglicerol lipase (MAGL), dos endocanabinóides. A descoberta do sistema foi de extrema importância também para a compreender as vias mecânicas dos fitocanabinoides (MACCARRONE, 2017; SHERMA *et al.*, 2019).

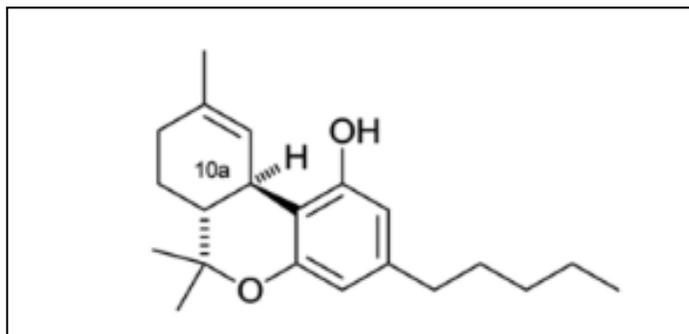
Figura 8 - Estrutura dos endocanabinoides AEA e 2-AG

Adaptado Sherma *et al.* (2019, p.310)

Dentre os canabinóides sintetizados na planta é inegável que o THC (**Figura 9**) tem papel importantíssimo na fama da planta, tanto que o efeito psicoativo chamado de *cannabis-like effect* é atribuído à ação deste composto nos receptores CB1. Esse composto foi isolado em 1940 por Adams *et al.* (1940) a partir de um preparado de haxixe. O composto ganhou atenção, pois acreditava-se que o efeito entorpecente estava associado aos efeitos terapêuticos para o qual a planta era usada. Assim, o THC, que possui ação diversa, atua no sistema endocanabinoide, sendo um agonista parcial aos receptores CB1 e CB2. Os receptores são encontrados no sistema nervoso central e sistema imune (MECHOULAM & PARKER, 2013). Além dos efeitos entorpecentes observados, há também outras atividades estimuladas pela afinidade do THC aos receptores canabinóides. O THC é usado não só como antiemético, em pacientes soropositivos e em tratamento quimioterápico, mas também no controle do apetite, em pacientes anoréxicos e portadores da AIDS. Outrossim, Dronabinol, medicamento contendo a forma sintética do composto, é comercializado para o tratamento de distúrbios alimentares e vômitos excessivos. Além disso, o THC possui um potencial analgésico, antioxidante e anti-inflamatório. Assim, sabe-se que o THC é a substância mais buscada no

uso recreativo, pelos efeitos psicoativos, mas possui efeitos terapêuticos importantes (BADOWSKI & PEREZ, 2016; VERTY *et al.*, 2011).

Figura 9 - Estrutura do THC



FONTE: Hanus (2016, p. 1972)

2.3 CBD

Outro fitocanabinoide de grande proeminência no contexto geral é o CBD. Ele é formado por um grupo resorcinol, um terpeno e uma cadeia de cinco carbonos (**Figura 10**). Essa estrutura química confere ao composto seu perfil panaceico, mas também características farmacocinéticas desfavoráveis. Por conseguinte, o perfil extremamente lipofílico, a instabilidade química, principalmente em ambientes ácidos e a difícil absorção são fatores que limitam a sua utilização como fármaco. No entanto, boa parte do uso antigo da planta e suas preparações eram associadas ao CBD, como, tratamento de dores diversas, antisséptico, anestésico e anti-inflamatório (MECHOULAM & HANUŠ, 2002; ZUARDI, 2008). Traçando uma linha do tempo observa-se que o composto foi isolado em 1940 e sua estrutura química foi elucidada somente em 1963. Os estudos sobre a ação e características do composto foram crescendo com o tempo e houve um crescimento significativo em meados dos anos 70-80, como observamos no gráfico mostrado na **Figura 11**, e um outro boom muito grande entre os anos 98-02 (MECHOULAM, 2014; ZUARDI, 2008). Considera-se que o primeiro pico

observado pode estar relacionado com a possibilidade do uso do CBD como anticonvulsivante, que foi demonstrado em um estudo desenvolvido por um grupo de pesquisadores brasileiros, em animais, e mais tarde em humanos (CARLINI *et al.*, 1973; CUNHA *et al.*, 1980). Outro boom ocorreu no início dos anos 2000, devido à descoberta do sistema endocanabinoide (MECHOULAM, 2014; ZUARDI, 2008).

Figura 10 - Estrutura do CBD

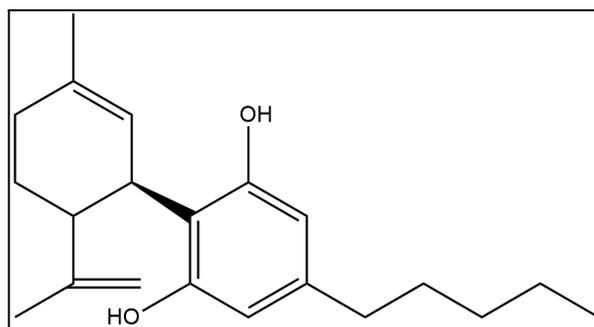
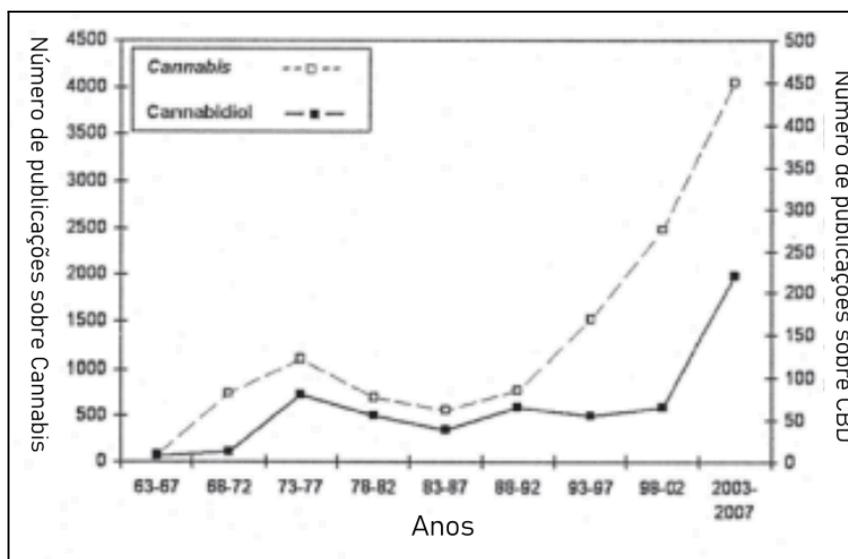


Figura 11 - Gráfico com o número de publicações sobre *Cannabis* e CBD de 1963-2007



FONTE: Zuardi (2008, p. 272)

Outrossim, o CBD também atua no SEC, atuando como antagonista nos receptores CB1 e agonista inverso nos receptores CB2. Pode também atuar no sistema por vias indiretas, como no bloqueio da recaptura da AEA e na inibição de sua degradação enzimática. Existem outras vias pelas quais o CBD pode atuar, como, por exemplo: a) ativando receptores 5-HT_{1a} e receptores derivados de glicina e bloqueando receptores acoplados à proteína G-55 (GPR-55); b) em receptores de canais iônicos transitórios vanilóides do tipo 1 (TRPV1), atuando no controle da sensibilização dos neurônios, sendo importante no tratamento de síndromes convulsivas; c) na via do sistema GABA Glutamato, sendo outra característica importante para sua ação anticonvulsivante (MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002). Há outros mecanismos de ação para o CBD em diversas vias, o que faz dele um composto usado em algumas terapias (WHO, 2017).

De toda forma, o CBD começou a ser pesquisado talvez pelo seu uso como antiepiléptico, e hoje possui maior aceitação no tratamento de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas do que os medicamentos tradicionalmente usados. Assim, os mecanismos elucidados primordialmente estavam associados à sua ação no sistema nervoso central (SNC), que é uma área importante da utilização do composto, se considerada sua ação neuroprotetora (CAMPOS *et al.*, 2016). Porém, há outras aplicações para o CBD, e algumas delas com base em sua ação como um potente antioxidante ou como modulador da inflamação, em que envolvem também diferentes vias de atuação, algumas já citadas anteriormente e outras ainda não elucidadas. Dessa maneira, o CBD apresenta vários mecanismos e aplicações terapêuticas (PISANTI *et al.*, 2017; RONG *et al.*, 2017).

2.3.1 Atividade antioxidante

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a disponibilidade das defesas antioxidantes. Os radicais livres são substâncias comuns no organismo humano, por exemplo, processos simples de respiração podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Como resultado desse desequilíbrio ocorre a oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A modificação nas membranas de biomoléculas destrói a sua interação molecular e as suas vias de sinalização, influenciando na regulação da homeostase dos tecidos e órgãos. Existem assim algumas condições patológicas que são

decorrentes do estresse oxidativo como câncer, doenças inflamatórias e neurodegenerativas (ATALAY *et al.*, 2019; BORGES & SILVA, 2017).

O CBD é um composto com uma longa cadeia alifática, um grupo terpeno e um sistema difenol (**Figura 9**), que conferem o perfil lipofílico e também a capacidade de neutralizar radicais livres. Acredita-se que as duas hidroxilas fenólicas são as grandes responsáveis pelo seu potencial antioxidante. Sendo assim, existem vários caminhos propostos pelos quais o CBD pode atuar na defesa oxidativa, um deles é a neutralização desses radicais livres por meio da quelação de metais de transição, que participam da reação de síntese de novos radicais hidroxila muito reativos, reação de Fenton. Outra via de ação é inibindo a formação de radicais superóxidos provenientes, principalmente, da ação de enzimas oxidases. Adicionalmente, o CBD atua estimulando outras vias antioxidantes, ora promovendo aumento da atividade desses mecanismos, ora fazendo-as atuar em diferentes níveis moleculares. Por conseguinte, o CBD promove a ativação do fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) que é responsável pela transcrição de genes com atividade citoprotetora e antioxidante (ATALAY *et al.*, 2019). Por outro lado, o CBD inibe a via de sinalização do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-kB) que, por sua vez, promove a transcrição dos genes da NO sintase induzida (iNOS) (ATALAY *et al.*, 2019; FOUAD *et al.*, 2020).

Além do mais, o fitocanabinoide inibe a mudança estrutural de biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídeos. Como resultado, os danos causados nas células por EROs são prejudiciais à estrutura das células. Por exemplo, a peroxidação lipídica leva a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, e a presença dos produtos do processo afeta diretamente no funcionamento e estrutura das membranas celulares. Além disso, alguns dos produtos podem interagir com os componentes nucleofílicos, como DNA e proteínas. Adicionalmente, o CBD protege lipídios e proteínas contra o dano causado pela oxidação, por meio da modulação do estresse oxidativo controlando as vias de sinalização dos fatores de transcrição descritos acima (ATALAY *et al.*, 2019; FOUAD *et al.*, 2020).

2.3.2 Ação antitumoral

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, sendo responsável por uma a cada seis mortes em 2018. A doença em questão acomete qualquer órgão ou tecido do corpo e é caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado de células, ultrapassando limites

celulares e invadindo outros órgãos. A metástase, que é o processo de invasão tumoral de tecidos saudáveis, é a principal causa de morte por câncer. Os órgãos mais acometidos em mulheres cis são ovários, útero, pulmão e colorretal, já em homens cis são pulmão, colorretal, próstata, estômago e fígado. Isso não exclui crianças e idosos de serem acometidos por diversos tipos de câncer. Existem diversas terapias para o tratamento do câncer, porém todas são invasivas e provocam efeitos adversos, por isso a busca por novos antineoplásicos efetivos e menos nocivos ainda é mandatória (SILVA, 2018; UPAHDHYAY, 2020; WHO, 2017).

O CBD já foi descrito como um possível fármaco antineoplásico em meados da década de 70. Ao contrário dos estudos mais recentes, a dose de administração era quase 10 vezes maior que a dose de uso padronizada atualmente, gerando dados negativos quanto à sua ação antitumoral (MECHOULAM *et al.*, 2007; ZUARDI, 2008; WHO, 2017). A partir dos anos 2000 com a descoberta do SEC, a ação voltou a ser considerada no campo clínico, considerando o ensaio feito por Jacobsson *et al.* (2000), que foi o pontapé inicial para o uso do CBD no tratamento do câncer, nesse caso sobre gliomas murino. Sendo assim, alguns anos e várias pesquisas posteriores, o CBD foi testado como agente antineoplásico, e como resultado ele foi capaz de interferir no poder proliferativo, invasivo e na viabilidade da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, possivelmente por meio da sua interação com os receptores CB₁ e TRPV1, além do aumento de EROs. Estudos em modelos murinos sugerem que o CBD diminui a ocorrência de metástase, crescimento tumoral e apoptose (FREIMUTH *et al.*, 2010; SOLINAS *et al.*, 2016). O composto demonstrou efeitos parecidos nas linhagens de leucemia humana, como leucemia mieloide aguda (HL-60), diminuindo a taxa de viabilidade celular e aumentando a produção de EROs (TORRES *et al.*, 2001). Todavia, o CBD é capaz de levar as o tecido a estado de sofrimento, ou seja, em que há limitação dos recursos vitais e a indução da morte celular nas linhagens tumorais descritas, ocorrendo por vias mecánísticas que sugerem sua atuação no receptor CB₂. Pode-se afirmar que *in vivo* a indução da apoptose é a forma de controle das células tumorais (SOLINAS *et al.*, 2016).

2.3.3 Potencial anti-inflamatório

A inflamação é o processo fisiológico no qual o organismo se protege de um elemento considerado estranho. Consiste em uma série de eventos extremamente importantes para a manutenção homeostática do corpo, defendendo-o da evolução de traumas e infecções. A

inflamação é caracterizada em cinco sintomas principais: dor, rubor, calor, edema e perda de função. Os processos inflamatórios requerem diversas células do sistema imune, neutrófilos, basófilos, monócitos e linfócitos B, dentre outros. Além disso, na inflamação é possível reconhecer o alvo e liberar os leucócitos específicos, e isso ocorre por meio de citocinas, eicosanóides e prostaglandinas. Entretanto, o processo inflamatório precisa encerrar, por isso ocorre uma série de eventos que levam a resolução do mesmo, porém em algumas condições patológicas ocorre a cronicidade da inflamação, em que não há resolução. Então, o ciclo inflamatório pode acontecer por toda a vida do paciente, como acontece na artrite, esclerose múltipla, psoríase e aterosclerose. Os tratamentos disponíveis se dividem entre as classes de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) e glicocorticóides. Todavia, há um amplo número de pacientes com doenças severas inflamatórias crônicas que não respondem aos tratamentos já existentes (PUNCHARD *et al.*, 2004), resultando em um grande problema clínico e socioeconômico, sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias, e o CBD está sendo extensivamente estudado com essa finalidade (FORMUKONG *et al.*, 1988).

Sendo assim, o CBD é um composto que demonstra potencial anti-inflamatório atuando em vias mecânicas diferentes, sendo que várias são vias inflamatórias. Nos receptores do SEC, atua nos dois tipos, todavia sua atuação nos receptores CB₂ é mais destacada em processos inflamatórios, já que estes receptores são mais expressos nas células do sistema imune. Atua, também, na mediação da redução da expressão de interleucina 6 (IL-6), ciclooxigenase 2 (COX-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), em modelos murinos de isquemia hipóxia. A mediação ocorre junto ao receptor de adenosina A_{2A}, no qual o CBD atua como um inibidor competitivo, e o bloqueio da ação do receptor leva a uma cascata de eventos que resulta na interrupção da produção de TNF α . Pode também se comportar como agonista de receptores PPAR γ , e, por meio desses receptores, o CBD pode modular os níveis de endocanabinoides. Os canais TRPV são regulados pelo CBD, aumentando os níveis de AEA, um agonista dos receptores TRPV1. Além disso, o CBD ativa os TRPV1, resultando na dessensibilização desses canais iônicos. O CBD também leva a diminuição do estresse oxidativo e morte celular em rins de camundongos (MECHOULAM *et al.*, 2002a; PAN *et al.*, 2009; SUNDA & AROWOLO, 2020). O composto inibe algumas enzimas geradoras de EROs, além de biomarcadores do estresse oxidativo, como por exemplo a NADPH-oxidase (NOX), resultando na diminuição das citocinas TNF α . Sendo assim, o CBD é um potencial

fármaco para tratamento de doenças envolvendo um processo inflamatório (ATALAY *et al.*, 2019).

2.3.4 Atividade contra dor neuropática

Além das atividades descritas acima, existe também o uso do CBD no tratamento da dor neuropática (DN). A dor neuropática é causada por danos ou doenças no sistema somatossensorial, e a sintomatologia se manifesta como hiperalgesia, aumento da dor a um estímulo, alodinia, que é a sensação de dor em situações onde ela não deveria estar presente. A causa da DN é diversa, podendo ser infecciosa, medicamentosa, inflamatória ou associada a alguma condição ou doença. Sendo classificada em DN decorrente de uma lesão ou doença periférica, como quimioterapia, e DN causada por lesão ou doenças no SNC, por exemplo, AVC. O tratamento da DN é feito por meio de algumas classes de fármacos, sendo a pregabalina o padrão ouro. Mesmo assim, não existe ainda fármaco considerado seguro e eficaz para o tratamento da DN, que é caracterizada por danos irreversíveis no sistema somatossensorial. Assim, pode-se inferir a necessidade de novos fármacos que possibilitem o tratamento e cura das lesões, sem que estes causem efeitos adversos aos pacientes. O CBD é estudado como uma alternativa terapêutica no tratamento da DN e demonstra resultados satisfatórios, tanto no controle dos sintomas, quanto na regeneração das células atingidas (CAVALLI, *et al.*, 2019; COLOCA *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017).

Como descrito anteriormente, a DN pode ser ocasionada por diversos fatores. DN pode ser ocasionada pelo uso de quimioterápicos, como o paclitaxel (PAC). Apesar de ser a principal terapia para a cura ou redução de sintomas, a quimioterapia também causa efeitos adversos, que vão além da DN induzida por quimioterápicos (DNIQ), como náuseas, enjoos e supressão da medula óssea. Cerca de 60% dos pacientes em tratamento quimioterápico manifestam DNIQ, levando à descontinuidade do tratamento (SISIGNANO *et al.*, 2014). O PAC, por exemplo, é usado como agente antineoplásico no tratamento de câncer de pulmão, mama e ovário. Além disso, um dos principais efeitos associados ao uso do PAC é a neurotoxicidade, que acontece devido à interrupção da função dos microtúbulos neurais, alteração do transporte axonal, levando à mudança na excitabilidade e mantendo a sobrevivência dos neurônios sensoriais. Quimioterápicos promovem danos à mitocôndria resultando na perda do seu potencial de membrana. Além disso, existem outros mecanismos

que comprovam o efeito do uso de quimioterápicos na produção da dor. É importante ressaltar que existem outras classes de fármacos antineoplásicos, como os alcalóides da Vinca, taxanos e oxaliplatina que também podem provocar DN como consequência do seu uso no tratamento do câncer (CAROZZI *et al.* 2015).

A DNIQ é tratada com fármacos como, por exemplo, a pregabalina e a gabapentina, análogos do GABA, usados no controle e tratamento de convulsões. Esses fármacos são considerados padrão-ouro no tratamento da DN, e devido à semelhança estrutural ao neurotransmissor, se ligam aos canais iônicos reduzindo a entrada de Ca^{2+} nas células mediando a sensação da dor. Por outro lado, o CBD demonstra potencial analgésico, além do potencial antineoplásico. Assim, o CBD atua por meio do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. A serotonina é um neurotransmissor relacionado a processos de dor, depressão e ansiedade, e a ação do CBD envolve a mediação da ativação do receptor no SNC e o sistema nervoso periférico (SNP), regulando a excitabilidade dos neurônios e a liberação do neurotransmissor. O CBD possui afinidade moderada ao receptor TRPV1, que atua como modulador da dor. Ao contrário dos efeitos anti-inflamatórios, os receptores CB estão envolvidos na ação neuroprotetora e analgésica do CBD (ALMEIDA & DEVI, 2020; CAVALLI *et al.*, 2019; GREGORIO *et al.*, 2019).

Outro ponto importante a ser considerado tendo em vista a potencial administração do CBD concomitantemente ao PAC, seria a interação medicamentosa. Ward e colaboradores (2011) descrevem que não há interação entre este quimioterápico e o CBD. Pelo contrário, observa-se uma ação sinérgica dessa associação, resultando em uma redução da viabilidade das células tumorais (WARD *et al.*, 2011).

2.4 Derivados e análogos do CBD

É inegável a vasta possibilidades de usos e as diversas vias de atuação do CBD, mas há também dificuldades técnicas na manutenção da sua estabilidade e administração. Existem medicamentos utilizados fora do Brasil à base de CBD, como o Sativex, conhecido no Brasil como Metavyl, que consiste em uma mistura 1:1 de CBD e THC, com aplicação no tratamento de algumas doenças inflamatórias, como a esclerose múltipla (EM). O medicamento contendo CBD puro é o Epidiolex, considerado um medicamento órfão para síndromes convulsivas

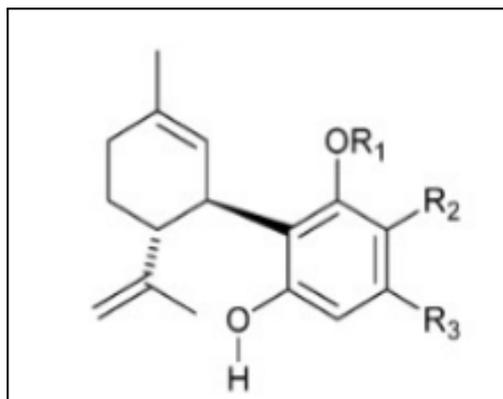
severas, como Lennox-Gastaut e Dravet (ANVISA, 2017; WHO, 2017). Ambos os medicamentos são oferecidos à base de óleo, devido à natureza do composto, altamente lipofílica. Adicionalmente, o CBD também pode provocar efeitos adversos em dosagens maiores que 20 mg/kg, como aumento de transaminases hepáticas e sonolência (FDA, 2018). O CBD apresenta baixa estabilidade em meio ácido, podendo sofrer uma ciclização transformando-se, no estômago, em THC e CBN (WATANABE *et al.*, 2007). Torna-se então urgente o planejamento de análogos do CBD que apresentem melhores características físico-químicas e estabilidade, permitindo assim o seu uso por via oral em menores dosagens, evitando alguns efeitos adversos e aumentando a biodisponibilidade (HANUS *et al.*, 2016).

O planejamento de análogos de substâncias com atividade biológica promissora consiste em uma estratégia muito utilizada para otimização da estrutura química de forma a superar algumas limitações, como é o caso do CBD. O fato é que o CBD já possui derivados e análogos em ensaios clínicos, já usados como medicamento órfão para algumas doenças raras. Os análogos do CBD obtidos de fonte natural ou sintética, de um modo geral, apresentam resultados animadores (MORALES *et al.*, 2017).

Mais de 100 fitocanabinoides são isolados da *Cannabis* e dentre eles há sete classificados como *CBD-type*, incluindo o CBD. Eles possuem o mesmo esqueleto estrutural do CBD, como observado na **Figura 12**, mantendo a configuração R nos centros quirais. Esses compostos são sintetizados naturalmente na planta (**Figura 13**), sendo o ácido canabidiólico (CBDA) e o ácido canabidivarínico (CBDVA-C3) derivados carboxilados em C3', os compostos canabidiorcol (CBD-C1), nor-CBD (CBD-C4), e canabidivarina (CBDV), possuindo a mesma estrutura base e se diferenciando pelo tamanho da cadeia lateral em C4', e o éter monometil do CBD (CBDM), um análogo contendo um grupo metoxila em C6'. Cabe ressaltar que existem outros compostos sintetizados naturalmente na erva, além de metabólitos oriundos da degradação do CBD e seus análogos. O CBE (**Figura 14**) é um metabólito encontrado na planta, resultante do metabolismo do CBD e CBDA. A degradação do composto no organismo humano gera também uma série de metabólitos a partir da ação das enzimas CYP450, como os metabólitos CBD-7-COOH e CBD-7-OH, oriundos da oxidação do carbono em C-7 em ácido carboxílico e hidroximetileno, respectivamente (**Figura 14**). Outro metabólito que é formado a partir da conjugação da hidroxila fenólica em C-1' com o ácido glicurônico é o metabólito CBD-1'-O-glicuronídeo (**Figura 14**). A ação desses compostos é

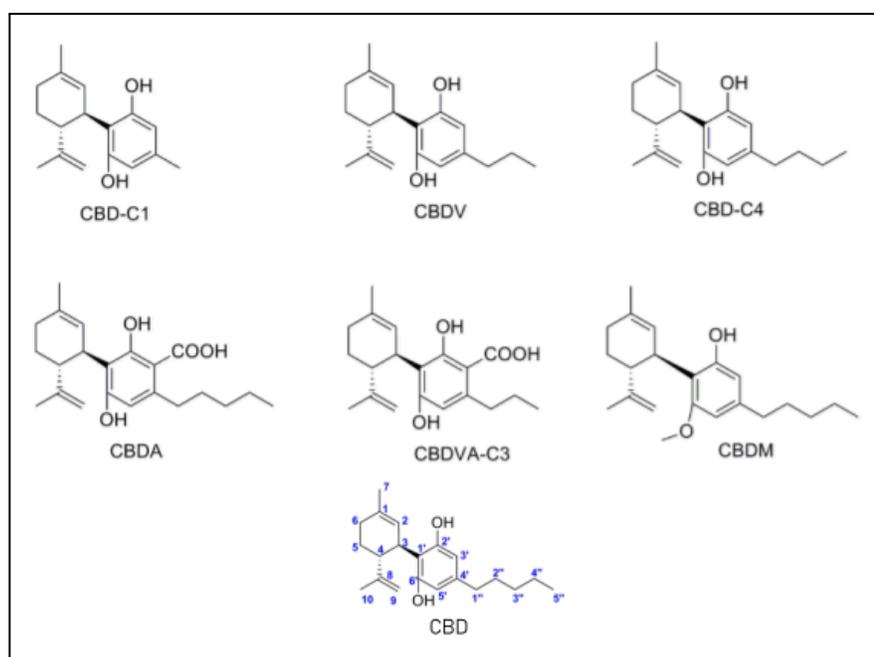
estudada buscando elucidar a sua aplicabilidade terapêutica, assim como a observada para o CBD (HANUS *et al.*, 2016; MORALES *et al.*, 2017a).

Figura 12 - Esqueleto estrutural do CBD



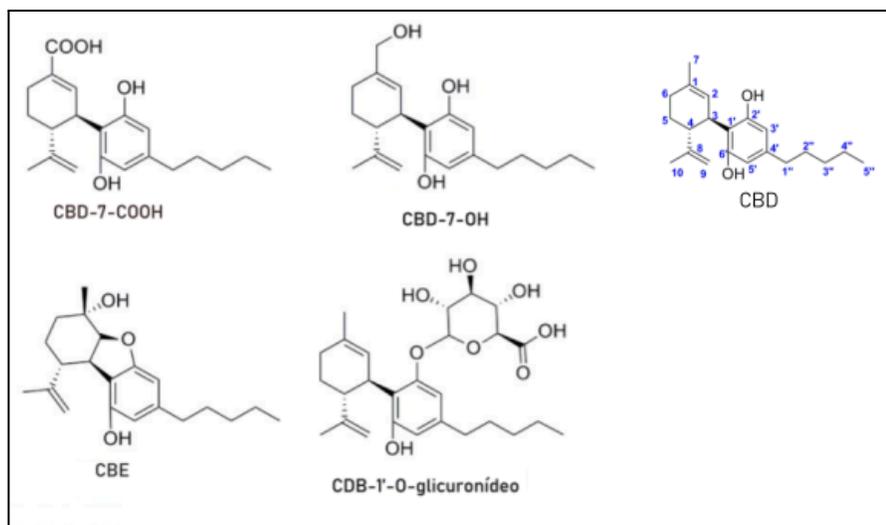
FONTE: Hanus *et al.* (2016, p. 1360 e 1370)

Figura 13- Derivados naturais do CBD



FONTE: Morales *et al.* (2017a, p.3)

Figura 14 - Derivados sintéticos do CBD



FONTE: Morales *et al.* (2017a, p.3)

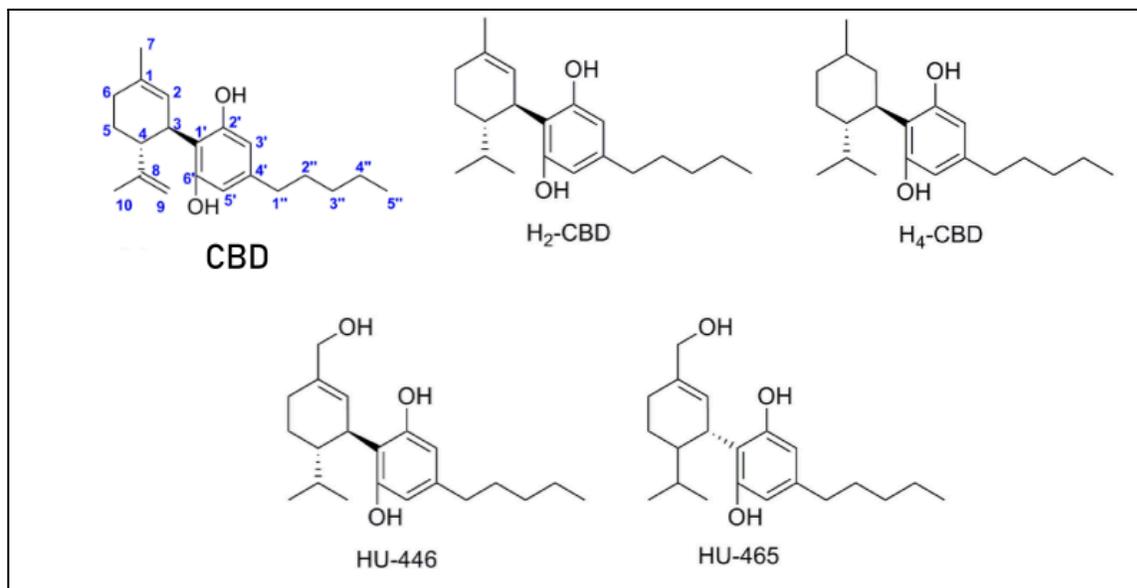
Diversos análogos, cujas estruturas químicas apresentam um padrão similar à do CBD, e derivados obtidos diretamente a partir do CBD, são planejados e sintetizados para avaliação de seu potencial farmacológico. Dessa forma, a estrutura química do CBD e de seus metabólitos vem sendo usadas como modelo para o planejamento de novas substâncias e já existem vários compostos sintetizados nesse contexto. Dentre análogos e derivados, os compostos sintéticos são de extrema importância na obtenção de compostos que expressem atividades mais proeminentes que o CBD. Devido ao grande número de compostos sintetizados laboratorialmente, alguns desses serão apresentados a seguir segundo as alterações feitas na estrutura do CBD, sendo que algumas alterações permitem modular o perfil farmacocinético observado no CBD. Sendo assim, a obtenção de derivados e análogos do CBD de forma sintética é essencial na busca por novos compostos multifacetados (ELSOHLY *et al.*, 2017; MORALES *et al.*, 2017). O potencial biológico de algum desses compostos será discutido a seguir.

2.4.1 Potencial biológico de derivados e análogos de origem natural ou sintética

O CBDA (**Figura 12**), derivado ácido carboxílico do CBD, inibe de forma seletiva a COX-2 e, portanto, teria um potencial para ser utilizado como anti-inflamatório (TAKEDA *et al.*, 2008). Complementarmente, o CBDA também promove a inativação da enzima FAAH e inibe a recaptura de AEA atuando no controle da dor, além de possuir afinidade moderada nos receptores GPR55 e TRPA1 (TAKEDA *et al.* 2016). O CBDV (**Figura 13**), análogo natural do CBD contendo uma cadeia *n*-propila, também possui afinidade pelos receptores dos canais TRPA1, que além de atuar no controle da sensação de dor, tem um papel importante no manejo de estados convulsivos (HILL *et al.*, 2012). Adicionalmente, a atividade antitumoral destes compostos é extensivamente pesquisada. Dessa forma, o CBDA (**Figura 13**) promove a inibição da migração celular em linhagens de câncer de mama agressivas, MDA-MB-231, alterando a atividade enzimática da linhagem (TAKEDA *et al.*, 2012).

Os derivados CBD-H₂, CBD-H₄, HU-446 e HU-465 (**Figura 15**) obtidos por hidrogenação parcial ou total das ligações duplas do CBD manifestam efeitos relacionados à redução de EROs, podendo ser utilizados como antioxidante, além de inibirem a produção de NO e secreção TNF, demonstrando sua ação como anti-inflamatórios. Vale ressaltar que os epímeros em C-3 do CBD também apresentaram atividade anti-inflamatória na secreção de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO (BURSTEIN, 2015; KOZELA *et al.*, 2015).

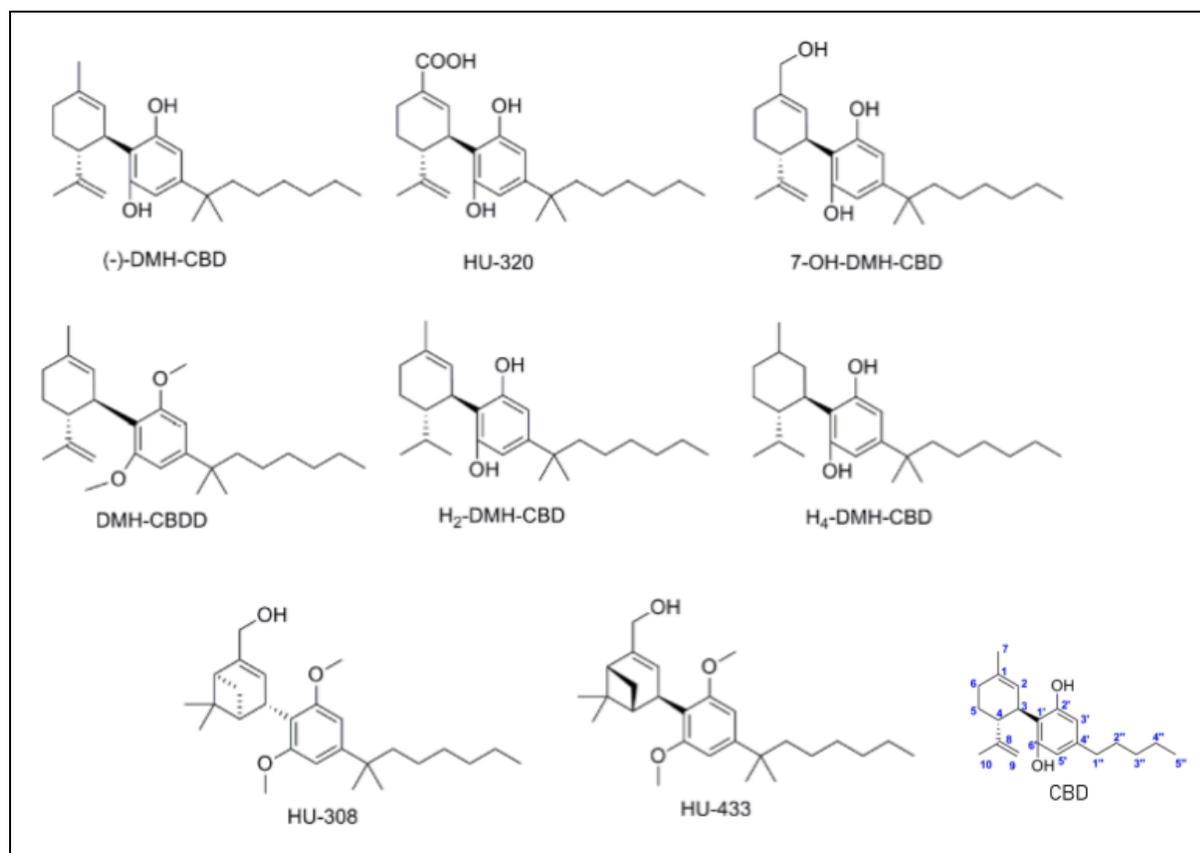
Figura 15 - Estruturas dos derivados hidrogenados do CBD



FONTE: Morales *et al.* 2017a.

Diversos derivados dimetilados no carbono C-1'' da cadeia lateral do CBD também foram sintetizados (**Figura 16**) e evidenciaram atividade anti-inflamatória em células microgliciais humanas e células T (BEN-SHABAT *et al.*, 2006). Os derivados dimetilados do CBD (**Figura 16**) apresentam efeitos antiproliferativos em leucemia mielóide aguda humana (JUKNAT *et al.*, 2016; PETRONZI *et al.*, 2013). Além disso, o derivado dimetoxilado HU-308 (**Figura 16**) demonstrou potencial modulando sintomas causados pela ação dos receptores CB2 no SNC, sendo o receptor que o composto possui atividade. Dessa forma o HU-308 apresenta melhoria dos sintomas de hipertensão, aumento de sangue nas fezes, inflamação e a dor periférica (HANUS *et al.*, 1999).

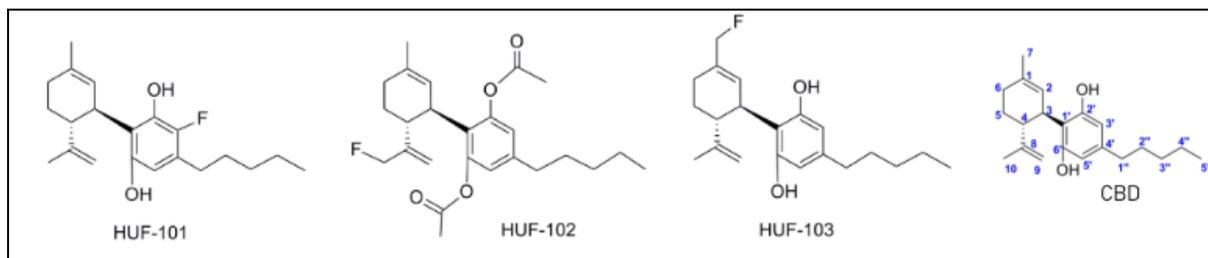
Figura 16- Estrutura dos derivados dimetilados do CBD



FONTE: Morales *et al.* (2017, p.3)

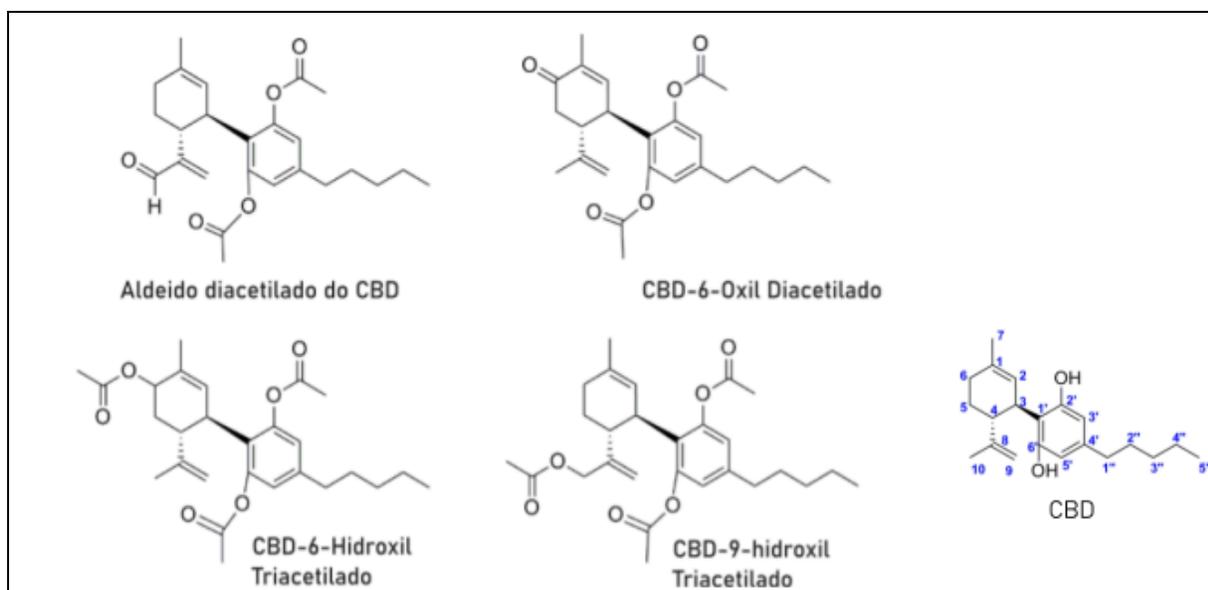
Os derivados fluorados do CBD, HUF-101, HUF-102 e HUF-103 (**Figura 17**) manifestaram um potencial neuroprotetor extremamente favorável, assim como os derivados di- e triacetilados (**Figura 18**), que por sua vez também demonstraram potencial anticonvulsivante (BREUER *et al.*, 2016; DE PETROCELLIS *et al.*, 2011; HILL *et al.*, 2012).

Figura 17- Estrutura dos derivados fluorados do CBD



FONTE: BREUER *et al.* (2016)

Figura 18- Estrutura dos derivados di- e triacetilados do CBD



FONTE: CARLINI *et al.* (1975)

Cabe ressaltar que os compostos estruturalmente semelhantes ao CBD, geralmente apresentam um padrão de afinidade pelos receptores CB parecido com o CBD. O mesmo se aplica aos outros receptores nos quais este fitocanabinoide atua. Todavia, o mecanismo de ação de diversas substâncias já propostas precisa ser elucidado, além de sua segurança e propriedades farmacocinéticas. Como exemplo pode-se citar o derivado halogenado HUF-101 (**Figura 17**) que exibiu um potencial anticonvulsivante mais satisfatório que o CBD, conhecido por sua ação no controle de convulsões, todavia é preciso atenção a possíveis efeitos adversos (BREUER *et al.*, 2016; MORALES *et al.*, 2017a).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Avaliar a atividade dos derivados e análogos do CBD, sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica, como antitumoral, anti-inflamatório e antioxidante, por meio de testes *in vitro*, e ensaios *in vivo* para avaliação de sua ação nociceptiva.

3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar o perfil antioxidante de derivados e análogos por métodos de detecção colorimétricos, acusando a oxidação dos reagentes FRAP, DPPH e ABTS;
2. Avaliar o perfil citotóxico de quatro análogos e quatro derivados nas linhagens de células de leucemia mielóide crônica (K-562), leucemia monocítica aguda (THP-1) e adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231);
3. Averiguar o potencial anti-inflamatório de dois derivados e dois análogos do CBD em macrófagos murinos do tipo RAW 264.7, estimulados com LPS, por meio da dosagem indireta do óxido nítrico e de citocinas;
4. Explorar a atividade do análogo **RAC6** em modelo murino de dor neuropática induzida pelo quimioterápico paclitaxel (PAC).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos análogos e derivados do CBD

Os derivados (**Figura 19**) e análogos (**Figura 20**) do CBD foram sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo, então, mestrando Gabriel Vitor de Lima Marques, com exceção do olivetol (OLV) que foi obtido de fonte comercial.

Figura 19 - Estruturas químicas e respectivos códigos de identificação dos derivados do CBD estudados neste trabalho

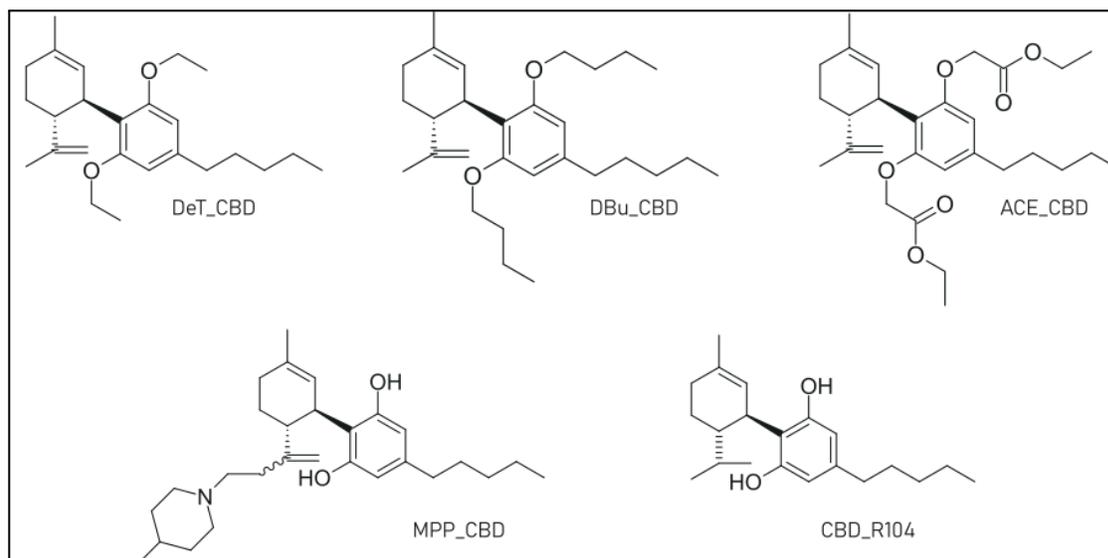
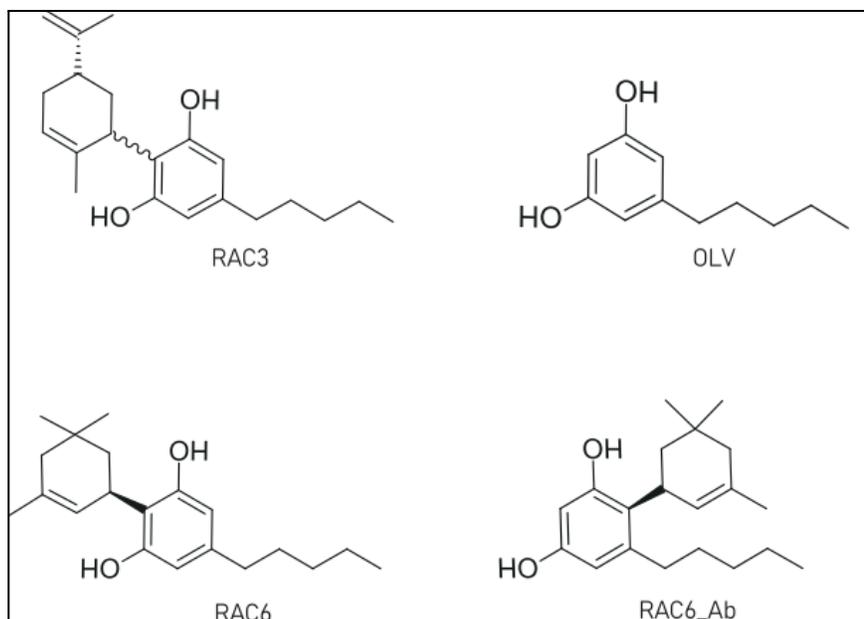


Figura 20 - Estruturas químicas e respectivos códigos de identificação dos análogos do CBD estudados neste trabalho



Na **Tabela 2** vê-se o rendimento, a caracterização físico-química e a referência bibliográfica para síntese das substâncias (MARQUES et al., 2023).

Tabela 3 - Descrição dos parâmetros descritivos das substâncias sintéticas (continua)

Substância	Rendimento (%)	Características Físico-química	logP	Referência Bibliográfica
DeT_CBD	95,3%	óleo amarelado, lipossolúvel	0,54	MARQUES et al., 2023
DBu_CBD	67,6%	óleo laranja	7,89	MARQUES et al., 2023
ACE_CBD	72,3%	óleo laranja	6,20	MARQUES et al., 2023
MPP_CBD	95%	óleo roxo ou semi-sólido amarelo, hidrossolúvel	3,73	MARQUES et al., 2023

Tabela 4 - Descrição dos parâmetros descritivos das substâncias sintéticas
(conclusão)

Substância	Rendimento (%)	Características Físico-química	logP	Referência Bibliográfica
CBD_R104	93,7%	óleo laranja	3,43	MARQUES et al., 2023
RAC3	41%	óleo laranja	6,54	MARQUES et al., 2023
RAC6 / RAC6_Ab	17,9%	óleo laranja	3,4	MARQUES et al., 2023

4.2 Avaliação da atividade antioxidante

A análise do potencial antioxidante dos compostos foi avaliada utilizando três métodos químicos diferentes, *Ferric reducing antioxidant power* (FRAP), por redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e do 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Esses testes permitem avaliar a capacidade de captura de radicais livres pela molécula que está sendo testada. Os experimentos descritos a seguir foram realizados em parceria com a Me. Elaine Carvalho Minighin, sob a supervisão da Profa. Renata Adriana Labanca do Depto. de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.2.1 FRAP

O procedimento foi realizado em triplicata com base no método descrito por Bhullar et al. (2013), Rufino et al. (2006) com algumas modificações.

A solução do reagente FRAP foi preparada utilizando as seguintes soluções: tampão acetato pH 3,6 (300 mM), solução de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (10 mM) e cloreto férrico hexahidratado (20 mM) na proporção 10:1:1. O preparo da solução de acetato pH 3,6 (300 mM) foi feita com a dissolução de 3,1 g de acetato de sódio trihidratado em 16 mL de ácido acético glacial num balão volumétrico de 1 L, e então seu volume completado para 1 L com água destilada. O armazenamento dessa solução foi feito em frasco âmbar, à temperatura ambiente. Já para preparar a solução de TPTZ (10 mM), dissolveu-se 3,12 g de reagente TPTZ

em uma solução de HCl (40 mM) em um balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume do balão com a mesma solução. Essa solução foi armazenada sob refrigeração e ao abrigo da luz, até o momento da análise. O cloreto de ferro tetra hidratado (20 mM) foi preparado em um balão volumétrico de 1 L, onde foram dissolvidos 5,4 g do reagente em água destilada e o volume do balão foi completado com o mesmo solvente. A solução foi armazenada em um frasco âmbar e sob refrigeração.

As substâncias **DeT_CBD**, **DBu_CBD**, **ACE_CBD**, **MPP_CBD**, **CBD_R104**, **RAC3** e **OLV** foram pesadas entre 2 a 3 mg e diluídas em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) no dia do experimento. Para determinar a concentração de cada amostra, em mM, foi feito um cálculo de concentração seguindo a **Equação 1**, em que m representa a massa da substância, em mg, n massa molecular, em g/mol, e V é o volume da diluição, de 0,5 mL. A condução do experimento se deu com a reação das substâncias e o reagente FRAP, que precisa ser preparado no dia do experimento. Para tal, transferiu-se 90 μ L das amostras diluídas em DMSO para um tubo plástico de fundo cônico de 15 mL, protegido da luz. Em seguida, foram adicionados 270 μ L de DMSO e 2,7 mL de solução reagente de FRAP, depois os tubos foram homogeneizados no vortex por 30 segundos e levados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, as leituras foram feitas no comprimento de onda 595 nm no espectrofotômetro UV-VIS Micronal (modelo AJX-1900), considerando a leitura da solução de FRAP como branco.

Equação 1 - Fórmula para o cálculo de concentração

$$C = ((m/n).1000)/V$$

A atividade antioxidante das substâncias foi calculada usando a curva padrão do padrão Trolox, um antioxidante análogo da vitamina E. A solução de Trolox foi preparada em balão volumétrico âmbar de 50 mL, sendo transferidos 25 mg de Trolox dissolvidos em 5 mL DMSO e o volume completado para 50 mL, resultando numa solução de concentração de 2 mM. Para a determinação da curva padrão, a solução de Trolox foi diluída para as concentrações 900, 700, 500, 300 e 100 μ M. Dessa forma, a diluição foi feita em DMSO, segundo mostrado na **Tabela 3**, em eppendorfs de 2 mL devidamente protegidos de luz. A

leitura dos padrões, semelhante às substâncias, foi realizada em tubos plásticos de fundo cônico de 15 mL, protegidos de luz, com 90 μL de cada solução do padrão a 100, 300, 500, 700 e 900 μM , 270 μL de DMSO e 2,7 mL da solução FRAP. Cada tubo foi homogeneizado por 30 segundos e depois mantido em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, a leitura dos tubos foi feita imediatamente no espectrofotômetro UV-VIS Micronal (modelo AJX-1900) no comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 5 - Escala de diluição da solução de Trolox para construção da curva-padrão

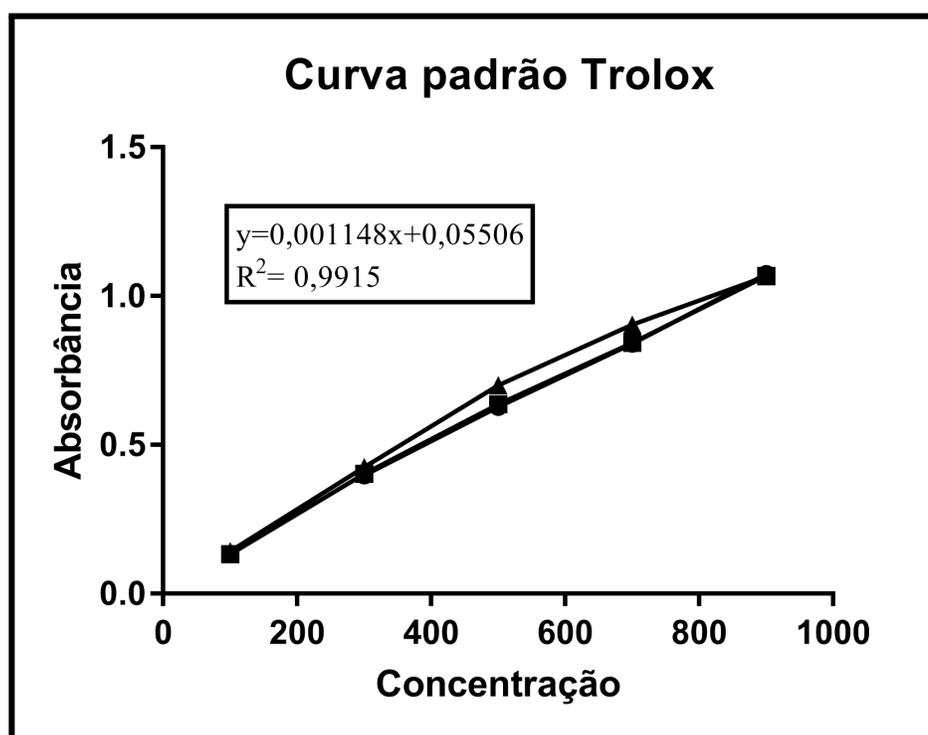
	Solução padrão de Trolox (2mM) (μL)	DMSO (μL)	Concentração final (μM)
1	50	950	100
2	150	850	300
3	250	750	500
4	350	650	700
5	450	550	900

A curva-padrão (**Figura 21**) é uma função de primeiro grau, em que se tem pontos diferentes do gráfico formando uma reta, e, a partir disso, calcula-se a equação da reta, como a **Equação 2**. Então, obtendo-se o valor de a e b consegue-se determinar qualquer valor x e y . Com as absorbâncias obtidas das leituras no eixo y , e suas respectivas concentrações no eixo x , plotou-se o gráfico (**Figura 21**) e obteve-se a equação com os valores de a e b . Além da equação da reta, realizou-se o cálculo do coeficiente de determinação, R^2 , que representa a proporção de variabilidade da variável y sobre a regressão da variável x . Sendo assim, o valor de R^2 precisa ser acima de 0,9. Na **Figura 21** nota-se a equação da reta do gráfico, $y = 0,001148x + 0,05506$, e o $R^2 = 0,9915$. Por fim, a partir dos valores de absorbância e concentração das substâncias testadas, usou-se a fórmula para determinar o equivalente de Trolox de cada substância. Dessa forma, os resultados foram obtidos em μM de Trolox/mM de substâncias.

Equação 2 - Equação da reta

$$y = ax + b$$

Figura 21 - Gráfico com curva-padrão de Trolox. O eixo y é a absorbância e o eixo x demonstra as concentrações correspondentes. Está apresentado no gráfico a equação da reta e o valor de R^2 . As três curvas representam os resultados da leitura das soluções preparadas em triplicata e os valores obtidos são resultado da média dos valores.

**4.2.2 DPPH**

O experimento de captura do radical livre DPPH foi realizado, em triplicata, com base no descrito por Bhullar et al (2013) e Rufino et al (2007a) com modificações. Inicialmente, foi preparada a solução reagente de DPPH na concentração 0,2 mM. Em um balão volumétrico de 100 mL, diluiu-se 0,8 mg do radical DPPH em 5 mL de DMSO, e então o volume foi

completado para 100 mL utilizando DMSO. Essa solução foi preparada no dia da análise e armazenada em um frasco âmbar, devido sua fotossensibilidade.

As substâncias **DeT_CBD**, **DBu_CBD**, **ACE_CBD**, **MPP_CBD**, **CBD_R104**, **RAC3**, **OLV** e **RAC6** foram pesadas entre 1 a 2 mg em eppendorfs devidamente envoltos por papel alumínio solubilizadas em 1 mL de DMSO e homogeneizadas por 40 segundos no vórtex. Essa solução estoque foi utilizada para o preparo da solução de uso, cuja concentração foi de 0,6 mM de cada substância. Para realizar a diluição para o preparo da solução de uso foram feitos dois cálculos, um deles foi o mesmo cálculo usado para encontrar as concentrações das substâncias no ensaio de FRAP, como observado na **Equação 1 (p. 55)**, no qual m representa a massa da substância, em mg, n a massa molecular, em g/mol, e V é o volume da diluição, em mL. Então para encontrar o volume a ser usado da solução estoque utilizou-se a seguinte **Equação 3**, em que V_i é o volume que precisa ser retirado da solução estoque das substâncias, em mL, C_f é a concentração final de 0,6 mM, V_f é o volume final de 1 mL, e o C_i a concentração da solução estoque. Após os cálculos, a diluição foi realizada para o volume final de 0,5 mL de solução de uso, nos eppendorfs de 2 mL cobertos com papel alumínio e homogeneizados por 40 segundos. Em seguida, em tubos falcon de 15 mL cobertos por papel alumínio, adicionou-se 300 μ L da solução de 0,3 mM de cada substância e 1,8 mL do reagente de DPPH. Os tubos foram agitados e seu conteúdo homogeneizado no vortex por 30 segundos e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e sob abrigo de luz. Logo ao fim do período de incubação, foi feita a leitura dos tubos no espectrofotômetro UV-VIS Micronal (modelo AJX-1900), no comprimento de onda de 517 nm. O ensaio também contou com a leitura do DMSO como branco e a solução do DPPH como controle do reagente.

Equação 3 - Cálculo do volume da solução

$$V_i = (C_f \cdot V_f) / C_i$$

Uma solução de 25 mg de Trolox em 50 mL de DMSO foi preparada em um balão volumétrico (concentração 2 mM). Em seguida, 50 μ L desta solução foram transferidos para um eppendorf de 2 mL, encapado com papel alumínio, o volume foi completado com 950 μ L de DMSO e, então, homogeneizou-se por 30 segundos no vórtex. O Trolox foi preparado para

ser utilizado como controle positivo no experimento na concentração de 0,6 mM, sendo, posteriormente, feita a diluição para isso.

Para determinar os resultados foi a porcentagem da atividade antioxidante (%AAT) foi calculada por meio da **Equação 4**, em que A_{con} representa a absorbância do controle, que nesse caso é a leitura da solução de DPPH (0,2 mM) e a A_{am} é a absorbância das substâncias. Após o cálculo obtém-se a porcentagem de cada substância na redução do radical DPPH. Uma solução de DMSO puro foi usado como branco.

Equação 4 - Cálculo da porcentagem da atividade antioxidante

$$\%AAT = ((A_{con} - A_{am})/A_{con}). 100$$

4.2.3 ABTS

O teste de captura do radical livre ABTS^{•+} foi realizado, em triplicata, de acordo com os métodos propostos por Re *et al* (1999) e Rufino *et al* (2007b), com modificações. A solução reagente consiste em uma mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio, que permite a formação do radical a ser reduzido pelas substâncias. A solução estoque de ABTS, na concentração de 7 mM, foi preparada em balão volumétrico de 50 mL, dissolvendo-se 192 mg de ABTS em água destilada e o volume foi completado do balão com água destilada. A solução foi homogeneizada, transferida para um frasco âmbar e mantida sob refrigeração. A solução de persulfato de potássio (24,5 mM) foi preparada em balão volumétrico de 10 mL, foram solubilizados 66,2 mg de persulfato de potássio em água destilada, e o volume do balão completado para 10 mL com a água destilada. A solução de persulfato foi homogeneizada, transferida para um frasco âmbar e armazenada sob refrigeração. Ambas as soluções devem ser utilizadas no prazo de um mês. A solução reagente de ABTS foi, então, preparada, transferindo-se para um becker, com o auxílio de pipeta, 1 mL de solução estoque de ABTS, 1 mL de solução de persulfato de potássio e 8 mL de água destilada. Após homogeneização, a solução reagente de ABTS foi transferida para um frasco âmbar e incubada, em abrigo de luz e temperatura ambiente, por 16 horas antes do uso. Devido à instabilidade dos reagentes essa solução estoque deve ser usada em até no máximo, 24 horas. Adicionalmente, uma alíquota da solução reagente de ABTS foi diluída em DMSO, antes do

seu uso com as substâncias de forma a manter a leitura de absorbâncias entre aproximadamente 0,680 a 0,720, no comprimento de onda 734 nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro UV-VIS Micronal (modelo AJX-1900).

As substâncias **DeT_CBD**, **DBu_CBD**, **ACE_CBD**, **MPP_CBD**, **CBD_R104**, **RAC3**, **OLV** e **RAC6** foram pesadas entre 1 a 3 mg em tubos eppendorfs de 2 mL e solubilizadas em 1 mL de DMSO. Posteriormente, essa solução estoque foi diluída de forma a se obter uma solução com a concentração final de 0,3 mM de cada substância. Sendo assim, em eppendorfs de 2 mL envolvidos em papel alumínio, foi adicionado um volume de cada solução estoque e o restante foi completado com DMSO até o volume final de 1 mL. Para o cálculo do volume de solução estoque utilizou-se as duas seguintes fórmulas, primeiro para determinar a concentração da solução estoque, a primeira foi a **Equação 1 (p. 55)**, no qual m representa a massa da substância, em mg, n a massa molecular, em g/mol, e V o volume da solução final, como dito anteriormente 1 mL. Em seguida, foi calculado o volume a ser usado da solução estoque usando a **Equação 3**, em que V_i é o volume que precisa ser retirado da solução estoque das substâncias, em mL, C_f é a concentração final de 0,3 mM, V_f é o volume final de 1 mL, e o C_i é a concentração inicial encontrada na solução estoque das substância. Após feitas as diluições, 20 μ L de cada solução de amostra foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL protegido da luz, e adicionou-se 2 mL da solução reagente de ABTS. A mistura foi homogeneizada e incubada, ao abrigo de luz e temperatura ambiente, por 6 minutos imediatamente antes da leitura. A leitura foi feita no espectrofotômetro UV-VIS Micronal (modelo AJX-1900), no comprimento de onda de 534 nm.

Uma solução de Trolox na concentração de 0,3 mM foi utilizada como controle positivo para o teste, seguindo as concentrações das substâncias, ela foi então diluída de uma solução estoque. Preparou-se então esta solução na concentração de 2 mM em um balão volumétrico âmbar de 50 mL foram adicionados 25 mg do reagente, dissolvidos em 2 mL de DMSO e, em seguida, o volume do balão foi completado 50 mL com DMSO e homogeneizado.

O DMSO foi usado como branco no experimento, como referência limiar da leitura.

Os resultados da leitura foram expressos em %AAT seguindo a mesma equação usada no ensaio do DPPH (**Equação 4**), em que A_{con} representa a absorbância do controle, que nesse caso foi a leitura da solução reagente de ABTS diluída, A_{am} é a absorbância das soluções das

substâncias. Dessa forma, o resultado expressa a porcentagem do potencial de redução das substâncias do radical ABTS.

4.3 Avaliação da atividade antitumoral

Os ensaios a seguir foram feitos em colaboração com o doutorando Tulio Resende Freitas, auxiliado pela Me. Thaís Salviana Ribeiro, e a aluna de iniciação científica Anna Clara Ventura Fonseca, todos coordenados Professor Adriano de Paula Sabino, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.3.1 Linhagens celulares K-562, THP-1 e MDA-MB-231

As linhagens celulares humanas utilizadas para análise de citotoxicidade K-562 (leucemia mieloide crônica, ATCC® CCL-243TM); THP-1 (leucemia monocítica aguda, ATCC® TIB-202TM) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano, ATCC® HTB-26TM) foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram mantidas em frascos T25 de cultura, contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM HEPES, pH 7,4, em estufa umidificada, a 37 °C e com 5% CO₂, até a realização dos ensaios propostos.

4.3.2 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade das substâncias CBD, DeT_CBD, DBu_CBD, CBD_MPP, CBD_R104, OLV, RAC3, RAC6, RAC6_Ab, em linhagens celulares foi avaliada pelo ensaio do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol]. Para cálculo da viabilidade celular fez-se a leitura da absorbância a 550 nm em um leitor de ELISA (Biotek, Winooski, Vermont, EUA).

Para o ensaio da viabilidade celular as células foram centrifugadas a 70 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido com meio completo transferido para uma placa de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poço. A placa foi incubada em estufa de CO₂, a 37 °C e atmosfera úmida de CO₂ a 5% por 24 horas.

Para a montagem da placa, tanto os compostos a serem testados quanto os controles positivos (imatinib, citarabina e doxorrubicina) foram diluídos em meio de cultivo, contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) e adicionados à placa nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL. Após 48 horas de incubação, adicionou-se 100 µL do sal tetrazólico MTT na concentração de 0,5 mg/mL. Em seguida, a placa foi incubada, na estufa nas condições de cultivo, por um período de 3 horas. Após o tempo de incubação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância por poço foi medida a um comprimento de onda de 550 nm utilizando o Gen5 (Data Analysis Software - Bio-Tek).

Os dados foram analisados a partir de dois experimentos independentes. A concentração mínima que inibiu em 50% a viabilidade celular (CI_{50}) na presença dos compostos testes foi determinada pela comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100% viáveis).

4.3.3 Determinação do CI_{50} para as linhagens celulares

A concentração inibitória da viabilidade celular em 50% foi obtida por meio de uma curva dose-resposta, em função da regressão linear. Para a confecção da curva, foi utilizado o programa GraphPad Prism 9.0.

4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória em macrófagos murino RAW 264.7

4.4.1 Cultivo e manejo das culturas dos macrófagos RAW 264.7

O ensaio para avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizado utilizando macrófagos murinos RAW 264.7. As células foram mantidas em condições adequadas para o seu crescimento, a 37°C e 5% CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomomicina e penicilina.

Para a manutenção da cultura celular, foram feitos repiques periódicos, entre 3 e 4 dias, com o auxílio de "cell scraper". Em cada repique as células foram retiradas, das garrafas, centrifugadas e contadas. A contagem foi feita com azul de tripan avaliando a viabilidade pelo número de células que não estão azuis na câmara de Neubauer. Os cálculos feitos variam de acordo com a câmara e a quantidade de poços contados.

Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços de fundo chato. A quantidade de células semeadas por poço foi de $0,6 \times 10^5$. A cultura foi incubada por 24 horas nas condições citadas acima para a aderência das células. Após este período, as células foram tratadas com LPS, CBD e seus derivados **DeT_CBD**, **CBD_R104**, **RAC6**, **RAC6_Ab** e incubadas por 72 horas a 37°C , 5% CO_2 .

4.4.2 Preparo das substâncias

As substâncias testadas **DeT_CBD**, **CBD_R104**, **RAC6**, **RAC6_Ab** foram primeiramente pesadas entre 1-3 mg em eppendorf e, em seguida, solubilizadas em DMSO para o preparo da solução estoque de 10 mM. A partir desta solução estoque foram feitas as diluições de uso de cada substância para cada um dos estudos.

4.4.3 Determinação da concentração do composto que inibe 50% da viabilidade celular (CC_{50})

Os macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placas com 96 poços em fundo chato com densidade de $0,6 \times 10^5$ em 200 μL de meio DMEM (Himedia) enriquecido com 10% SFB inativado por calor (Cultilab), penicilina (100 units/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Gibco), pH 7,2 e incubados por 24 horas, a 37°C e 5% CO_2 . Após a incubação, as substâncias a serem testadas foram adicionadas à placa nas concentrações de 100 e 200 μM , no caso da **CBD_R104**, e 200 e 300 μM no caso das demais substâncias, e assim incubadas por 24, 48 e 72 horas, a 37°C e 5% CO_2 . A citotoxicidade foi medida pelo ensaio de redução de resazurina, onde 20 μL de solução de resazurina (1 mM) foram adicionados a cada poço e incubados por 2 a 4 h a 37°C e 5% de CO_2 . O intervalo foi determinado pelo tempo de degradação da resazurina. A densidade óptica foi medida a 570 nm e 600 nm em um leitor de placas ELISA (Biotek, Winooski, Vermont, EUA). Cada condição experimental foi realizada em triplicata.

Para determinar os valores de CC_{50} das substâncias realizou-se um ensaio de viabilidade celular de forma semelhante a descrita no item 4.4.1. Os macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placas de 96 poços em fundo chato na densidade de $0,6 \times 10^5$ células por poço e incubados por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 . Após este período, as células foram tratadas com seis diluições seriadas das substâncias, iniciando com a concentração de 100 μM ou 200

μM para derivados e análogos do CBD (**DeT_CBD**, **CBD_R104**, **RAC6**, **RAC6_Ab**) (Tabela 4). As placas foram incubadas novamente a 37°C e 5% CO_2 por 48 horas. A citotoxicidade foi medida pelo ensaio de redução de resazurina, sendo 20 μL de solução de resazurina (1 mM) adicionados a cada poço e incubados por 2 a 4 h a 37°C e 5% de CO_2 . A densidade óptica foi medida a 570 nm e 600 nm em um leitor de placas ELISA (Biotek, Winooski, Vermont, EUA). Cada condição experimental foi realizada em triplicata e o controle positivo usado foi o CBD e o negativo as células sem tratamento. Os valores CC_{50} foram determinados por uma curva dose-resposta usando o software Dr-Fit.

Tabela 6- Concentrações usadas para a determinação da CC_{50}

Substâncias	Diluição seriada 1:2 (μM)									
CBD, DeT_CBD, RAC6, RAC6_Ab	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39
CBD_R104	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19

4.4.4 Avaliação da atividade inflamatória das substâncias pela dosagem de NO

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados conforme descrito no item 4.4.3. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias, segundo mostrado na Tabela 5, e incubadas por 2 horas a 37°C , 5% de CO_2 . A incubação foi feita como foi sugerido por Rajan e colaboradores (2016). Depois, adicionou-se 10 μL de uma solução de LPS a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nos respectivos poços, e a cultura foi incubada por 30 horas a 37°C , 5% de CO_2 . O LPS foi adquirido de fontes comerciais (LPS de *Escherichia coli* O55:B5 - Sigma-Aldrich Co Ltd.), contendo 1 mg na embalagem adquirida. O LPS se trata de um liofilizado que precisa ser resuspenso, nesse caso isso aconteceu com adição de 1 mL de água Milli-Q. Essa suspensão, posteriormente, foi liofilizada e aliquoteada, então as alíquotas foram usadas nos experimentos. As alíquotas foram diluídas em DMEM e adicionadas aos respectivos poços na concentração 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As substâncias em diferentes concentrações

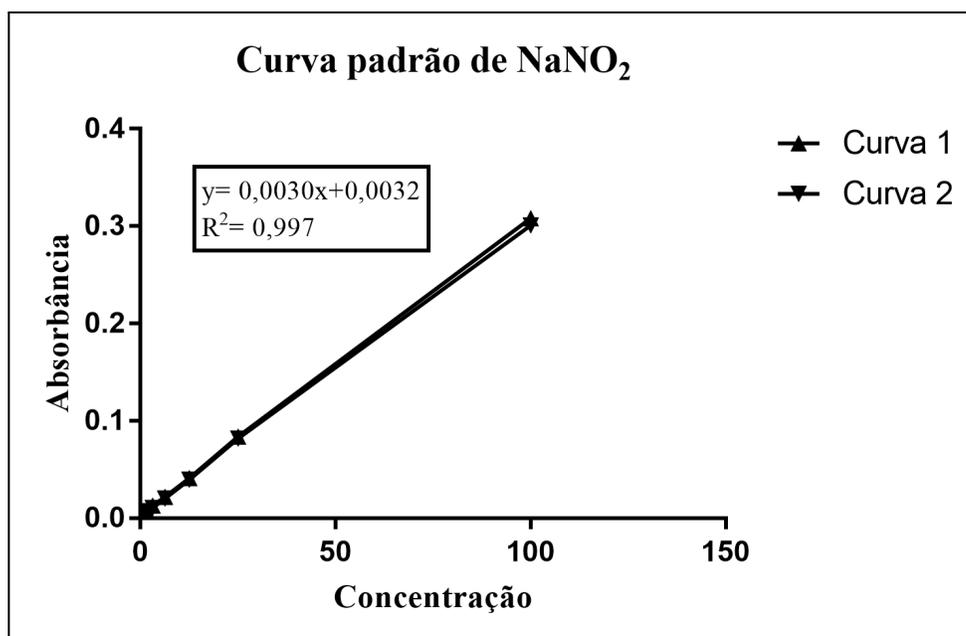
O NO foi dosado indiretamente por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-), que é resultante da oxidação do NO, por meio da medição no sobrenadante das culturas de macrófagos pela reação colorimétrica de Griess (HIBBS et al., 1988). Para isso, 50 μL do sobrenadante da cultura de macrófagos foram misturados a 50 μL do Reagente de Griess (solução 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H_3PO_4 e 0,1% de cloreto de *N*-(1-naftil)-etileno-diamina (NED) em 2,5% de H_3PO_4 , preparada no momento do uso) e, após 10 minutos, a absorbância dessa mistura foi medida em 540 nm, em um leitor de placas ELISA (Biotek, Winooski, Vermont, EUA).

A determinação das concentrações dos diferentes tratamentos foi feita usando uma curva padrão calculada usando diferentes concentrações da solução de nitrito de sódio (NaNO_2), realizadas em duplicata, as quais variaram de 1,56 a 100 μM . A curva-padrão contou com seis concentrações diferentes (**Tabela 6**) para determinação, por meio da leitura no espectrofotômetro, das respectivas absorbâncias. A plotagem do gráfico da curva-padrão, a qual vê-se na **Figura 23**, possui um eixo x mostrando as concentrações e o eixo y as absorbâncias. A curva-padrão permite o cálculo da equação da reta, que segue o modelo $y = ax + b$, e sua determinação permite estimar as concentrações de nitrito dos sobrenadantes. A equação da reta obtida por meio da curva-padrão, é a média dos valores das leituras feitas em duplicata, foi $y = 0,0030x + 0,0032$. Cabe ressaltar que o coeficiente de determinação, o R^2 foi calculado, pelo software de análise estatística, junto com a equação da reta. O coeficiente é importante para a garantia de que não haja uma grande variabilidade entre os dados, demonstrando confiabilidade da equação, nesse caso o valor de R^2 foi de 0,997, sendo uma equação confiável.

Tabela 8 - Concentrações de NaNO_2 usadas na construção da curva-padrão de nitrito para o experimento de dosagem de NO.

Pontos	Concentração (μM)
1	100
2	25
3	12.5
4	6.25
5	3.125
6	1.5625

Figura 23 - Gráfico da curva-padrão de NaNO_2 usada para os cálculos de concentração do ensaio de dosagem de NO. No gráfico há também a equação da reta e o valor de R^2 .

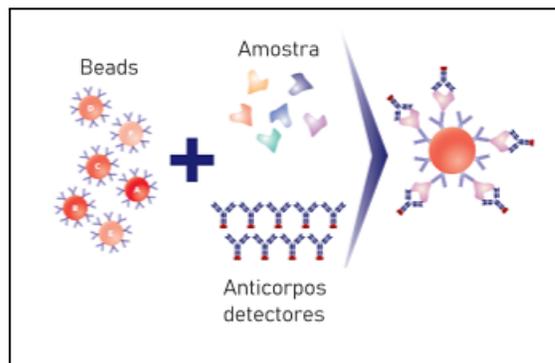


4.4.5 Dosagem de citocinas

Para a dosagem das citocinas foi mantido o mesmo protocolo de estímulo utilizado na dosagem de NO, com a diferença que o estímulo ocorreu por 20 horas de incubação com LPS, após o tratamento inicial com a substância por duas horas. A viabilidade das culturas foi feita

diariamente, por meio de microscopia, garantindo que as células mantivessem as condições visuais para serem usadas. A dosagem das citocinas foi realizada em simplicata utilizando o kit BD *Cytometric bead array* (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit seguindo as orientações do fabricante. Para as dosagens no kit utilizou-se o sobrenadante de cada poço para mensurar os níveis de sete proteínas: interleucina 2, 4, 6, 10 e 17A (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). As proteínas foram determinadas por meio de *Beads* de captura, que são microesferas metálicas, de tamanho e fluorescência conhecidas, o que possibilitou a detecção desses analitos por meio da citometria de fluxo. As *Beads* de captura foram conjugadas com anticorpos específicos, sendo cada *Bead* uma citocina diferente, além disso, havia também no reagente de detecção anticorpos conjugados a ficoeritrina (FE,) que quando conjugados emitem um sinal fluorescente proporcional. Dessa forma, havendo amostra, *Beads* e o reagente de detecção forma-se o complexo, como mostrado na **Figura 24**. Então, esses complexos passaram pelo citômetro de fluxo BD LSRFortessa e as citocinas foram identificadas por meio da fluorescência. O kit emitiu intensidades do sinal de fluorescência diferentes, avaliando os níveis de todas as proteínas e a quantidade delas. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FCAP 3.0.

Figura 24- Esquema mostrando a formação do complexo com as *Beads*, amostras e o anticorpo acoplado ao FE



Adaptado BD Bioscience website

(<https://www.bdbiosciences.com/en-br/products/reagents/immunoassays/cba>)

Para a utilização do kit foi necessária a determinação da curva-padrão de cada uma das citocinas, pois assim é possível realizar o cálculo de concentração das amostras. Diferentes concentrações foram obtidas por meio de diferentes diluições dos reagentes controle (**Tabela 7**). Em seguida, foi feita a leitura de cada uma das concentrações no citômetro de fluxo, e as respectivas médias de intensidade de fluorescência de cada uma foram usadas no gráfico. Sendo assim a curva-padrão foi calculada com a equação da reta e então as concentrações das amostras foram mensuradas no software FCAP 3.0.

Tabela 9 - Concentração padrão para calibração do CBA

Padrão	Concentração (pg/mL)
1	0
2	20
3	40
4	80
5	156
6	312,5
7	625
8	1.250
9	2.500
10	5.000

4.5 Avaliação da atividade da modulação da dor neuropática *in vivo*

Os experimentos a seguir foram realizados em colaboração com o doutorando Alysson Vinicius Braga, sob supervisão do Professor Renes de Resende Machado, do Departamento de Produtos Farmacêuticos, na Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.5.1 Animais

Os camundongos usados foram Swiss machos (25 – 30 g). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos em sala com temperatura controlada de 27 ± 1 °C, correspondente à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h, sendo acomodados em caixas de plástico (dimensões 40 x 34 x 17 cm) forradas com maravalha. Durante a realização de todos os experimentos, os animais foram manuseados de maneira cuidadosa, a fim de promover o menor estresse comportamental possível. Ao final dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo n° 225/2021).

4.5.2 Preparo de soluções

Suspensões do análogo **RAC6** nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, do **CBD** (dose 20 mg/kg) e de pregabalina (dose 30 mg/kg) em veículo, sendo a solução cremophor 5%, etanol 5% em salina estéril, foram preparadas e administradas por via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 4 mL/kg. A solução de cremophor 5% e etanol 5% foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,9%), sempre no dia anterior ao experimento.

A suspensão de paclitaxel (PAC) foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% e administrada por via i.p. em volume de 2 mL/kg. A dose de PAC foi de 2 mg/kg, administrada durante quatro dias (dose cumulativa de 8 mg/kg).

As suspensões de naltrexona e do antagonista AM251 foram preparadas em solução salina imediatamente antes da administração. As doses de naltrexona utilizadas foram de 5 e

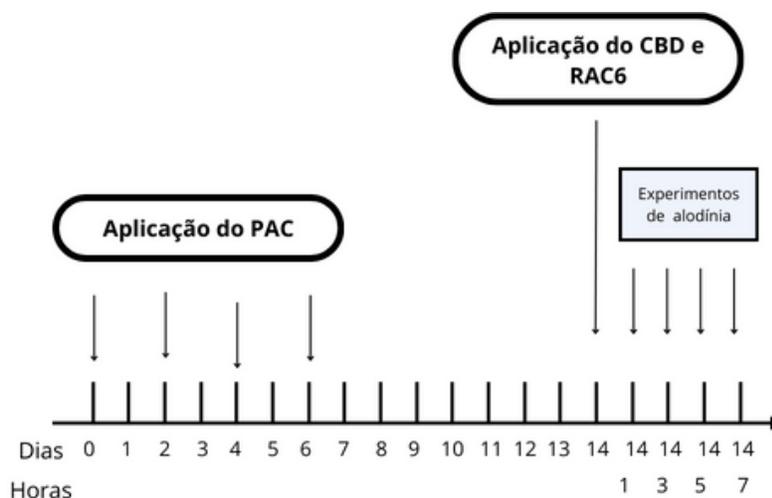
10 mg/kg e administradas por via i.p. em volume de 2 mL/kg. O antagonista AM251 foi administrado via i.p. nas doses de 4 e 8 mg/kg, em volume de 2 mL/kg.

A solução de fenobarbital foi preparada pela diluição do medicamento Fenobarbital (Sanofi Aventis, Brasil) em solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose utilizada foi de 50 mg/Kg, *per os* (p.o.), em um volume de 8 mL/Kg. O fenobarbital foi utilizado como controle positivo no modelo de haste girante e administrado 1 h antes da avaliação da coordenação motora.

4.5.3 Modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel

Os camundongos receberam quatro injeções de PAC (2 mg/kg), em dias alternados (dias 0, 2, 4 e 6), por via i.p.. Os animais do grupo controle receberam, nos mesmos dias, injeções de solução salina. A alodinia mecânica foi avaliada nos tempos 1, 3, 5 e 7 horas no tratamento no 14º dia após a primeira administração da primeira dose de PAC, após o tratamento com análogo ou **CBD**, como mostrado na **Figura 25**.

Figura 25 - Linha do tempo da administração das substâncias usadas no modelo murino de DN.



4.5.4 Avaliação da alodinia mecânica

Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica e ambientados no aparato de realização do teste por, no mínimo, 60 minutos por dia, durante dois dias antes da realização do experimento, e por 20 minutos logo antes do início do experimento. A alodinia mecânica foi avaliada utilizando um analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) que consiste em um transdutor de pressão manual adaptado a um filamento de polipropileno de 0,5 mm². O filamento foi aplicado à pata traseira direita com um aumento gradual de pressão até que o animal retirasse a pata. O valor em que a pata for retirada é gravado automaticamente. Cinco medições foram feitas, com um intervalo de 20 segundos entre cada uma delas, em cada animal. O maior e o menor valor foram descartados e a resposta foi calculada como uma média das três medidas restantes. Os animais foram testados antes e depois dos tratamentos.

Os animais foram divididos em seis grupos de n=6 cada, sendo um controle positivo tratado diariamente com pregabalina (30 mg/kg p.o.), outro com **CBD** (20 mg/kg p.o.), três para as dosagens diferentes do análogo **RAC6** (5, 10, 20 mg/kg, i.p.), e o controle tratado com o veículo (CMC 0,5% i.p.). As injeções foram feitas uma hora antes da administração da primeira injeção de PAC e as outras durante 14 dias. A DN foi induzida por 4 injeções de PAC em dias alternados (0, 2, 4, e 6). A alodinia mecânica foi avaliada nos dias 0, 2, 4, 6, 10 e 14 após a administração de PAC e 4 horas após a administração das substâncias. A atividade do análogo **RAC6** foi descrita após o 14º dia de sensibilização com o quimioterápico. Nesse dia, um dos grupos também foi tratado com pregabalina em dose única (30 mg/Kg, p.o). A alodinia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 h após a primeira administração do análogo **RAC6** ou de pregabalina. Os animais foram eutanasiados após os testes.

4.5.5 Avaliação dos efeitos induzidos sobre a coordenação motora

A coordenação motora foi avaliada na haste girante (VAZ et al., 1996). Os animais foram treinados no aparato, a 14 rpm, durante dois dias antes do experimento, em duas sessões diárias, durante 2 min. A divisão dos grupos foi feita segundo o tratamento, totalizando 5 grupos de n=6, e também considerando a distribuição das médias dos tempos de permanência basais fossem semelhantes. Sendo assim, no dia do experimento os camundongos foram

tratados via p.o. por duas vezes em volume 2 mL/Kg, em um intervalo de 2h, com o análogo **RAC6** (20 mg/kg), CBD (20 mg/kg) ou o veículo controle negativo (cremophor 5%, etanol 5% em salina estéril i.p.). Para fins de comparação, em um grupo o fenobarbital 50 mg/Kg foi administrado em dose única via p.o. Após a primeira administração do análogo, **CBD** ou do fenobarbital, o tempo de permanência de cada animal na haste girante (14 rpm) foi mensurado nas 1^o, 3^o, 5^o e 7^o h. O tempo de corte foi de 2 min.

4.5.6 Avaliação da via mecanística

Para proposição da via mecanística foram necessários nove grupos de camundongos, n=6. Cada grupo representa a combinação entre um antagonista e o **RAC6**, incluindo os que receberam o veículo. O análogo **RAC6** foi administrado por via i.p. na dosagem de 20 mg/kg, o veículo por via i.p. (cremophor 5%, etanol 5% em salina estéril 0,5%), o antagonista do CB1, AM251, nas doses 4 e 8 mg/kg i.p., e o antagonista dos receptores opióides mais precisamente do tipo Mu, naltrexona nas doses de 5 e 10 mg/kg, também por via i.p.. Para análise da atividade do **RAC6** combinou-se a substância e o AM251, nas concentrações de 4 e 8 mg/kg. A naltrexona foi administrada nas doses de 5 e 10 mg/kg, junto ao análogo e o veículo.

4.6 Análise estatística

Os resultados dos testes *in vitro* de análise do potencial antioxidante, FRAP, ABTS e DPPH, foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) *One way* seguida do pós-teste de Brown Forsythe e Bartlett averiguando a homocedasticidade dos resultados, e testes de Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson omnibus, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov para a normalidade. Comparação dos resultados obtidos foram efetuados para determinar se há diferença significativa entre as substâncias e o **CBD**, e o Trolox, nos ensaios de DPPH e ABTS. A curva padrão, dos ensaios de FRAP e dosagem de NO, analisou-se os valores, obtidos em triplicata, por meio da análise de regressão linear. A equação da reta e o R², cujo valor precisa ser maior de 0,9, foram calculados por meio da plotagem do gráfico, ressaltando que não houve diferença significativa entre intercepto e

inclinação entre a curva de cada triplicata. A determinação do CC_{50} para os testes de citotoxicidade foi feita no programa Dr-Fit, já os valores de CI_{50} para atividade citotóxica foram calculados utilizando GraphPad Prism. Os dados do ensaio da dosagem de NO foram obtidos por meio do cálculo da média e o desvio padrão. O nível de significância aplicada para a determinação da diferença significativa entre os dados foi considerado $p < 0,05$. Os dados supracitados sofreram análise no software GraphPad Prism 9.0) (San Diego, Califórnia, EUA) e Excel.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

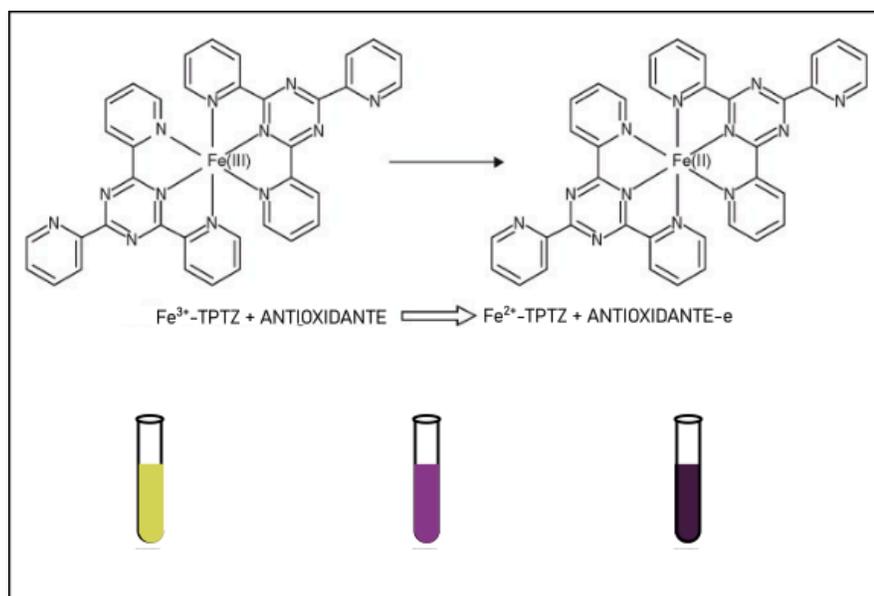
5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos derivados e análogos do CBD

A avaliação da atividade antioxidante das substâncias levou em consideração a sua capacidade de reduzir radicais livres com base em ensaios químicos utilizando três tipos de radicais: FRAP, DPPH e ABTS.

5.1.1 Resultado do ensaio de FRAP

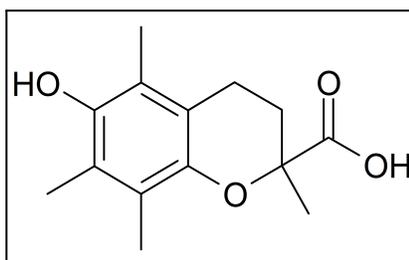
O primeiro teste realizado avalia a capacidade de reduzir o íon férrico ligado TPTZ (**Figura 26**), um composto que apresenta a coloração azul arroxeadado à medida que o íon é reduzido. Sendo assim, quanto mais o radical férrico é reduzido maior a intensidade da coloração.

Figura 26- Representação da reação de redução do íon Fe^{3+} a Fe^{2+} no complexo TPTZ com a variação de cor à medida que a reação se processa no início, meio e fim do ensaio.



No ensaio de FRAP, que conta com a redução do íon férrico como mostrado anteriormente, ocorre a mudança de cor da reação para um tom roxo muito escuro. Nesse experimento, o trolox (**Figura 27**) é utilizado como base, por ter ação comprovadamente antioxidante. Tal substância é um análogo da vitamina E, sendo usado como padrão para avaliar o potencial antioxidante de outras substâncias. Esse análogo é capaz de atravessar a membrana atuando no controle do estresse oxidativo. Assim como a vitamina E, o trolox atua reduzindo espécies reativas presentes no tecido que causam danos a lipídios, proteínas e o DNA (ARTS *et al*, 2004).

Figura 27- Estrutura do Trolox



O resultado foi expresso em μM de Trolox/ mM de amostra, e como discutido, a construção da curva-padrão de trolox e o uso da equação da reta dessa curva faz com que os

resultados obtidos de cada amostra expressam sempre o equivalente em trolox (TE) da atividade da substância. Por conseguinte, utiliza-se a equação da reta de um gráfico que tenha como um dos eixos as absorvâncias de leituras de diferentes concentrações do Trolox e o outro as respectivas concentrações. Sendo assim, a equação da reta foi usada com as absorvâncias das substâncias, como valor de y, possibilitando obter o correspondente concentração de trolox da atividade de cada substância, cujo alto valor de x, obtido pela equação, equivale a uma atividade potencialmente antioxidante (ARTS *et al*, 2004). No caso em específico, o resultado está em equivalente de trolox (μM), para cada mM de substância.

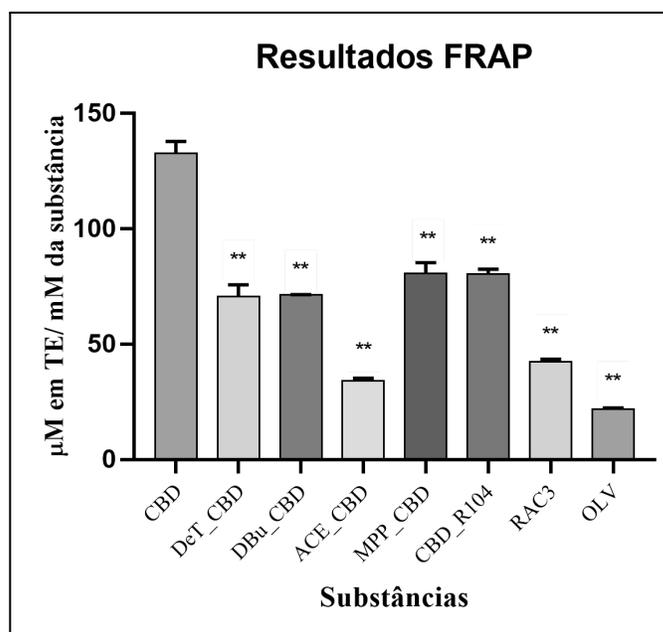
De todo modo, a obtenção da curva-padrão e da equação da reta permitiu que fossem encontrados os resultados da forma que estão apresentados. Cabe ressaltar que quanto maior o TE maior a atividade antioxidante da substância. Isso se justifica porque demonstra que quanto maior a concentração de TE menor será a concentração necessária da substância para que apresente atividade antioxidante. Por conseguinte, com base nos resultados mostrados na **Tabela 8** observa-se que o **CBD** possui $129,99 \mu\text{M} \pm 0,79$ de TE por cada mM da substância presente na reação, significando então que cada mM do CBD possui o efeito de $129,99 \mu\text{M} \pm 0,79$ de trolox, e isso demonstra o potencial que o **CBD** possui de reduzir radicais livres.

Tabela 10- Dados dos resultados dos testes da atividade antioxidante do ensaio FRAP

Substâncias	FRAP (μM de TE/mM de amostra) \pm DP
CBD	$129,99 \pm 0,79$
MPP_CBD	$80,68 \pm 4,82$
CBD_R104	$80,46 \pm 2,1$
DBu_CBD	$71,47 \pm 0,13$
DeT_CBD	$70,82 \pm 5,02$
RAC3	$42,31 \pm 1,22$
ACE_CBD	$34,16 \pm 1,1$
OLV	$21,92 \pm 0,47$

Seguindo com as outras substâncias testadas, observando a **Tabela 8** em conjunto com o gráfico da **Figura 28**, infere-se que duas substâncias apresentaram atividade significativa quando comparadas ao **CBD**. Sendo elas as substâncias **MPP_CBD** e **CBD_R104**, com resultados bem próximos de $80,68 \mu\text{M} \pm 4.82$ de TE/mM de substância e $80,46 \mu\text{M} \pm 2.1$ de TE/mM de substância, respectivamente. Ensaio futuros e estudos de caracterização do perfil eletrônico dessas substâncias precisam ser feitos para considerar e comprovar atividade antioxidante expressiva, porém os resultados apresentados permitem inferir que as substâncias citadas e **CBD**, são as mais ativas em comparação às outras. Ao contrário, as substâncias **ACE_CBD** e **OLV**, que obtiveram, respectivamente, $21,92 \pm 0,47$ e $34,16 \mu\text{M} \pm 1.1$ de TE/mM de substância, demonstraram ser as menos ativas. Contudo, todas as amostras apresentam uma diferença significativa entre o **CBD**. Observa-se, ainda, que a maior parte das substâncias testadas expressaram valores maiores que $50 \mu\text{M}$ de TE/mM de substância, apresentando, de uma forma geral, uma atividade moderada considerando o controle positivo, **CBD**.

Figura 28 – Gráfico do resultado do ensaio do FRAP, com os resultados em μM de TE/ mM de substância. ** representa valor de $p < 0,005$, demonstrando que houve diferença significativa entre a atividade as substâncias e a do CBD.



5.1.2 Resultado do ensaio de redução do DPPH

Outro ensaio químico usado no presente trabalho é baseado na capacidade das substâncias em reduzir o radical DPPH, conforme ilustrado na **Figura 29**. Da mesma forma mostrada no ensaio anterior, há uma variação de cor à medida que a redução acontece, nesse caso, inicialmente a cor é roxa e, ao final, amarela. O radical DPPH é relativamente estável em razão da possibilidade de estabilização por ressonância com o anel trinitrobenzeno. Para que uma substância apresente atividade antioxidante é necessário que, ao doar um hidrogênio ao radical DPPH, o radical formado seja também estabilizado, como aconteceria, por exemplo, com substâncias contendo um anel fenólico em sua estrutura (**Figura 30**).

Figura 29- Reação de redução do radical DPPH, com esquema do que é esperado da diferenciação de cor no início, meio e fim do ensaio.

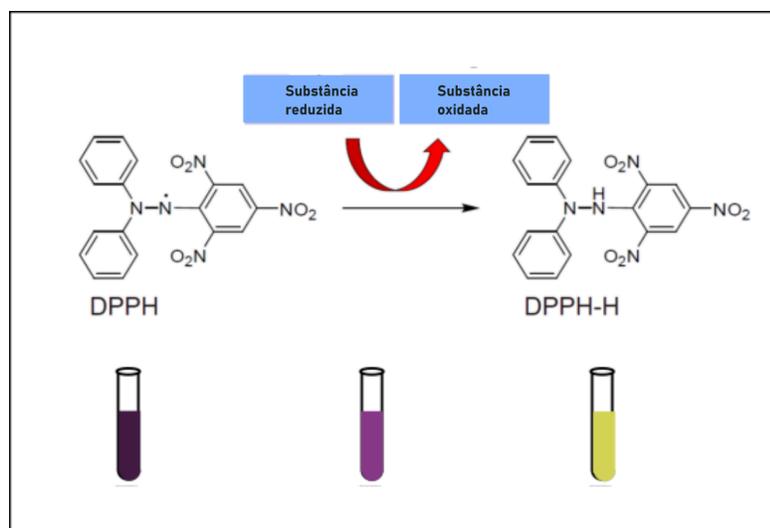
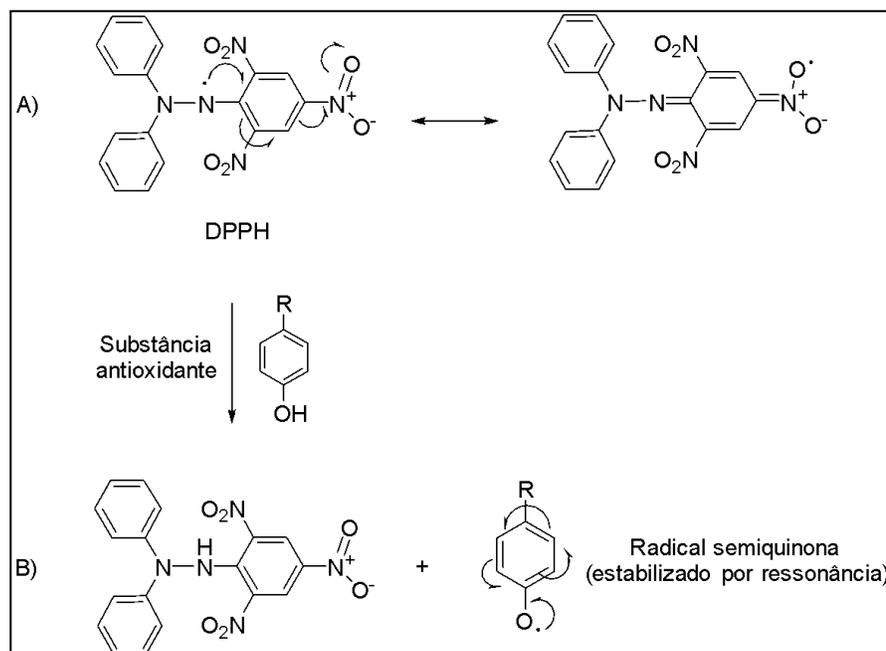


Figura 30 – Representação da estabilização por ressonância do radical DPPH (A) e de um radical semiquinona (B) originado a partir da reação de uma substância fenólica antioxidante. R = substituinte não especificado.



Com base no acima exposto, a atividade antioxidante dos análogos e derivados do CBD foi avaliada usando o ensaio de redução do DPPH. Na **Tabela 9** estão apresentados os valores de % AAT obtidos por meio do cálculo de absorvância das substâncias após interação com o reagente. Nesse ensaio foi utilizado um controle positivo, o trolox, que obteve $14,57\% \pm 0,4$ AAT. Já o **CBD** apresentou uma % AAT de $16,58\% \pm 0,4$, comparável à do trolox, o que indica que esse fitocanabinoide apresenta atividade antioxidante, conforme já descrito na literatura (BORGES & SILVA, 2017). Destaca-se, ainda, a atividade antioxidante apresentada pelo **CBD_R104** (% AAT = $14,71 \pm 1,44$), o que está de acordo com os resultados do ensaio de FRAP, em que este composto também se mostrou ativo.

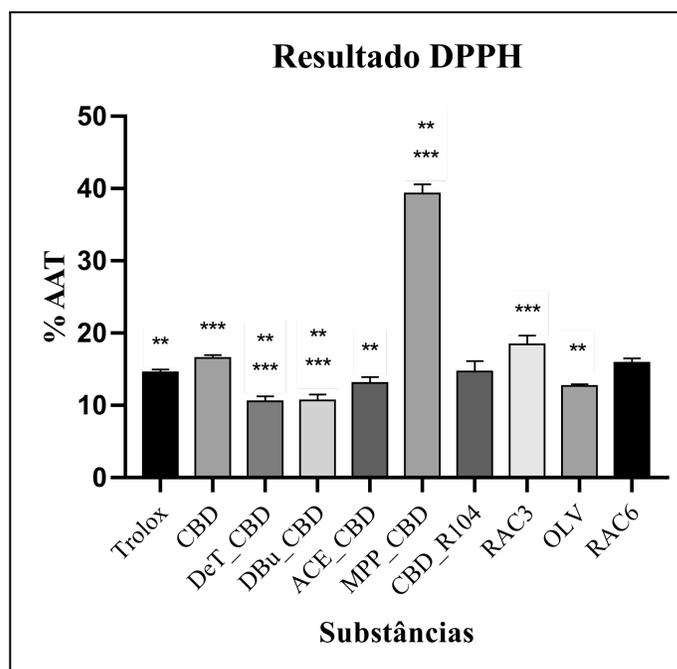
Tabela 11- Dados dos resultados do ensaio de DPPH. Valores expressos em % AAT e o desvio padrão (DP) das médias.

Substâncias	DPPH (% AAT) \pm DP
Trolox	$14,57 \pm 0,4$
CBD	$16,58 \pm 0,4$
MPP_CBD	$39,3 \pm 1,29$
RAC3	$18,45 \pm 1,22$
RAC6	$15,91 \pm 0,61$
CBD_R104	$14,71 \pm 1,44$
ACE_CBD	$13,1 \pm 0,83$
OLV	$12,7 \pm 0,23$
DBu_CBD	$10,7 \pm 0,83$
DeT_CBD	$10,56 \pm 0,69$

Vale ressaltar que algumas substâncias (**RAC3** e **RAC6**) foram mais ativas que o trolox, sendo que o derivado **MPP_CBD** foi o que apresentou maior atividade neste ensaio (% AAT = $39,3\% \pm 1,29$) (**Figura 31**). Observa-se também no gráfico da **Figura 31** nota-se que a

além da maioria das substâncias apresentaram diferença significativa para o trolox e o **CBD**, todas mostraram valores de $p < 0,005$ quando comparadas com o **MPP_CBD**.

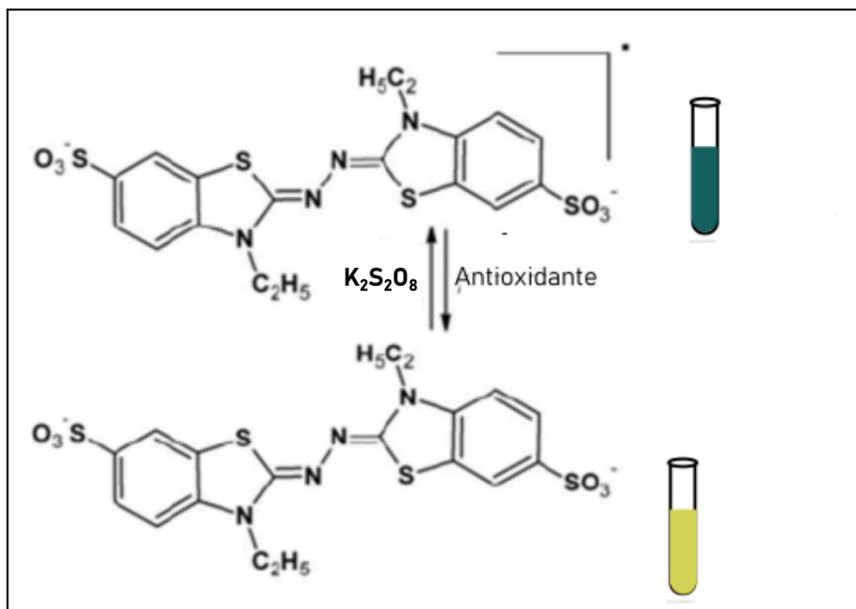
Figura 31- Gráfico do resultado do ensaio de redução de DPPH. No eixo y observa-se a % AAT e no x mostra-se os nomes das substâncias. Os valores com ** apresentam diferença significativa do CBD e as substâncias com *** apresentam diferença significativa ao trolox, o controle positivo. O valor de $p < 0.005$ foi considerado para determinar o grau de diferença.



5.1.3 Ensaio de redução do ABTS

O último ensaio químico realizado para avaliação da atividade antioxidante dos derivados e análogos do CBD foi o de neutralização dos radicais ABTS. Nesse ensaio é utilizado uma mistura do ABTS com o persulfato de potássio, pois esse é o responsável pela formação do radical ABTS. A solução de uso do ensaio do ABTS precisa ser preparada e usada depois de 16 horas de incubação ao abrigo de luz e a temperatura ambiente, e isso acontece por conta do tempo de reação entre ABTS e persulfato de potássio conforme mostrado na **Figura 32**. No ensaio do ABTS ocorre a mudança de cor da verde mais escura para mais clara, à medida que a redução acontece (**Figura 32**).

Figura 32- Reação da formação do radical ABTS a partir da reação com persulfato de potássio, seguido de redução pelo agente antioxidante. O esquema do que é esperado da diferenciação de cor no início e ao fim do ensaio.



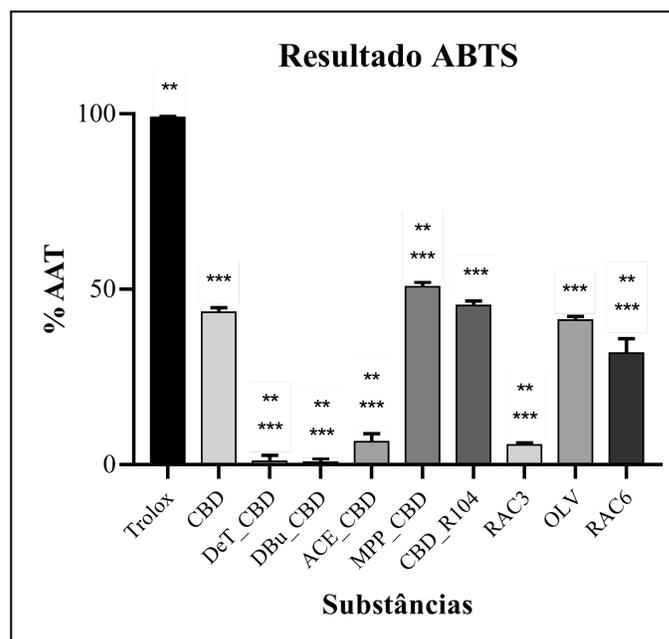
Dessa maneira, o ensaio foi realizado utilizando o trolox como controle positivo. Nota-se na **Tabela 10**, onde vê-se os valores de %AAT de cada substância avaliada, que o trolox possui % AAT = $98,93\% \pm 0,34$, sendo o valor mais proeminente dentre todas as substâncias testadas. Outro ponto igualmente importante, o **CBD** e os seus derivados **CBD_R104** e **MPP_CBD** e o **OLV** também demonstraram atividade satisfatória com valores de % AAT de $43,44\% \pm 1,39$, $45,4\% \pm 1,31$, $50,69\% \pm 1,38$ e $41,22\% \pm 1,09$, respectivamente (**Figura 33**). Nota-se no gráfico (**Figura 33**) que todas as substâncias apresentam diferença significativa quando comparadas com o trolox, e quanto ao **CBD**, somente as substâncias

Tabela 12- Resultados do ensaio de redução do ABTS. Os resultados estão em % AAT junto dos DP de cada média.

Substâncias	ABTS (%AAT) ± DP
Trolox	98,93 ± 0,34
CBD	43,44 ± 1,39
MPP_CBD	50,69 ± 1,38
CBD_R104	45,4 ± 1,31
OLV	41,22 ± 1,09
RAC6	31,77 ± 4,19
ACE_CBD	6,52 ± 2,36
RAC3	5,6 ± 0,73
DBu_CBD	0,70 ± 1,09
DeT_CBD	ND*

*ND = não determinada

Figura 33- Gráfico representando o resultado do ensaio de redução do ABTS. No eixo y observa-se a % AAT, calculado por meio das absorvâncias das substâncias, e no eixo x a identificação de cada uma das substâncias testadas. O valor de $p < 0.005$ foi considerado para apontar que houve diferença significativa entre as substâncias e o trolox, sinalizado com ***, e o CBD, sinalizado com **.



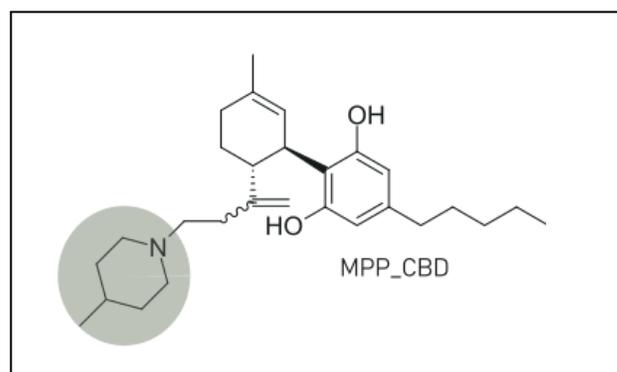
5.1.4 Discussão dos resultados dos ensaios de atividade antioxidante

A ação antioxidante do **CBD** que vem sendo relatada está ligada à sua capacidade de neutralizar radicais livres em razão de algumas de suas características estruturais. Acredita-se que as duas hidroxilas fenólicas presentes na sua estrutura são responsáveis pela neutralização dos radicais livres por garantir a estabilização do radical (BORGES *et al*, 2013, BORGES & SILVA, 2017), conforme já ilustrado de forma geral na **Figura 30**. Além disso, o **CBD** pode atuar em diferentes níveis na ação antioxidante, um deles é inibindo a produção de oxidases como a NOX que podem desencadear um aumento do estresse oxidativo (ATALAY *et al.*, 2019).

Com base nos resultados obtidos, que duas substâncias foram mais ativas em todos os testes. Uma delas mostrada na **Figura 34**, é a **MPP_CBD** que demonstrou os resultados mais

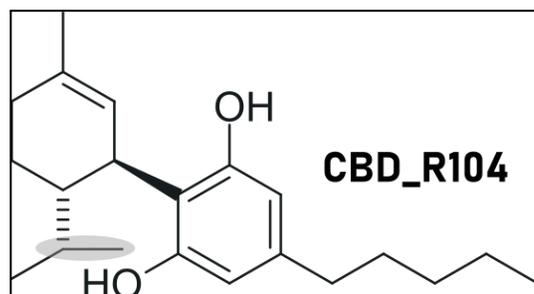
proeminentes em todos os três ensaios de redução. Comparando-se a estrutura da **MPP_CBD** com a do **CBD**, observa-se que possuem a maior parte muito semelhantes, sendo o ponto de diferença entre eles a presença do grupo 4-metilpiperidina circulado em cinza na respectiva estrutura. Como resultado, espera-se um aumento da atividade antioxidante, pois trata-se de uma amina cíclica que faz parte de outras substâncias conhecidas pela atividade antioxidante, como a piperidina (MANJUSHA *et al.*, 2018). A presença desse grupo di- ou trissubstituído já foi descrita como favorável para ação redutora de radicais livres, porém, essas modificações se limitam a grupos com nitrogênio e enxofre (ALEXIDIS *et al.*, 1995).

Figura 34- Estruturas do CBD e da MPP_CBD com o grupo 4-metilpiperidina em destaque



A outra substância com atividade satisfatória em todos os ensaios foi a **CBD_R104** (**Figura 35**). Observa-se na estrutura da **CBD_R104** que ocorreu uma redução na ligação dupla de C8, quando comparada ao CBD. Outrossim, a desidrogenação da ligação dupla em C8, visto nos derivados desidrogenados H2-CBD ou H4-CBD (**Figura 41**), inibe a produção de EROs em macrófagos RAW 264.7 (BEN-SHABAT *et al.*, 2006). O mecanismo de inibição dos derivados hidrogenados descritos por Ben-Shabat *et al.* (2006) não foi completamente elucidado.

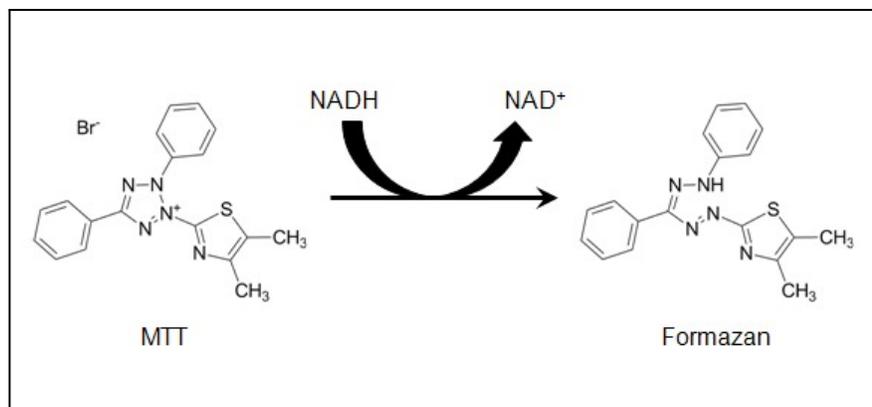
Figura 35- Estrutura da substância CBD_R104 com destaque a redução da insaturação.



5.2 Avaliação da atividade citotóxica das substâncias em diferentes linhagens de células tumorais

A avaliação da atividade citotóxica das substâncias foi feita em diferentes linhagens de células tumorais, sendo duas delas linhagens de células leucêmicas (THP-1 e K-562) e uma de tumor sólido de mama (MDA-MB-231). Então, após o processo de tratamento das células com as devidas substâncias foi preciso avaliar a viabilidade celular de cada linhagem. A viabilidade celular foi mensurada por meio do ensaio de MTT. O MTT é um sal tetrazólico metabolizado pelas enzimas mitocondriais de células viáveis formando um cristal chamado de Formazan, como visto na **Figura 36**; esse é insolúvel em água, mas solúvel em DMSO e apresenta uma coloração violeta (CARMICHAEL et al., 1987). Sendo assim, quanto maior a coloração violeta das células maior a quantidade de células viáveis.

Figura 36- Reação de redução do MTT em formazan resultado da ação das enzimas mitocondriais.



FONTE: Riss et al. (2013)

Na **Tabela 11** estão os valores de CI_{50} determinados para cada uma das substâncias nos três tipos de linhagens em comparação com os valores de CI_{50} dos fármacos utilizados como controle positivo.

Tabela 13- Valores de CI_{50} das substâncias frente às diferentes linhagens de células tumorais (continua)

Substâncias	CI_{50} (μM) \pm DP ^a		
	THP-1 ^d	K-562 ^c	MDA-MB-231 ^f
CBD	84,45 \pm 0,70	31,85 \pm 1,95	11,37 \pm 1,17
DeT_CBD	302,37 \pm 17,36	51,03 \pm 9,08	295,36 \pm 13,55
DBu_CBD	242,20 \pm 53,56	> 500	> 500
MPP_CBD	3,49 \pm 0,51	8,89 \pm 1,22	5,21 \pm 0,96
CBD_R104	59,67 \pm 7,53	5,99 \pm 0,61	14,50 \pm 1,93
RAC3	30,75 \pm 3,31	24,93 \pm 3,01	26,17 \pm 1,48

Tabela 14- Valores de CI_{50} das substâncias frente às diferentes linhagens de células tumorais (conclusão)

Substâncias	THP-1 ^d	K-562 ^c	MDA-MB-231 ^f
OLV	111,76 ± 18,33	303,55 ± 73,63	39,58 ± 3,66
RAC6	33,72 ± 3,28	86,00 ± 16,04	9,24 ± 0,28
RAC6_Ab	30,19 ± 1,46	53,19 ± 0,07	12,63 ± 0,81
Imatinib^c	ND ^b	34,58 ± 4,2	ND
Citarabina^c	40,75 ± 4,45	ND	ND
Doxorrubicina^c	ND	ND	2,3 ± 0,55

^aOs valores de CI_{50} foram apresentados como médias ± Desvio Padrão (DP) de dois experimentos independentes; ^bNão Determinado (ND); ^cControles positivos; ^dTHP-1, linhagem celular de leucemia monocítica aguda; ^eK-562, linhagem celular de leucemia mieloide crônica; ^fMDA-MB-231, linhagem celular de adenocarcinoma de mama.

5.2.1 Discussão dos resultados de atividade na linhagem THP-1

Para a linhagem celular de leucemia monocítica aguda, a THP-1, o valor da CI_{50} do **CBD** (84,45 μ M ±0,70) é aproximadamente o dobro do valor observado para a citarabina (40,75 μ M ±4,45), fármaco já bem estabelecido na clínica no tratamento deste tipo de câncer. Das nove substâncias testadas, quatro apresentaram valores de CI_{50} menores do que os do controle positivo, sendo que a **MPP_CBD** novamente se destacou como a mais ativa, com valor de $CI_{50} = 3,49 \mu$ M ±0,51.

Embora o **CBD** seja um fármaco estudado quanto à sua atividade antineoplásica, existem mais registros quanto à sua atividade frente a tumores sólidos e não leucemias. O mesmo é observado quanto aos derivados e análogos deste fitocanabinoide. De todo modo, no trabalho realizado por Shultze *et al.* (2017) os valores de CI_{50} do **CBD** são cerca da metade do valor na linhagem THP-1 que no ensaio realizado no presente trabalho. Ademais, no estudo supracitado percebe-se um efeito dose-dependente do **CBD** sobre a viabilidade celular da linhagem THP-1 (SHULTZE *et al.*, 2017). Efeitos esses que estão relacionados à atividade do

CBD na respiração mitocondrial da linhagem em questão. O **CBD** também foi descrito como um inibidor da respiração mitocondrial em cérebro de porcos, em que foi relatado a presença de receptores CB1 na membrana externa da mitocôndria, o sendo responsável pela disfunção causada por canabinóides (BERNARD *et al.*, 2012; FISĂR *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2015). Então, propõe-se que os derivados testados possam atuar pela mesma via do **CBD** de forma mais efetiva, ou até mesmo por uma via diferente. Vale ressaltar a precisão de estudos para mensurar a seguridade do composto bem como seu índice de seletividade em tais receptores.

5.2.2 Discussão dos resultados de atividade na linhagem K-562 e discussão

Os resultados obtidos frente à linhagem K-562 de células de leucemia mieloide crônica também se mostraram bastante promissores, com o **CBD** apresentando potência similar a do controle positivo, imatinibe, e três substâncias com valores de CI_{50} menores. Destaque aqui para os derivados **MPP_CBD** e **CBD_R104**, com valores de CI_{50} $8,89 \mu\text{M} \pm 1,22$ e $5,99 \mu\text{M} \pm 0,61$, respectivamente.

Kisiolek (2021) sugere que o **CBD** seja um potencializador da atividade proliferativa das células leucêmicas, e seu uso, na concentração de $5 \mu\text{M}$, em concomitância ao fármaco doxorrubicina diminui a atividade do quimioterápico, aumentando a viabilidade das células tumorais em comparação com doxorrubicina sozinha. Por outro lado, Dvilansky *et al.* (1984) descreveram a ação inibitória do **CBD** em concentrações mais altas que as usadas no presente estudo. Por outro lado, supõe-se que o possível mecanismo de ação do **CBD** e possivelmente das substâncias ativas identificadas no presente trabalho, em inibir a linhagem K-562, seja por meio da interação com o receptor CB2, levando ao aumento dos níveis de apoptose nas células tumorais, além do aumento da expressão de EROs (MCKALIP, 2006). Entretanto, ainda não é possível propor um mecanismo de ação das substâncias testadas sem estudos posteriores, nem mesmo comparando com a literatura.

5.2.3 Discussão dos resultados de atividade na linhagem MDA-MB-231

Cinco substâncias apresentaram valores de CI_{50} menores do que $15 \mu\text{M}$ frente à linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. O **CBD** apresentou um valor de CI_{50} de $11,37 \mu\text{M} \pm 1,17$, valor próximo aos das substâncias **MPP_CBD** ($CI_{50} = 14,50 \mu\text{M} \pm 1,93$), **RAC6**

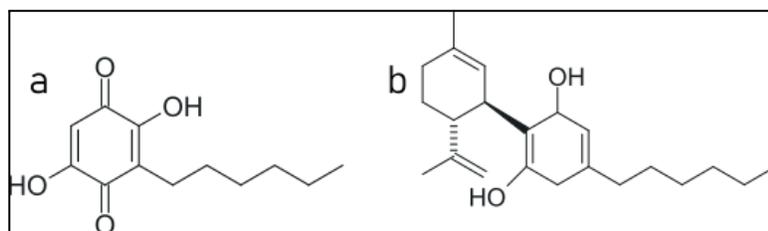
(CI_{50} 9,24 μ M \pm 0,28) e **RAC6_Ab** (CI_{50} = 12,63 μ M \pm 0,81), considerando o controle positivo, doxorubicina (CI_{50} = 2,31 μ M \pm 0,55).

Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por D'aloia *et al.* (2022) que demonstraram a ação antiproliferativa do **CBD**, na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. O mesmo grupo observou que em concentrações acima de 5 μ M, o **CBD** apresenta efeitos citotóxicos e citostáticos, como a interrupção do crescimento das células tumorais, ativando um processo de autofagia com aparecimento de bolhas de gás nas células. Essas bolhas além de irreversíveis são um sinal de morte celular, sendo formadas a partir do núcleo como forma de diminuir o inchaço, alcançando a membrana celular e levando à ruptura e morte da célula (D'ALOIA *et al.*, 2022). Em outro estudo realizado por Shrivastava e colaboradores (2011) na mesma linhagem celular de câncer de mama, propõe-se um mecanismo dose-dependente do **CBD** como agente antineoplásico. Assim, dentre as concentrações de 2,5 μ mol/L, 5 μ mol/L, 7,5 μ mol/L e 10 μ mol/L, a maior demonstrou menos de 40% de viabilidade celular, em contraste com os 99% da menor concentração. Da mesma forma, quando se avaliou a porcentagem de autofagia e apoptose, entre as concentrações de 5 μ mol/L e 10 μ mol/L, a última obteve mais de 80% de autofagia e mais de 90% de apoptose (SHRIVASTAVA *et al.*, 2011). Sendo assim, a concentração é importante na determinação dos efeitos citotóxicos do **CBD**, já que ele não apresenta os efeitos antineoplásicos em concentrações menores que 5 μ M.

Além disso, o **CBD** atua como um agente antiproliferativo devido à sua ação inibitória de sinalizadores moleculares como alvo da rapamicina em humanos (mTOR), que é o principal responsável pela proliferação celular, inibido a fosforilação do mTOR nas células oncogênicas (SULTAN *et al.*, 2018). Outrossim, o derivado natural, **CBDA**, também já foi descrito como composto ativo contra a linhagem MDA-MB-231. Takeda *et al.* (2016) indicam que sua via de ação é por meio da inibição da COX-2, resultando na regulação da expressão de uma das proteínas presente no dímero do complexo ativador de proteínas-1(AP-1). Além do mais, o **CBDA** também atua por meio da ativação de enzimas que promovem a quebra da guanosina (GTPase) da família Rho do tipo A (RhoA), que estão diretamente ligadas a funções de mobilidade e polaridade celular, por meio da inibição da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), que promove a fosforilação da enzima RhoA (TAKEDA *et al.*, 2012; TAKEDA *et al.*, 2016). Por outro lado, uma substância que possui semelhança estrutural com o **CBD** e demonstra

atividade citotóxica, é o canabinol para-quinona V, chamado de HU-311V (**Figura 37**). Tal derivado foi descrito como antiproliferativo em linhagens tumorais de melanoma humano (M14), câncer de mama (MC-7) e renal humanos (A498), valores de CI_{50} de $7,0 \mu M \pm 0,10$, $18,7 \mu M \pm 0,06$ e $12,9 \mu M \pm 0,06$, respectivamente. A linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 foi testada, mas não houve resultados tão promissores (CI_{50} de $33,6 \mu M$), em vista dos resultados obtidos das outras linhagens. Todavia, a substância demonstrou sua atividade, na linhagem de câncer de mama M14, induzindo autofagia, por meio da ativação de caspases e clivagem de proteínas poli-polimerase (PPAR), indução da apoptose produção de EROs (PETRONZI *et al.*, 2013).

Figura 37- Estrutura da quinona HU-311-V (a) comparada a estrutura do CBD (b)



Adaptado Petronzi *et al* (2013)

Ainda existem muitas perguntas a serem respondidas, mas em conclusão pode-se inferir que **MPP_CBD** foi o mais ativo em todas as linhagens testadas, demonstrando valores de CI_{50} mais baixos que os dos controles e do **CBD**. Obviamente, estudos adicionais são cruciais na investigação do possível mecanismo de ação desta substância.

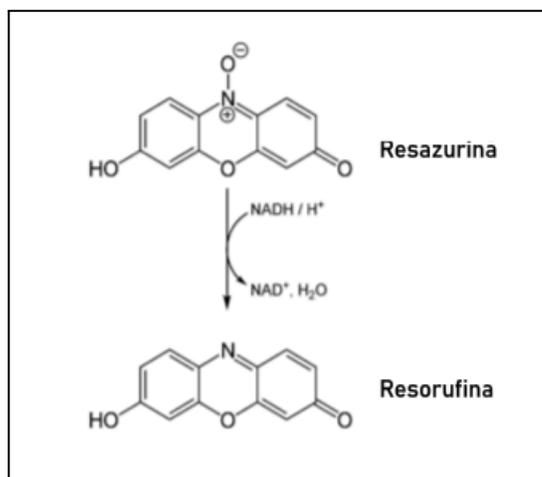
5.3 Determinação do potencial anti-inflamatório das substâncias sintéticas em células da linhagem RAW 264.7 estimuladas por LPS

5.3.1 Resultados do ensaio de citotoxicidade e CC_{50}

Antes de iniciar os estudos de avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* das substâncias foi necessária a realização de um teste de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, na tentativa de determinar o melhor tempo de tratamento das substâncias na célula e a melhor concentração de partida para o estudo de CC_{50} . Os resultados apresentados foram

usados como parâmetro para os testes posteriores. O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o reagente resazurina, que é um corante azul arroxeado que pode ser reduzido a resorufina, um corante rosa, como observado na **Figura 38**. A presença do produto reduzido da resazurina é indicativo de integridade mitocondrial, e conseqüentemente da capacidade de realizar respiração aeróbica do organismo (KUETE *et al.*, 2017). Sendo assim, os cristais de resazurina são usados para mensurar a atividade celular dos organismos após a interação com as substâncias. A leitura das absorvâncias da reação da resazurina foi realizada para calcular a porcentagem de morte celular dos macrófagos RAW 264.7 e os dados foram plotados como porcentagem de morte dos macrófagos RAW 264.7.

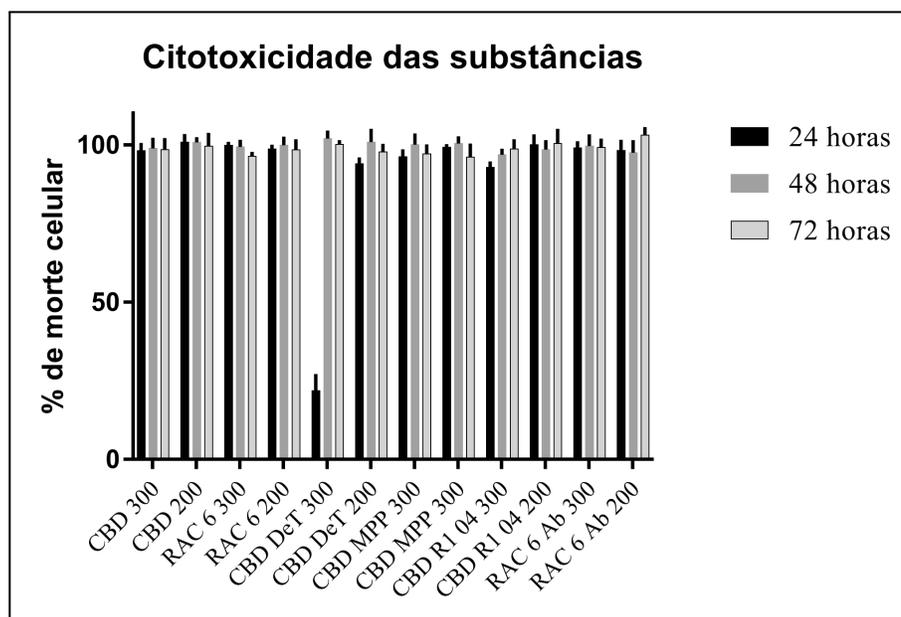
Figura 38 - Esquema da redução da resazurina em resorufina



O tempo de incubação e a concentração são fatores importantes na determinação dos parâmetros de viabilidade celular, então, foram testados três tempos diferentes de incubação nos ensaios de 24, 48 e 72 horas e foram avaliadas as concentrações de 200 e 300 μ M. Os valores de concentração usados nesses testes foram preconizados por estudos anteriores realizados com as substâncias, obedecendo uma margem de segurança. Então, como observado na **Figura 39**, basicamente todas as substâncias apresentaram porcentagem de morte celular próxima de 100% em ambos os tempos de incubação, no entanto, o período de incubação de 48 horas demonstrou maior uniformidade. A avaliação da citotoxicidade das substâncias nas concentrações de 200 e 300 μ M resultou em valores de morte celular muito próximos, sendo

padronizado o valor de 200 μM para os cálculos de CC_{50} , com exceção da **CBD_R104**, cuja porcentagem de morte celular se manteve alta, então, novos testes de viabilidade celular foram realizados para esta substância sendo padronizada a concentração de 100 μM para iniciar a diluição seriada do teste de CC_{50} .

Figura 39- Média da porcentagem de morte celular nas concentrações de 200 e 300 μM , nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-tratamento com as substâncias DeT_CBD, MPP_CBD, CBD_R104, RAC6, RAC6_Ab e CBD.



Após a investigação da citotoxicidade das substâncias, o valor da CC_{50} foi determinado e os resultados são mostrados na **Tabela 12**. Segundo observado, as substâncias **DeT_CBD**, **RAC6** e **RAC6Ab**, apresentaram valores de CC_{50} ($\text{CC}_{50} = 33,7 \mu\text{M}$, $38,5 \mu\text{M}$ e $42,8 \mu\text{M}$, respectivamente), maiores que os do **CBD** ($\text{CC}_{50} = 5,2 \mu\text{M}$), e o **CBD_R104** ($\text{CC}_{50} = 3,9 \mu\text{M}$). O derivado **MPP_CBD** não foi usado no cálculo de CC_{50} pela falta de quantidade suficiente para o teste, assim como falta de insumos para uma nova síntese.

Tabela 15- Valores de CC_{50} das substâncias testadas

Substâncias	Valor CC_{50} (μM)
CBD	5,2
DeT_CBD	33,7
CBD_R104	3,9
RAC6	38,5
RAC6Ab	42,8

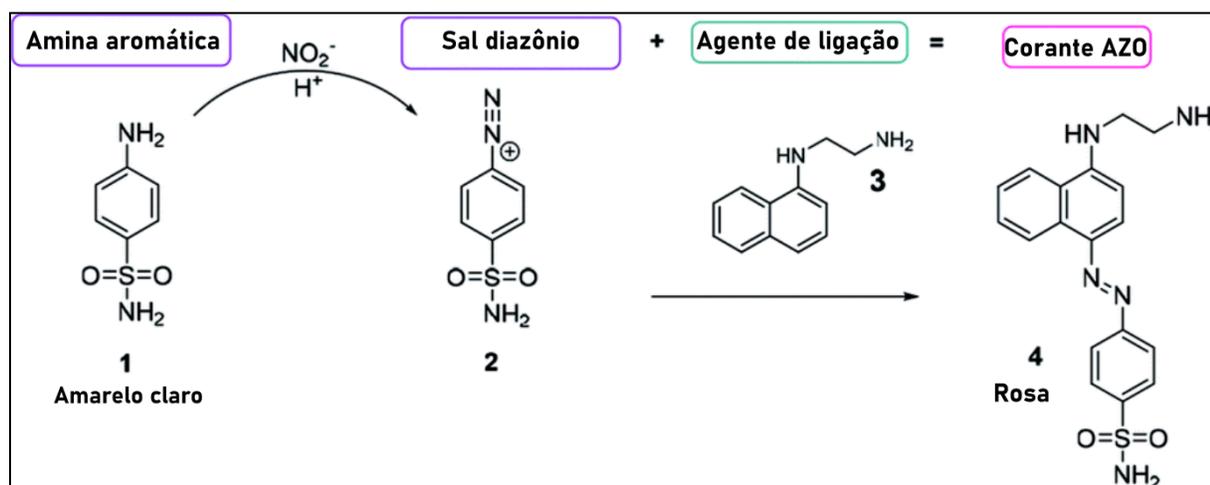
Os valores obtidos neste ensaio foram cruciais para a determinação das concentrações das substâncias utilizadas no ensaio de dosagem de nitrito (NO_2^-), já que o objetivo deste ensaio é a estimulação e não a ação tóxica às culturas de macrófagos do tipo RAW 264.7. Determinado o valor de CC_{50} este foi usado como referência para a escolha dos valores da concentração a serem utilizadas nos próximos ensaios. Observa-se que dentre as substâncias, a **CBD_R104** obteve o valor mais baixo de CC_{50} e por ser um valor de concentração difícil de se trabalhar, então, ao contrário das outras substâncias que o valor de CC_{50} foi o ponto de partida na determinação do intervalo de testagem. Os intervalos foram escolhidos de forma empírica visando estabelecer uma margem de testagem que abrangesse o maior intervalo.

5.3.2 Discussão dos resultados do ensaio de dosagem de NO_2^-

O ensaio para a detecção da concentração de NO_2^- foi realizado utilizando o reagente de Griess, que detecta o nível de NO_2^- das amostras. Existem dois reagentes de Griess o 1 e o 2, sendo que o 1 possui sulfanilamida, diluída em H_3PO_4 , que reage com o nitrito gerando uma

espécie de sal de diazônio como produto. O sal reage com o reagente de Griess 2 produzindo um corante AZO de coloração rosa (**Figura 40**). Sendo assim, quanto maior a formação de nitrito mais rosa fica o meio. Então, é essa mudança de cor que é avaliada no espectrofotômetro.

Figura 40- Etapas de reações utilizando o reagente de Griess para dosagem de NO_2^- nas amostras.



Adaptado Váradi *et al.* (2019)

De todo modo, é crucial ressaltar que não é possível medir a concentração de óxido nítrico por se tratar de um gás que tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. Então, a dosagem de NO_2^- foi performada com as concentrações das substâncias descritas na **Tabela 5**. Os resultados obtidos sugerem inibição da produção do NO_2^- nas células tratadas com todas as substâncias. Observa-se que no controle positivo, macrófago tratado somente com o LPS, houve o aumento da concentração de NO_2^- ($21,13 \mu\text{M} \pm 2,81$), comparando com o controle negativo, macrófagos sem tratamento ($0,94 \mu\text{M} \pm 0,19$) (**Tabela 13**), comprovando que houve o estímulo esperado pelo LPS e, então, o aumento da concentração de NO_2^- . O tratamento com o **CBD** evidencia uma ação inibitória concentração-dependente, porque além da substância diminuir a concentração de nitrito,

comparando com o controle LPS, os valores de NO_2^- na concentração de **CBD** testada de 2,5 μM ($3,18 \mu\text{M} \pm 2,69$) é maior que a da outra concentração de tratamento a 5 μM ($1,21 \mu\text{M} \pm 1,26$).

Tabela 16- Concentração de nitrito mensurado nas células tratadas com as substâncias e estimuladas com LPS. Observa-se as médias das concentrações e seus respectivos DP's (continua)

Substâncias	Concentração do tratamento (μM)	Concentração de NO_2^- (μM) \pm DP	
		sem LPS	com LPS
RAW	-	$0,94 \pm 0,19$	$21,13 \pm 2,81$
CBD	2,5	$0,93 \pm 0,26$	$3,18 \pm 2,69$
	5	$0,71 \pm 0,37$	$1,21 \pm 1,26$
	10	$0,38 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,12$
DeT_CBD	20	ND*	$0,22 \pm 0,42$
	30	$0,05 \pm 0,09$	ND*
	1	$0,65 \pm 0,47$	$1,66 \pm 1,05$
CBD_R104	4	$0,89 \pm 0,63$	$1,54 \pm 0,28$
	7	$1,67 \pm 0,51$	$0,89 \pm 0,02$
	10	ND*	$1,24 \pm 0,05$
RAC6	20	$0,07 \pm 0,21$	$1,37 \pm 0,19$
	30	$0,96 \pm 0,12$	$5,67 \pm 0,14$

Tabela 17- Concentração de nitrito mensurado nas células tratadas com as substâncias e estimuladas com LPS. Observa-se as médias das concentrações e seus respectivos DPs (conclusão)

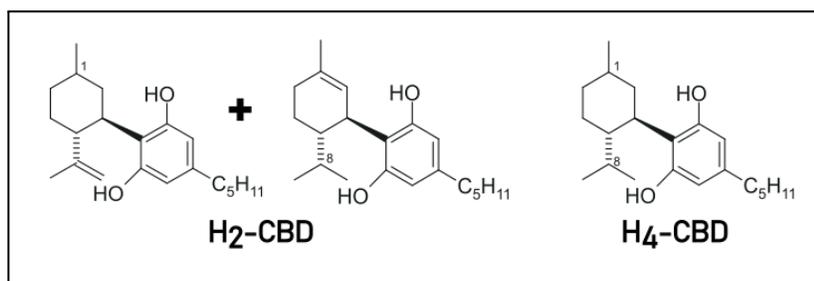
Substâncias	Concentração do tratamento (μM)	Concentração de NO_2^- (μM) \pm DP	
		sem LPS	com LPS
RAC6-Ab	10	1,19 \pm 0,30	0,96 \pm 0,63
	20	0,81 \pm 0,51	0,74 \pm 0,33
	40	1,37 \pm 0,14	1,87 \pm 1,08
ND* = não determinada			

Em contrapartida, o derivado **CBD_R104** também apresentou a mesma atividade concentração-dependente, visto que a maior concentração de NO_2^- aparece na menor concentração da substância, que é 1 μM (1,66 $\mu\text{M} \pm 1,05$), e assim as menores concentrações de nitrito nas maiores concentrações de **CBD_R104**, 4 μM (1,54 $\mu\text{M} \pm 0,28$) e em 7 μM (0,89 $\mu\text{M} \pm 0,02$). O tratamento com análogo **RAC6Ab** se manteve baixa em todas as concentrações testadas do análogo, embora o aumento da concentração de nitrito tenha sido concentração-dependente. Sendo que o tratamento com 10 μM , 20 μM e 40 μM do análogo obteve-se 1,37 $\mu\text{M} \pm 0,19$, 5,67 $\mu\text{M} \pm 0,14$ e 0,96 $\mu\text{M} \pm 0,63$ de nitrito, respectivamente. O mesmo não foi observado para o **RAC6**, o qual nas concentrações de 10, 20 e 30 μM , foi detectado 1,24 $\mu\text{M} \pm 0,05$, 1,37 $\mu\text{M} \pm 0,19$ e 5,67 $\mu\text{M} \pm 0,14$ de nitrito, respectivamente. Nos macrófagos tratados com o derivado **DeT_CBD** não houveram acima de 1 μM de NO_2^- em nenhuma das concentrações testadas.

Os resultados da dosagem de NO_2^- nas células tratadas com o **CBD** e o LPS foram condizentes com o que é relatado na literatura, sendo o fitocanabinoide capaz de inibir a produção de NO_2^- nos macrófagos (MECHOULAM *et al.*, 2002a). Por conseguinte, o **CBD**, que já demonstra um potencial anti-inflamatório inibindo a produção de NO_2^- , porém no presente estudo acredita-se que ocorreu a polarização dos macrófagos em M1, contribuindo, assim, para o aumento da produção de NO_2^- . Considera-se que uma das vias de ação pela qual

o **CBD** atua no controle a expressão de NO_2^- é pela ativação do fator nuclear Kappa-B (NF-kB), que está diretamente ligado à transcrição da enzima que catalisa a reação de síntese de NO_2^- a NO sintase induzida (iNOS). Mais precisamente o **CBD** inibe a fosforilação da quinase p38 MAP que ativa a transcrição do fator nuclear (ESPOSITO *et al.*, 2006). Da mesma forma, as substâncias **RAC6** e **RAC6_Ab**, no presente estudo, apresentaram o mesmo padrão inibitório, em que a concentração de NO_2^- evidenciam-se ainda mais baixas que o controle positivo, células estimuladas por LPS, mas também que os poços estimulados por LPS e tratados com **CBD**. Tal comportamento seria esperado tendo em vista trabalhos que descrevem a ação anti-inflamatória de derivados hidrogenados do **CBD**. Esses derivados hidrogenados do **CBD**, mostrados na **Figura 41**, foram potencialmente inibitórios na produção de nitrito, sendo que os dois derivados di-(H_2 -CBD) e tetra (H_4 -CBD) hidrogenados do **CBD** promoveram cerca de 80% de inibição (BEN SHABAT *et al.*, 2006).

Figura 41- Estrutura dos derivados hidrogenados do CBD.



Fonte: BEN SHABAT *et al.* (2006)

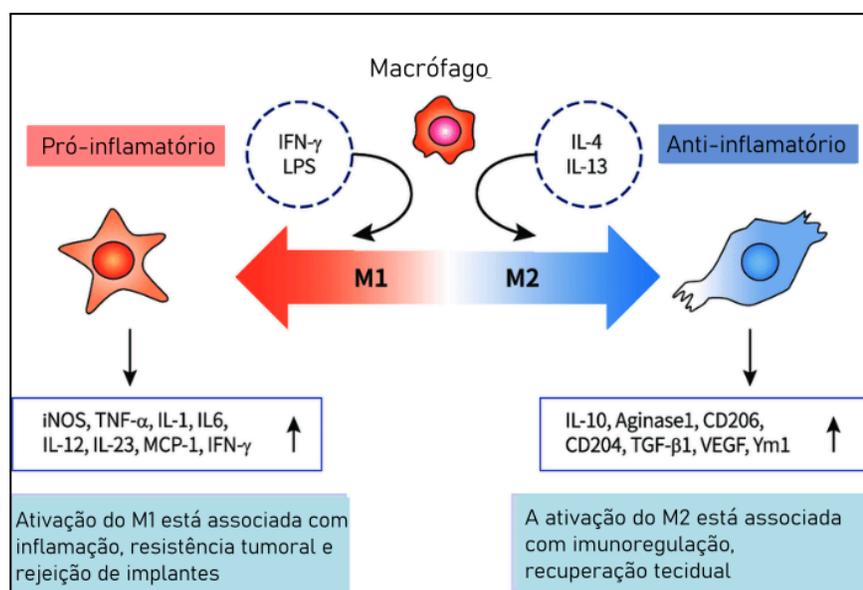
5.3.3 Resultados e discussão da dosagem de citocinas

O ensaio foi realizado em simplicata devido à escassez de reagentes e recursos, o que não garante robustez aos resultados. Por outro lado, os resultados são uma tendência do comportamento das amostras e é crucial repetir esse ensaio. A dosagem de citocinas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA, nele ocorre a interação dos anticorpos, que estão nas *Beads* de captura, com as citocinas presentes na amostra, e um segundo anticorpo acoplado a um fluorocromo permite avaliar a presença das citocinas. A concentração das citocinas foi calculada baseada em uma curva-padrão.

Dentre as sete citocinas mensuradas IL-10 e IFN- γ não obtiveram resultados detectáveis, além das interleucinas IL-2, IL-4 e IL-17A terem apresentado uma expressão baixa e aleatória. Cabe lembrar que os experimentos de dosagem de citocinas foram realizados em simplicata, não sendo viável afirmar se a falta de expressão dessas citocinas, a secreção baixíssima em algumas condições de tratamento, é um padrão ou foi algum erro ou interferência de reagente ou equipamento.

Antes de dar continuação à análise dos dados da secreção das citocinas, é necessário discutir sobre a diferenciação dos macrófagos. Como citado anteriormente, essas células de defesa ao receberem um estímulo podem sofrer diferenciações para macrófagos do tipo 1 (M1) ou tipo 2 (M2), conforme ilustrado na **Figura 42**. Primeiramente, os M1 são ativados mediante o estímulo por produtos de micro-organismos, como LPS, além disso, esses macrófagos expressam citocinas como o TNF e IL-6, atuando na fase inicial da inflamação (TSAI *et al*, 2022). Por outro lado, os macrófagos M2 tem ação supressora da inflamação, sendo ativados por citocinas como IL-10 ou IL-4 e então expressam citocinas anti-inflamatórias O M1 é o macrófago de primeira resposta sendo ativado primeiramente e o M2 como alternativa, e os dois subtipos podem se interconverter rapidamente mediante o estímulo (LEE, 2019).

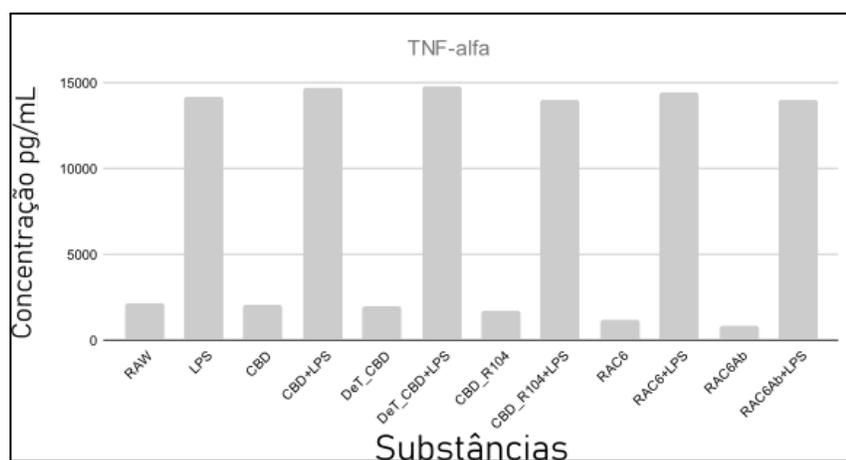
Figura 42 - Esquema mostrando os macrófagos M1 e M2 com o estímulo e as citocinas que cada tipo pode expressar. A seta em curva significa o tipo de estímulo necessário para a polarização dos macrófagos.



Adaptado Lee (2019)

Sendo assim, considerando o resultado da leitura dessas outras duas citocinas pelo CBA, infere-se que houve a diferenciação dos macrófagos para M1. Reforçando que esse é somente um parâmetro para determinar essa diferenciação e outros testes precisam ser feitos para a devida confirmação, inclusive que o teste em questão seja feito em triplicata, até mesmo para garantir mais robustez aos resultados obtidos nesse teste. De toda forma, um dos fatores para considerar essa polarização em M1, além do estímulo que foi feito por LPS, foi que a TNF- α foi uma das citocinas mais expressas pelas células. Vale ressaltar que as células que não receberam estímulo pelo LPS haviam expressado a citocina, entretanto de forma bem mais amena, como observa-se no gráfico da **Figura 43**. Então, vê-se que nas células tratadas com as substâncias e estimuladas com LPS houve um aumento da produção de TNF- α .

Figura 43- Gráfico do resultado da dosagem da citocina TNF- α nas células sem estímulo, estimuladas por LPS e tratadas com as substâncias CBD, DeT_CBD, CBD_R104, RAC6 e RAC6_Ab. Nos eixos *x* representa a identificação das substâncias, nos eixos *y* nota-se a concentração das citocinas em pg/mL. Os resultados foram obtidos por meio do Software FCAP BDBiosystems.

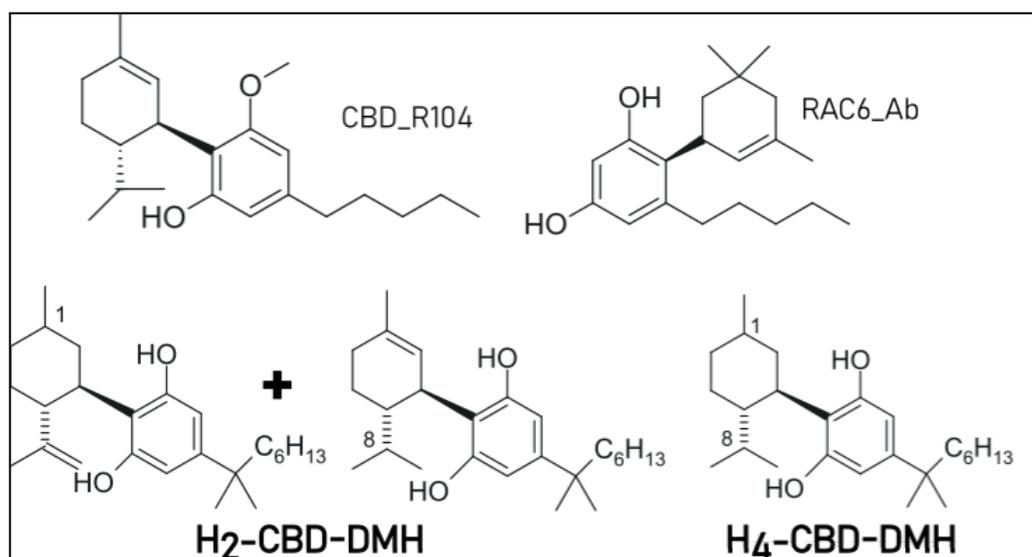


Nota-se que a concentração de TNF- α foi maior nas células que haviam sido estimuladas por LPS. As células que foram estimuladas e tratadas com **CBD** obtiveram 14.672,17 pg/mL, contra 14.172.48 pg/mL do controle positivo, ou seja, as células estimuladas pelo LPS e não tratadas. Os macrófagos tratados com **DeT_CBD** também obtiveram concentrações maiores que o controle positivo, de 14.820.85 pg/mL. Por outro lado, as outras substâncias não demonstraram um comportamento parecido quanto à expressão da citocina TNF- α , como por exemplo, o **CBD_R104** com 13.959,19 pg/mL, e as tratadas com **RAC6** com 14.397.17 pg/mL, o que, provavelmente, não é estatisticamente diferente. Como a diferença entre os valores de controle positivo e das células tratadas pelas substâncias é muito pequena, não é possível inferir se essa diferença é ou não significativa, visto que o experimento foi feito em simplicata.

O **CBD** pode apresentar um comportamento modulador da inflamação, assim como outros fitocanabinoides (HENSHAW, *et al.*,2021). Todavia, ressalta-se que a atividade estimuladora de citocinas pelo **CBD** e de alguns outros análogos já haviam sido descrita (BURSTEIN, 2015). O papel pró-inflamatório do **CBD** já foi descrito por Karmaus *et al.*

(2013) que propuseram que ele atua por meio da ativação do fator de transcrição fator nuclear de células T ativadas (NFAT), que é um fator participante da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, Ben-Shabat *et al.* (2006) também descreveram que a estimulação do TNF- α ocorre de forma dose-dependente. Nesta pesquisa o **CBD** nas concentrações de 1 e 4 $\mu\text{g/mL}$ consegue estimular a ativação do NFAT. Ainda o estudo de Ben-Shabat *et al.* (2006) traz registros da ação dos derivados hidrogenados DMH-CBD, sendo dois dihidrogenados e um tetrahidrogenado (**Figura 44**), que atuam estimulando a secreção do TNF- α , com estímulo por LPS, de forma concentração-dependente nas concentrações de 1, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ (BEN SHABAT *et al.*, 2006; MORALES *et al.* 2017) O mesmo é observado nas substâncias **DeT_CBDB** e **RAC6** (**Figura 44**), e ambas possuem semelhanças estruturais aos derivados hidrogenados DMH-CBD.

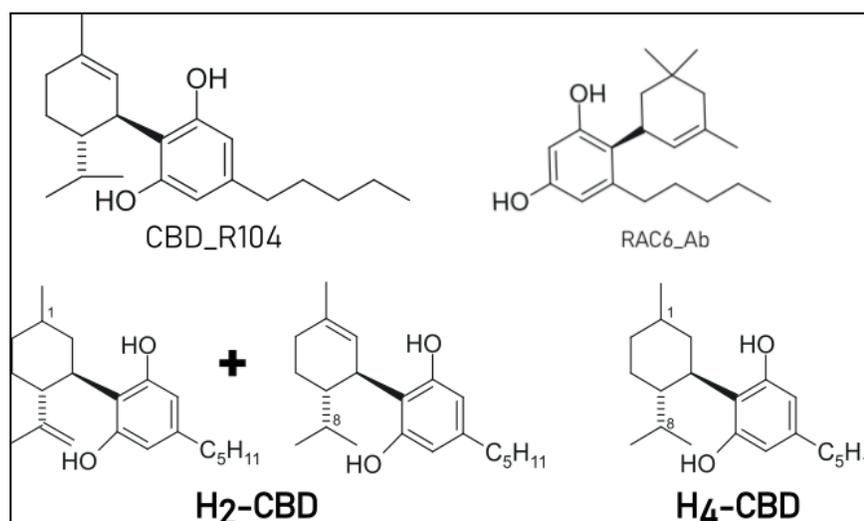
Figura 44 – Estrutura das substâncias do presente estudo RAC6 e DeT_CBD, e a dos derivados hidrogenados DMH do CBD estudados por BEN SHABAT *et al.* (2006) para determinação do potencial de ação frente à inflamação. As substâncias mostradas demonstraram potencial de ação pró-inflamatória não suprimindo a expressão de TNF- α .



No entanto, o **CBD** também atua suprimindo a produção de TNF- α , o que não é observado nos resultados obtidos no presente trabalho. A diferença entre os resultados pode ser observada pela dosagem e o modelo utilizados. Por conseguinte, no trabalho de Ben-Shabat

et al. (2006), na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ o **CBD** inibe cerca de 100% a formação da citocina. Além disso, é descrito o controle do TNF- α em células intestinais de camundongos induzidas por LPS pelo **CBD** a 10 mg/kg (DE FILIPPIS *et al.*, 2011). Da mesma forma, o **CBD_R104** obteve sua concentração de TNF- α menor do que a do controle, assim como o **RAC6_Ab**, mesmo que estatisticamente a diferença seja insignificante. Na literatura encontram-se exemplos de substâncias derivadas com esse padrão, como outros derivados hidrogenados, os H2-CBD e H4-CBD, mostrados na **Figura 45**, que foram testados nas concentrações de 1, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos murinos, e os resultados foram concentração-dependente, sendo a maior concentração resultando em 80% de inibição (BEN SHABAT *et al.*, 2006). Nesse caso, observam-se mudanças estruturais assim como nos derivados hidrogenados. Por exemplo, o **CBD_R104** tem uma redução em C8, assim como mostrado na **Figura 45**, e o **RAC6_Ab** possui apenas uma das insaturações observadas no **CBD**.

Figura 45 -Estruturas das substâncias CBD_R104 e RAC6_Ab, e a dos derivados hidrogenados do CBD.

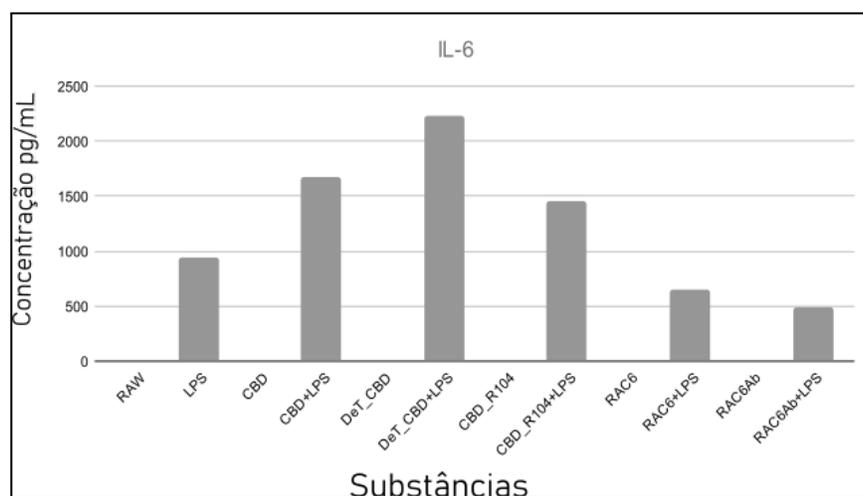


Adaptado Ben-Shabat et al. (2006)

Por outro lado, a expressão da IL-6 também é considerada um parâmetro para inferir essa diferenciação dos macrófagos em M1, considerando que tal interleucina é uma citocina pró-inflamatória, ou seja, sua presença é notada em situação em que há uma atividade

pró-inflamatória por parte dos macrófagos (SAQUIB *et al.*, 2018). De qualquer forma, vê-se no gráfico de expressão dessa citocina por parte dos macrófagos (**Figura 46**), que ele segue um padrão em todas as substâncias e no controle também. Tal padrão seria a ausência da IL-6 em todas as células que não foram estimuladas por LPS. Não é possível afirmar que as substâncias **DeT_CBD** e **CBD_R104** e o **CBD** resultaram em maior secreção de IL-6 que o controle, considerando que o experimento foi feito em simplicata.

Figura 46 - Gráfico apresenta o resultado da dosagem da citocina IL-6 nas células sem estímulo, estimuladas por LPS e tratadas com as substâncias CBD, DeT_CBD, CBD_R104, RAC6 e RAC6_Ab. No eixo *x* estão identificadas as substâncias e no eixo *y* a concentração das citocinas em pg/mL. Os resultados foram obtidos utilizando o Software FCAP BDBiosystems.

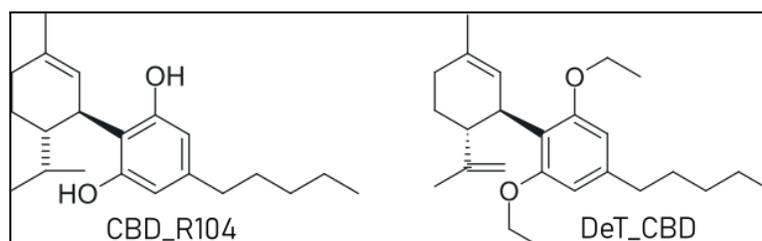


Além disso, nota-se que as concentrações da citocina IL-6 em todos os poços em que as células não foram estimuladas não secretam a interleucina. Por outro lado, células tratadas com **CBD** obtiveram 1.679,95 pg/mL, contra 948,72 pg/mL nos poços com células estimuladas pelo LPS. Nas células tratadas com **DeT_CBD** houve 2.225,42 g/mL da concentração de IL-6, apresentando a maior expressão da interleucina de todos os tratamentos com as substâncias do presente estudo. Os macrófagos tratados com a substância **CBD_R104** também tiveram a concentração da citocina acima do controle positivo sendo 1455.08 pg/mL. Não obstante, as células estimuladas pelo LPS e tratadas com as substâncias **RAC6** e **RAC6_Ab** secretaram menos IL-6 que o controle positivo, por exemplo, nas células tratadas

com **RAC6** a concentração foi de 649,85 pg/mL e com **RAC6_Ab** foi de 484,78 pg/mL de IL-6. Entretanto, os valores obtidos nesse teste demonstram uma tendência no comportamento das células, devido ao teste ter sido feito em simplicata. Outrossim, os resultados não são robustos para afirmar que é esse o comportamento das células tratadas e não produto de alguma interferência.

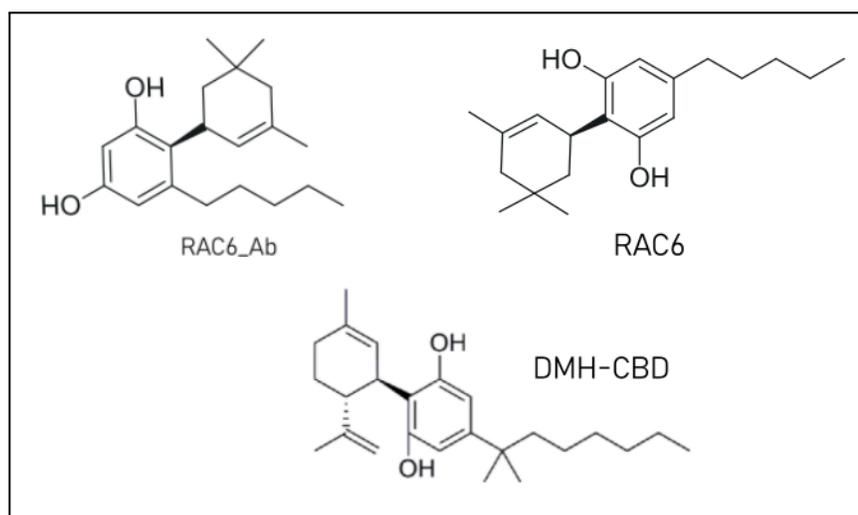
Desta maneira, as substâncias **CBD**, **DeT_CBD** e **CBD_R104** aparentam ter estimulado a produção da IL-6 nos macrófagos que haviam sido estimulados pelo LPS e acredita-se que isso possa estar relacionado à ação dos macrófagos M1. Além disso, a IL-6 é uma interleucina produzida em resposta a infecções e danos teciduais, contribuindo na defesa de organismos externos por meio do estímulo da resposta inflamatória aguda, hematopoiese e reações imunológicas (TANAKA *et al.*, 2014). Entretanto, o aumento desta interleucina resulta na polarização dos macrófagos do tipo M1 em M2, visto que esse processo ocorre rapidamente e de forma constante, e esse subtipo conhecidamente atua na contenção da inflamação (LEE, 2019). Dessa forma, estudos demonstraram que o **CBD** modula, podendo até inibir, a produção da interleucina, como expõe Sermet *et al.* (2021). Nesse estudo foi demonstrado que o **CBD** interage com os receptores *Tool-Like* (TLR), que liberam citocinas e ativam sistema imune de primeira resposta, como a IL-6. Além disso, avaliou-se nove TLR e demonstrou-se que o **CBD** interage com sete deles, sendo o TLR8 responsável por promover a secreção da IL-6 (SERMET *et al.*, 2021). Especula-se que os derivados avaliados no presente trabalho, **DeT_CBD** e **CBD_R104** (**Figura 47**), possam atuar pela mesma via no aumento da secreção da citocina IL-6, certamente serão necessários estudos futuros analisando a via de ação dessas substâncias.

Figura 47- Estrutura das substâncias CBD_R104 e DeT_CBD



Em contraste com os resultados pró-inflamatórios, ressalta-se que os análogos avaliados nesses experimentos, **RAC6** e **RAC6_Ab** (**Figura 48**), mostraram um potencial de ação anti-inflamatório. Juknat *et al* (2016) conduziram estudos quanto ao potencial inflamatório do derivado DMH-CBD (**Figura 48**), e demonstraram que essa substância atua a nível molecular na produção e secreção da interleucina. O DMH-CBD reduz a expressão do mRNA do IL-6 em células microgliais, com ou sem estímulo pelo LPS. Adicionalmente, DMH-CBD atuou de forma concentração-dependente, nas concentrações de 1, 5 e 10 μM , sendo a última concentração de tratamento a que obteve menor expressão do mRNA nas células (JUKNAT *et al.*, 2016). Embora a ação dos análogos testados no presente estudo pareça diferente do padrão **CBD**, tal substância também demonstrou seu potencial anti-inflamatório. No estudo desenvolvido por Vuolo *et al* (2015) há indícios que o **CBD** possui a capacidade de diminuir os níveis de IL-6 no plasma de camundongos machos Wistar, em quadro de asma induzido por ovoalbumina durante oito semanas, na dose de 5 mg/kg i.p. administrada nos dois últimos dias da indução (VUOLO *et al.*, 2015).

Figura 48 - Estrutura do RAC6 e RAC6_Ab e do DMH-CBD descrito como potencial anti-inflamatório por JUKNAT *et al.* (2016)



Em suma, existem muitas considerações a serem feitas diante dos resultados obtidos nesse experimento. Primeiramente, as substâncias avaliadas possuem atividade inibitória da produção de nitrito nos macrófagos estimulados por LPS. Algumas delas também

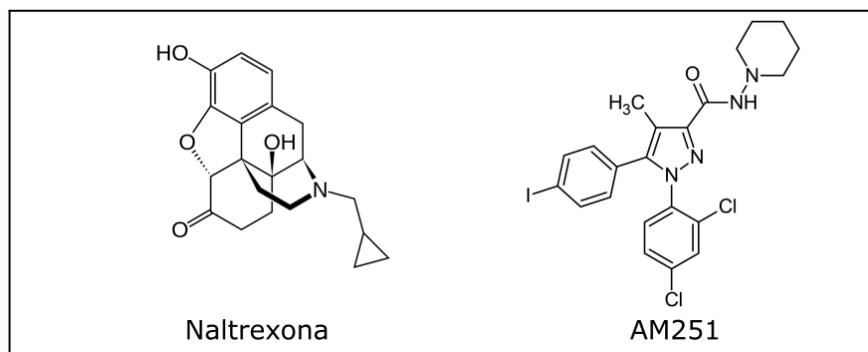
demonstraram uma ação concentração-dependente, como **CBD** e **CBD_R104**. As outras substâncias não atuam de forma concentração-dependente, mas a concentração de NO nas células tratadas estavam mais baixas que as dos macrófagos estimulados por LPS sem tratamento. Tal comportamento foi mostrado anteriormente, como o padrão esperado pelo **CBD** e por derivados e análogos do fitocanabinoide. Outrossim, a expressão de citocinas pelas células estimuladas pelo LPS e tratadas com as substâncias apresenta diversos caminhos para discussão. Além disso, a maior parte das citocinas que foram medidas pelo experimento não demonstrou uma concentração expressiva, somente as citocinas TNF- α e IL-6. Esse padrão é característico da polarização dos macrófagos para M1, um tipo de macrófago para respostas inflamatórias agudas. Dessa forma, todas as substâncias incitaram a expressão da citocina TNF- α nas células estimuladas por LPS. Alguns exemplos na literatura citados anteriormente demonstram que outros derivados do **CBD** e o próprio fitocanabinoide atuam da mesma forma. Quanto à expressão da IL-6 houve uma divergência de comportamento por parte das substâncias nas células estimuladas por LPS. **RAC6** e **RAC6_Ab** apresentaram um potencial redutor na expressão de IL-6, em contrapartida, **DeT_CBD** e **CBD_R104** aumentaram a expressão dessa interleucina. Como colocado anteriormente, a literatura mostra que os dois caminhos são possíveis, porém as condições e estímulos variam. Conclui-se que estudos futuros são cruciais para determinação do mecanismo de atuação das moléculas e como as condições externas, quanto ao estímulo e célula, por exemplo, podem influenciar nos estudos.

5.4 Avaliação da atividade do RAC6 em modelo de dor neuropática e proposição de uma possível via mecanística

Os resultados demonstrados a seguir foram fruto da indução da dor neuropática pelo PAC. Tal processo é feito de forma gradativa e contínua por 8 dias em que doses de 2 mg/kg do PAC foram administradas em camundongos dos grupos testados. As administrações aconteceram em dias alternados, totalizando quatro aplicações, em conjunto com a aplicações do análogo e do **CBD**. No 14º de tratamento foram feitos a averiguação dos parâmetros para DN, como alodinia mecânica, controle da coordenação motora e a via mecanística. No caso dos estudos de alodinia e coordenação motora a aferição dos parâmetros foi feita nas horas 1, 3, 5 e 7. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no último dia do

experimento, sendo esse o 14º dia após a primeira aplicação do PAC. Os experimentos para determinar a provável via de atuação do **RAC6** contou com testes de alodínia mecânica para determinar se a utilização dos antagonistas dos receptores CB1 e opióides levaria a o aumento ou diminuição da DN, mesmo depois do tratamento com as substâncias. Os antagonistas usados foram o AM251, como antagonista do receptor CB1, e a naltrexona como antagonista dos receptores opióides e ambos estão representados na **Figura 49**. Além disso, nota-se que somente o **RAC6** foi avaliado nesses ensaios, tendo sido selecionado em razão de sua atividade promissora na maioria dos outros ensaios realizados

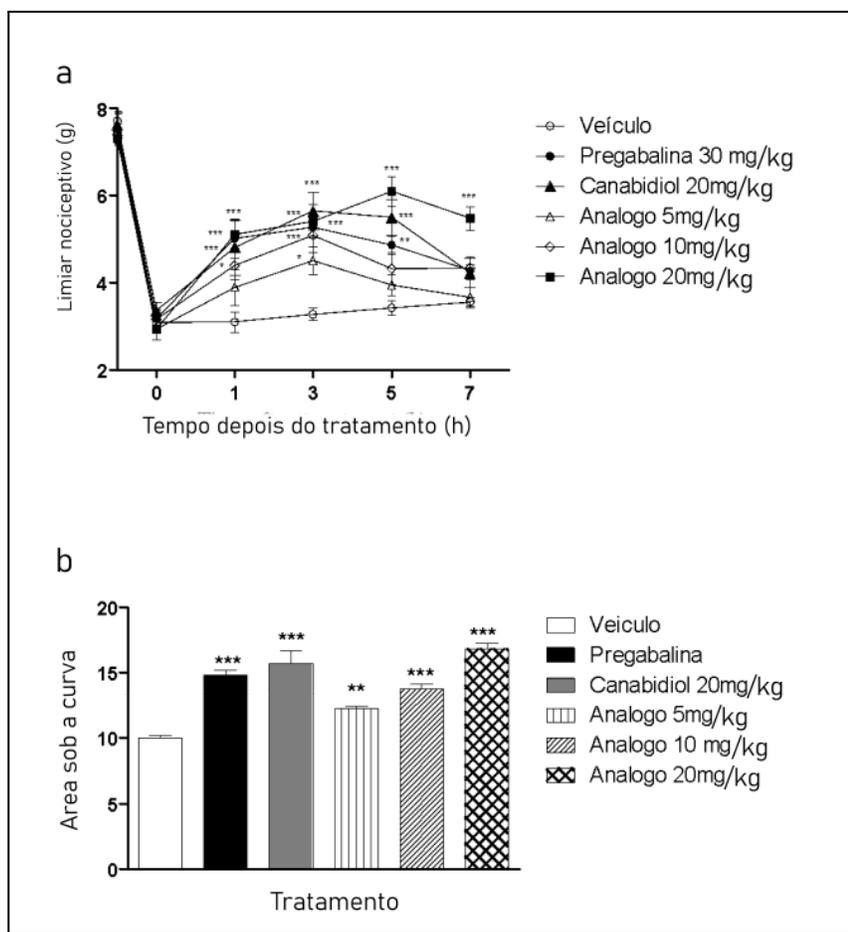
Figura 49 - Estruturas dos antagonistas usados neste estudo: naltrexona é o antagonista do receptor opióide e AM251 é um antagonista do receptor CB1.



Desta forma, os ensaios de avaliação da atividade antinociceptiva do **RAC6** demonstraram resultados bastante promissores, conforme pode ser observado pela análise dos gráficos da relação entre o limiar nociceptivo e o tempo após tratamento mostrado na **Figura 50**. O **RAC6** foi administrado em três doses diferentes, 5, 10 e 20 mg/Kg para determinar se a substância atua de forma dose-dependente. O **CBD** e a pregabalina foram administrados em dose única, de 20 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. A pregabalina é o medicamento considerado padrão ouro no tratamento da dor neuropática, sendo esse o controle positivo do experimento. Observa-se que o **RAC6** na dose de 20 mg/kg foi tão ativo quanto o **CBD** na mesma dosagem. Fica evidente que nessa dosagem o efeito foi mais prolongado, sendo o pico de ação de 5 horas após a administração da substância. Ainda assim, observa-se

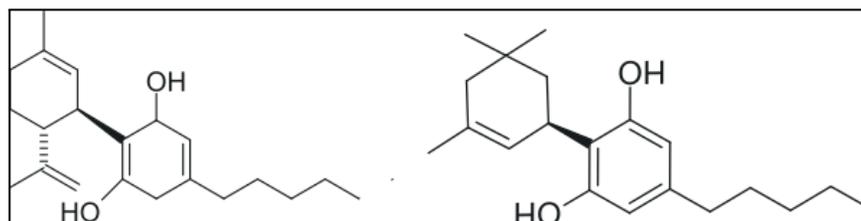
no gráfico na **Figura 50b** que esta substância possui uma ação dose-dependente, ou seja, à medida que a dose administrada aumenta, o limiar nociceptivo também aumenta. Sendo assim, o grupo que recebeu a maior dose do **RAC6** (20 mg/kg) é também o grupo com maior resistência de estímulo à dor.

Figura 50 - Gráficos dos níveis de alodinia avaliados pelo ensaio de Von Frey para o análogo RAC6 nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg o CBD 20 mg/kg, pregabalina 30 mg/kg, e o veículo. O gráfico (a) demonstra a relação do tempo de movimentação da pata mediante o estímulo à dor após o tempo de tratamento de 1, 3, 5 e 7 horas. No gráfico (b) observa-se a área sob a curva de cada composto analisado nas respectivas concentrações. O valor de significância considerado foi de $p < 0,005$. Os resultados com *** demonstram valores com diferença significativa em relação ao controle, e ** em relação ao controle.



Com base nestes resultados, preconizou-se a dose de 20 mg/kg do **RAC6** como a mais efetiva. Segundo o WHO (2017) essa é a dose limite recomendada na utilização do Epidiolex (medicamento à base de CBD), entretanto, nessa dosagem alguns efeitos adversos são observados para o **CBD** (WHO, 2017). Evidentemente, outros testes de toxicidade são necessários para avaliar a segurança do análogo **RAC6** e verificar se nessa mesma dosagem não provoca efeitos adversos significativos, uma vez que possui semelhança estrutural com o **CBD**, como observado na **Figura 51**. Mesmo assim, o **CBD** possui resultados satisfatórios quanto à pesquisa do seu uso no tratamento da DN *in vivo*. O mecanismo de ação proposto do **CBD** passa pela ativação do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, na redução da DN, ainda assim, há registros que o bloqueio dos receptores CB interfere na ação do fitocanabinoide no controle da DN, mas não tanto quanto o bloqueio do receptor 5-HT_{1A} (MLOST *et al.*, 2020; WARD *et al.*, 2014).

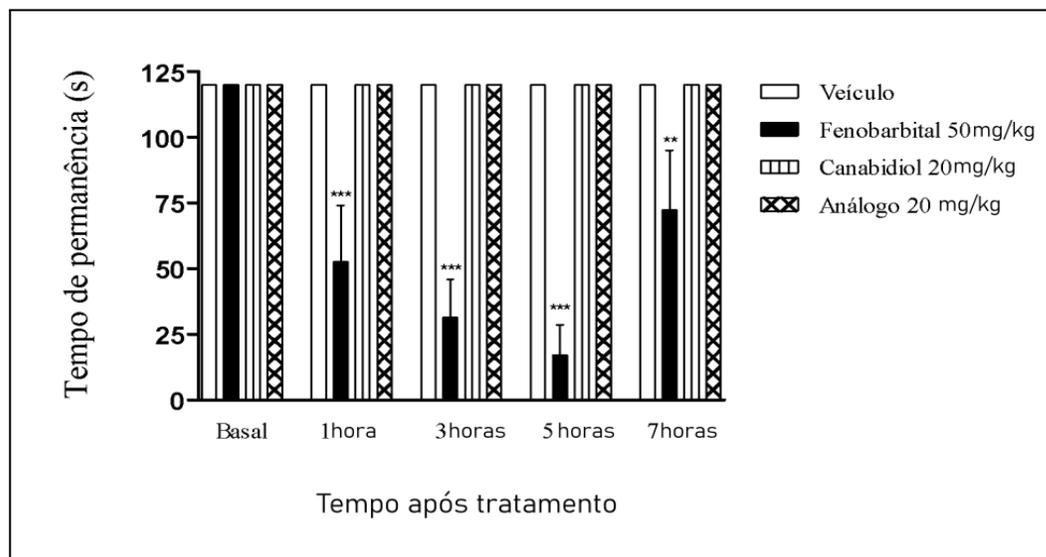
Figura 51- Estrutura do CBD e o análogo RAC6



Ademais, é importante investigar qualquer atividade das substâncias que promovam alguma alteração no equilíbrio quando se determina o potencial de controle da DN. Isso porque a avaliação da alodínia é feita nas patas dos animais, então se há alguma alteração da coordenação motora ou até mesmo um relaxamento muscular, o ensaio seria tendencioso. Sendo assim, avalia-se os animais no ROTA-ROD, um aparelho que mensura o tempo que o animal consegue se equilibrar numa haste de madeira que fica girando. Nesse caso, usa-se o fenobarbital 30 mg/kg no grupo controle positivo, uma vez que ele altera a percepção de equilíbrio do animal, diminuindo seu tempo de permanência no aparelho. O **CBD** na dose de 20 mg/kg foi administrado nos animais de outro grupo, assim como um outro grupo de animais recebeu o **RAC6** na dose de 20 mg/kg, já que essa foi a dose que demonstrou os resultados mais promissores no ensaio de alodínia. Houve também um grupo de animais que receberam

somente o veículo (Cremophor 5%, Etanol 5% em salina estéril), que serve também como controle do tratamento com o PAC. No gráfico mostrado na **Figura 52** observa-se o tempo de permanência no ROTA-ROD de cada grupo tratado com cada substância e o tempo em que os animais foram avaliados, com a finalidade de analisar os efeitos das substâncias em diferentes horas após o tratamento. Como resultado, não houve diferença significativa entre o grupo veículo, tratado com **CBD** e **RAC6** em nenhuma hora após o tratamento. Por outro lado, o grupo tratado com o fenobarbital teve uma queda no tempo de permanência ao longo das horas, chegando no pior tempo 5 horas após o tratamento. Esse resultado já era esperado, contando que a função do fenobarbital neste ensaio é justamente servir de parâmetro para caso o **RAC6** apresentasse atividade que alterasse o equilíbrio dos animais. Em suma, a **CBD** e o **RAC6** demonstraram resultados bem semelhantes, o tempo de permanência mostrou uma frequência semelhante ao basal, independente da hora, inferindo a ausência da alteração motora deste análogo e o CBD.

Figura 52 - Gráfico representando o potencial de relaxamento muscular das substâncias testadas mediante o tempo de permanência dos animais na manilha do aparelho ROTA-ROD, após 1, 3, 5 e 7 horas do tratamento, inferindo alteração no movimento. O fármaco utilizado como controle para o teste foi o fenobarbital na dose de 50 mg/kg. O CBD e o RAC6 foram avaliados na dose de 20 mg/Kg. A significância foi determinada no valor de $p < 0,005$. Os dados com ** e *** apresentam diferença significativa em relação ao controle.

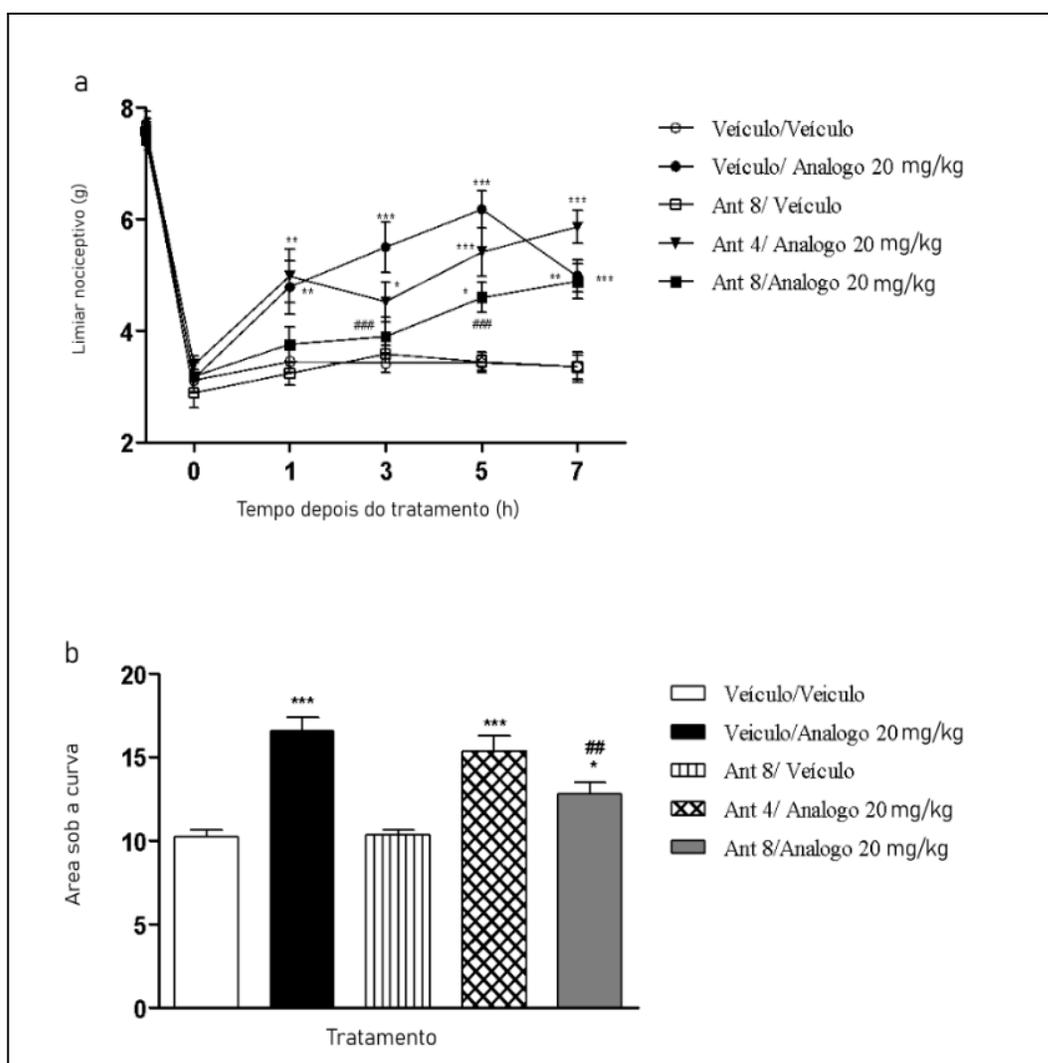


O análogo do **CBD** escolhido para avaliação da atividade analgésica mostrou-se promissor para um potencial uso no seu tratamento da DN, aumentando o limiar da retirada de pata dos animais nos testes de alodinia. Além do mais, ele não apresentou atividade sedativa quando comparado ao fenobarbital, no teste de ROTA-ROD, já que os animais tratados com **RAC6** permaneceram no aparelho no limite basal. O **CBD** pode em si apresentar um efeito sedativo quando administrado em doses altas (MECHOULAM *et al*, 2002a; PICKENS, 1984). Entretanto, não possui o mesmo efeito sedativo em comparação com o fenobarbital, ainda que ambos atuem como anticonvulsivantes por vias semelhantes (LEWIS & ADAMS, 2022). Então, o **RAC6** não desempenha o mesmo papel que o fármaco controle, reforçando que o aumento do limiar nociceptivo estaria ligado ao seu potencial analgésico.

Sabendo-se que o **RAC6** potencialmente inibe a dor neuropática, excluindo alguma ação que favoreça e/ou exacerba um prejuízo motor, foram analisadas possíveis vias de ação desta substância. Assim, prosseguiu-se com a análise da alodinia mecânica utilizando o antagonista do CB1, AM251, que compõem uma das vias propostas para a ação do **CBD**. Cabe ressaltar que como forma de avaliar a atividade do **RAC6** no controle da dor, o antagonista do CB1 foi administrado em conjunto com essa substância, dessa forma é possível analisar se a presença do AM251 leva a inibição dessa atividade ou não. Dessarte, observa-se no gráfico da **Figura 53a** a relação entre o limiar nociceptivo e os diferentes tempos após a administração do **RAC6** na dose de 20 mg/kg, do antagonista AM251 nas doses de 4 e 8 mg/kg e do veículo. Pode-se inferir que o análogo atua por meio da interação com o receptor CB1, em razão da diminuição notável do limiar de retirada de pata quando a administração da substância é feita junto ao antagonista. Isso se comprova com a relação entre a diminuição da atividade e o aumento da dose do antagonista, e denota também uma interação dose-dependente conforme proposto anteriormente. Outro ponto a ressaltar é que o pico de ação, ou seja, o maior tempo de retirada da pata dos camundongos ocorreu em horas diferentes. Observando o gráfico na **Figura 53b** vê-se que, com exceção do grupo tratado somente com o veículo e o veículo em conjunto com o antagonista a 8mg/kg, o grupo tratado com o antagonista a 8 mg/kg associado ao análogo a 20 mg/kg possui a menor área sob a curva. Ainda, comparando o grupo que foi tratado com 4 mg/kg e o de 8 mg/kg de AM251, o primeiro possui uma diferença significativa da área sob a curva, sendo a da menor dose do antagonista maior que a menor dose,

inferindo-se que **RAC6** não só possui atividade com o receptor CB1, como também expressa de maneira mais efetiva seu potencial nociceptivo relacionado da disponibilidade de receptores disponível.

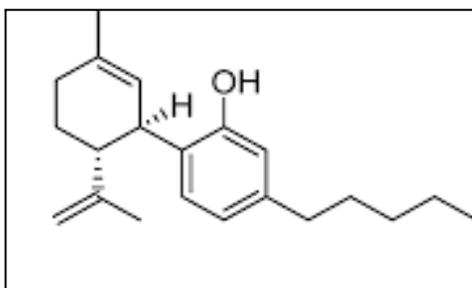
Figura 53 - Gráfico da avaliação dos níveis de alodinia avaliadas pelo ensaio de Von Frey com o análogo RAC6, nas doses de 20 mg/Kg, o antagonista do receptor CB₁, AM251, nas doses de 4 e 8 mg/Kg e o veículo CMC 0,5%. Gráfico a representa o tempo de movimentação da pata mediante o estímulo à dor X tempo de tratamento de 1, 3, 5 e 7 horas. Gráfico b representa a área sob a curva de cada substância analisada nas diferentes concentrações. O valor de significância considerado foi de $p < 0,005$. ** e *** demonstram valores com diferença significativa.



Os dados obtidos nos ensaios com o antagonista AM251 permitem dizer que o **RAC6** está potencialmente agindo no receptor CB1, uma vez que o aumento da presença do antagonista diminui o limiar nociceptivo. Alguns trabalhos comprovam que o **CBD** não atua por esse mecanismo de ação, de forma que, apesar da semelhança estrutural, pode ser que estas duas substâncias atuem por mecanismo de ação distinto no que se refere à atividade antinociceptiva (MLOST *et al.*, 2020). Todavia, alguns pesquisadores relatam a interação com os receptores CBs no uso do **CBD** em associação com o THC (LI *et al.*, 2018). Derivados desidroxi do **CBD** apresentaram uma via de ação diferente da que vem sendo proposta para o fitocanabinoide, conforme descrito por Xiong *et al.* (2012) que demonstraram que a atividade analgésica do derivado desidroxil-CBD (DH-CBD) (**Figura 54**) estaria relacionada à sua afinidade aos receptores de glicina (GlyR), em especial a subunidade da enzima $\alpha 3$, que

desempenha um papel importante na dor crônica. Sabe-se que a dessensibilização de $\alpha 3$ GlyR é percebida em processos nociceptivos e a potencialização desse receptor atua no controle da dor (XIONG *et al.*, 2012).

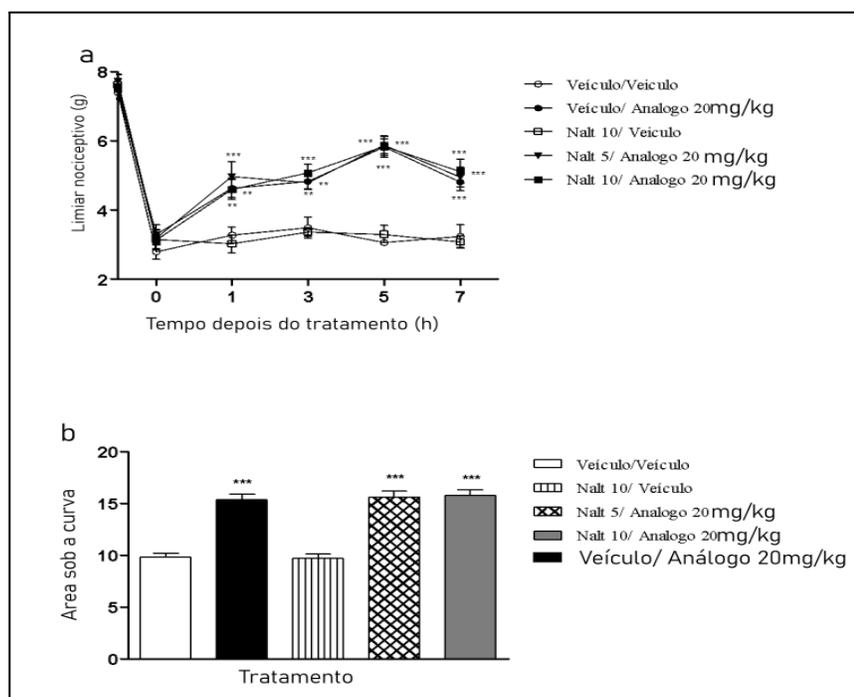
Figura 54 - Estrutura do DH-CBD



FONTE: Cioffi (2018)

Ainda com o intuito de investigar o possível mecanismo de ação do **RAC6**, decidiu-se avaliar se este poderia atuar, também, em receptores opióides. Nesse sentido, realizou-se o ensaio para determinação de alodinia mecânica, mas, dessa vez, utilizando o fármaco naltrexona, um antagonista competitivo dos receptores opióides, administrado em associação com o **RAC6**. A naltrexona foi administrada nas doses de 5 e 10 mg/kg em dois diferentes grupos, então o **RAC6** foi administrado, na dose de 20 mg/kg, nesses mesmos grupos. O experimento foi feito dessa forma para avaliar se o **RAC6** possui alguma afinidade ou atua nos receptores opióides, além do mais, usou-se diferentes doses do antagonista para avaliar se havia uma relação dose-dependente entre substância e a atividade no receptor. Sendo assim, o gráfico na **Figura 55** demonstra a relação entre o limiar nociceptivo e o tempo após administração de cada tratamento, incluindo os resultados do grupo controle em que foi administrado o veículo. Observa-se que os animais do grupo em que foram administrados **RAC6** e o antagonista naltrexona nas doses de 5 e 10 mg/kg se comportaram de maneira semelhante em relação à atividade anti-alodínica, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o **RAC6**. Esses resultados demonstram que a atividade anti-alodínica deste análogo do **CBD** não está relacionada à atuação em receptores opióides. Analisando o gráfico na **Figura 55b** infere-se que não houve diferença significativa entre a área sob a curva do análogo sozinho e dele com as diferentes concentrações da naltrexona.

Figura 55- Gráficos da avaliação dos níveis de alodinia pelo ensaio de Von Frey utilizando RAC6 na dose de 20 mg/Kg, o antagonista do receptor opióide, naltrexona, nas doses de 5 e 10 mg e o veículo CMC 0,5%. Gráfico (a) - relação do tempo de movimentação da pata mediante o estímulo à dor após 1, 3, 5 e 7 horas de tratamento. Gráfico (b) - área sob a curva de cada grupo estudado. O valor de significância considerado foi de $p < 0,005$. ** e *** demonstram valores com diferença significativa.



Por outro lado, no presente trabalho, a ativação ou a afinidade do **RAC6** pelos receptores opioides não foi observada quando se utilizou o antagonista naltrexona. Essa hipótese é justificada pela não alteração da atividade do análogo na presença do antagonista. Comparado com a atividade do **CBD** nos receptores opioides constata-se uma atividade diferente do análogo, mais especificamente nos receptores do tipo Mu nos quais a naltrexona possui atividade antagonista (SUDAKIN, 2016). Estudos sugerem que na concentração de 10 μM , o **CBD** se comporta como agonista alostérico desses receptores (KATHMANN *et al.*, 2006). Entretanto, contrastado com a pesquisa realizada por Abraham *et al.* (2020) que compararam o uso de canabinoides com a morfina no controle da DN, percebeu-se que as substâncias naturais da maconha promovem um alívio prolongado da dor. Além disso, observou-se que o **CBD**, quando comparado à morfina, não possui efeitos psicoativos e não

interage com o organismo do indivíduo na ausência da dor. Levando em conta o potencial viciante de substâncias que manifestam afinidade aos receptores opióides, a ausência de afinidade do análogo pelo receptor é um bom parâmetro, indicando a falta de efeitos psicoativos da substância sintetizada (HERMAN *et al.*, 2022).

Dessarte, o análogo **RAC6** demonstrou habilidade de tratar a alodinia incitada nos animais pelo PAC de forma dose-dependente, com efeitos mais promissores na dosagem de 20 mg/kg. A substância não possui um potencial sedativo ou relaxante muscular, o que poderia levar a um comprometimento da avaliação da alodínia. Por fim, o análogo parece atuar por meio dos receptores CB1, o que o diferencia da ação conhecida do **CBD**. Porém, estudos posteriores são cruciais na determinação completa da via mecanística desta substância no alívio dos sintomas causados pela DN.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A planta *Cannabis sativa* é conhecida por possuir uma variedade de substâncias com potencial terapêutico. Existem inúmeros substâncias responsáveis por essa premissa, e dentre as diversas classes estão os fitocanabinoides. Devido a esta classe de substâncias a planta tem um papel controverso na sociedade. Isso se deve aos fitocanabinoides THC e **CBD**, o primeiro leva a sintomas psicoativos procurados no uso recreativo da Cãnbis e o segundo é considerado um fármaco potente no tratamento de síndromes convulsivas. O **CBD** também apresenta outros usos terapêuticos, sendo alguns atualmente avaliados em estudos clínicos. Apesar do **CBD** já ser utilizado como um fármaco, tanto isolado como em conjunto com o THC, há efeitos adversos do seu uso, bem como limitações associadas a parâmetros farmacocinéticos e farmacoterapêuticos.

A pesquisa e síntese de novos derivados do **CBD** é crucial para tentar contornar esses efeitos indesejáveis, além de aprimorar os efeitos desejáveis. Assim, novos derivados e

análogos já vem sendo avaliados quanto aos seus potenciais antioxidante, analgésico, antitumoral e anti-inflamatório. Embora existam substâncias que estejam sendo avaliadas em estudos de fase clínica, ainda há pesquisas em fases iniciais e muito o que ser investigado. Então, novos derivados e análogos do CBD foram propostos pelo nosso grupo de pesquisa e a investigação de suas potenciais atividades antioxidante, analgésica, antitumoral e anti-inflamatória tornou-se foco principal do presente estudo.

Nos ensaios da avaliação da atividade antioxidante percebe-se que o derivado **MPP_CBD** foi o mais ativo em quase todos os ensaios químicos de redução, demonstrando maior atividade que do **CBD**, e às vezes que a do próprio controle positivo (Trolox). Acredita-se que a inserção do anel piperidina seja responsável pelo aumento da atividade. Outro derivado com atividade similar foi o **CBD_R104**, que evidencia ser mais ativo que o **CBD** em dois dos ensaios. Por fim, para melhor entender e explicar a ação das substâncias é crucial a análise do seu perfil eletrostático, por meio de cálculos moleculares que determinam os grupos que interagem com os radicais livres eximindo o potencial antioxidante observado.

No presente estudo também foi feita a avaliação do perfil citotóxico das substâncias em três linhagens tumorais, das quais somente o **MPP_CBD** obteve a menor concentração de ação em todas as linhagens. Evidencia-se que a alteração estrutural é crucial para esta atividade também, uma vez que foi mais ativa que o **CBD**, mas que as duas ações ocorrem por vias semelhantes. Determinantemente, estudos para determinar a via de atuação, concentrações e do mecanismo *in vivo* são importantes para compreender melhor a ação de tal composto.

Infelizmente, **MPP_CBD** não pôde ter seu potencial anti-inflamatório testado, por falta de quantidades suficientes para serem utilizadas nos outros estudos. Sendo assim, a determinação da atividade anti-inflamatória foi feita com os demais análogos e derivados sintetizados utilizando os experimentos de dosagem de nitrito e de citocinas. Todas as substâncias testadas atuaram inibindo a produção de NO_2^- , mostrando um potencial anti-inflamatório. Sabe-se que o **CBD** atua como como supressor ou estimulador da expressão de citocinas. Todavia, algumas das substâncias atuaram estimulando a produção das citocinas TNF α e IL-6, em especial a **DeT_CBD**, que se mostrou capaz de estimular a produção de ambas. Cabe ressaltar que esse padrão não foi apresentado por nenhuma outra substância avaliada. Investigações sobre a relação entre estrutura e atividade são cruciais para inferir sobre o comportamento não só da substância **DeT_CBD**, mas das outras também. Além disso,

é necessário repetir o ensaio que foi feito em simplicata e os resultados são somente uma inferência do possível comportamento.

Por fim, atividade antinociceptiva foi testada com o **RAC6**, que foi escolhido por ser ativo nos outros ensaios e ser de mais fácil obtenção. Os estudos demonstram que tal substância tem potencial para ser utilizada no tratamento da dor neuropática atuando por meio da interação com o receptor CB1 e não pelos receptores opióides. Tal constatação é surpreendente visto que o **CBD** atua por uma via de atuação diferente desta. É evidente que mais pesquisas são necessárias para determinar a ação dessa substância em outros receptores.

Diante do que foi proposto no presente trabalho, alguns dos derivados e análogos do **CBD** demonstraram sua atividade em mais de um ensaio biológico. Infelizmente, não se testou todas as substâncias em todos os ensaios. Como resultado, vê-se que algumas foram mais ativas que o **CBD** e o devido controle positivo usado nos experimentos, comprovando a teoria que essas mudanças estruturais resultam na obtenção de moléculas que possam apresentar vantagens em relação ao uso do fitocanabinoide. Algumas substâncias, como **RAC6** e **MPP_CBD**, aparentam possuir um amplo espectro de ação. Desta maneira, evidencia-se a necessidade de estudos posteriores para avaliar seu mecanismo de ação, perfil farmacocinético, toxicidade, dentre outros parâmetros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A.D., *et al.* Orally consumed cannabinoids provide long-lasting relief of allodynia in a mouse model of chronic neuropathic pain. **Neuropsychopharmacology**. v. 7, n. 45, p. 1105-1114, Dez., 2020. doi: 10.1038/s41386-019-0585-3.

ADAMS, R., HUNT, M., and CLARK, J. H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. **Journal of American Chemistry Society**. v. 62, n. 1, p. 196–200, 1940.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. *et al.* Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. **Journal of natural products**. v. 79, n. 2, p. 324–33, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>.

ALEXIDIS, A. N., *et al.* Novel 1,4 Substituted Piperidine Derivatives. Synthesis and Correlation of Antioxidant Activity with Structure and Lipophilicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 47, n. 2, p. 131–137, 1995. doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb05765.x. Acesso em:

AMIN, M. R., & ALI, D. W. Pharmacology of Medical Cannabis. **Advances in experimental medicine and biology**. v. 1162, p. 151–165, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8.

ANDERSON, L.C. Leaf Variation among Cannabis Species from a Controlled Garden. **Botanical Museum leaflets**, Harvard University, 1980.

ANDRE, C.M., HAUSMAN, J-F., GUERREIRO, G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. **Frontiers in Plant Science**. v. 7, n. 19, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.00019.

APPENDINO G., *et al.* Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. **Journal of natural products**. v. 71, n. 8, p. 1427–1430, 2008. <https://doi.org/10.1021/np8002673>.

ARTS, M. J. *et al.* Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 42, n. 1, p. 45-49, Jan, 2004. doi: 10.1016/j.fct.2003.08.004. PMID: 14630129.

ATALAY, S., JAROCKA-KARPOWICZ, I., SKRZYDLEWKA, E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. **Antioxidants**. Basel, Switzerland, v. 9, n. 1, p. 21, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>.

AYAKUMAR, T. *et al.* Targeting MAPK/NF- κ B Pathways in Anti-Inflammatory Potential of Rutaecarpine: impact on src/fak-mediated macrophage migration. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 1, p. 92, 22 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010092>.

BADOWSKI, M. E. & PEREZ, S. E. Clinical utility of dronabinol in the treatment of weight loss associated with HIV and AIDS. **HIV/AIDS**. Auckland, N.Z., v. 8, n. 37, p. 4, 2016. <https://doi.org/10.2147/HIV.S81420>.

BAEK, S.-H.; SREBNIK, M.; MECHOULAM, R.. Boron Trifluoride Etherate in Alumina - A Modified Lewis Acid Reagent. An Improved Synthesis of Cannabidiol. **Tetrahedron Letters**, Great Britain, v. 26, n. 8, p. 1083-1086, 1985.

BAUTISTA, J. L., SHU, Y., TIAN, L. Flavonoids in *Cannabis sativa*: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology **American Chemistry Society Omega**. v. 6, n. 8, p. 5119-5123, 2021. DOI: 10.1021/acsomega.1c00318.

BEN-SHABAT, S. *et al.* New Cannabidiol Derivatives: Synthesis, Binding to Cannabinoid Receptor, and Evaluation of Their Antiinflammatory Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 49, n. 3, p. 1113-1117, 2006. DOI: 10.1021/jm050709m.

BÉRNARD, G. *et al.* Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. **Nature Neuroscience**. v.15, p. 558–564, 2012. <https://doi.org/10.1038/nn.3053>.

BHULLAR, K. *et al.* Curcumin and Its Carbocyclic Analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. **Molecules**. [S.L.], v. 18, n. 5, p. 5389-5404, 10 maio 2013. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18055389>.

BORGES, R. S. *et al.* Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. **Molecules**. v. 14, n. 18(10), p. 12663-74, Out., 2013. doi: 10.3390/molecules181012663. PMID: 24129275; PMCID: PMC6269679.

BORGES, R. D. & SILVA A. B. Cannabidiol as an Antioxidant. In: PREEDY, V. R. Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment. 1. ed. [S.L.]. 2017. 10.1016/B978-0-12-800756-3.00093-4.

BRENNEISEN, R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents. In: ElSohly, M.A. **Marijuana and the cannabinoids**. Forensic Science And Medicine. Humana Press, v.1, n.2, p.17-50, 2007.

BREUER, A. *et al.* Fluorinated Cannabidiol Derivatives: Enhancement of Activity in Mice Models Predictive of Anxiolytic, Antidepressant and Antipsychotic Effects. **PLoS One**. v. 11, n. 7, p. 1587, 14 jul. 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0158779. Erratum in: PLoS One. 2016;11(8):e0162087. PMID: 27416026; PMCID: PMC4945002.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, [S.L.] v. 23, p. 1377–1385, 2015. doi: 10.1016/j.bmc.2015.01.059

CAMPOS, A. C., *et al.* Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. **Pharmacology Research**, [S.L.], v. 112, p. 119-127, out. 2016. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.033. Epub 2016 Feb 1. PMID: 26845349.

CANADA, Senate of. **Cannabis Act**. Chapter 16, 2018. Disponível em: <https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/c-24.5/>

CARLINI, E. A. *et al.* Cannabidiol and cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. **Journal of Pharmacy & Pharmacology**, v. 25, n. 8, p. 664-5, 1973.

CARLINI, E. A., MECHOULAM, R. e LANDER, N. Anticonvulsant activity of four oxygenated cannabidiol derivatives. **Research Communication in Chemical Pathology Pharmacology**, [S.L.], v. 12, p. 1–15, 1975.

CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **Jornal brasileiro de psiquiatria**. Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/jbpsi/v55n4/a08v55n4.pdf>

CARLINI, E. A. **Pesquisas com a maconha no Brasil**. Brazilian Journal of Psychiatry [online]. v. 32, suppl 1, p. 53-54, 24 Maio 2010. <<https://doi.org/10.1590/S1516-44462010000500002>>. ISSN 1809-452X.

CARMICHAEL, J. *et al.* Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment. **American Association for Cancer Research**, v. 47, p. 936–942, 1987.

CAROZZI, V.A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 90- 107, 2015.

CASTRO, M. CANNABIS E DESENVOLVIMENTO: mudanças sociais, políticas e econômicas no mercado da maconha. **Revista Ciências Humanas**, [S.L.], v. 13, n. 3, 2020. <https://doi.org/10.32813/2179-1120.2020.v13.n3.a667>

CHEN, Y., *et al.* Minoxidil is a potential neuroprotective drug for paclitaxel induced peripheral neuropathy. **Scientific Reports**, v.7, p.1-13, 2017.

COHEN, P. A., AVULA, B., WANG, Y., KATRAGUNTA, K., KLAN, I. Quantity of Melatonin and CBD in Melatonin Gummies Sold in the US. **JAMA**. v. 329, n.16, p.1401–1402, 2023. doi:10.1001/jama.2023.2296

COLLOCA, L. *et al.* Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 7002, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>

COSTA, B. *et al.* The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. [S.L.], v. 556, p. 75-83, 2007.

CUNHA, J. M., *et al.* Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**. [S.L.], v. 21, n. 3, p. 175-85, 1980.

D'ALOIA *et al.*, Cannabidiol Antiproliferative Effect in Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Is Modulated by Its Physical State and by IGF-1. **International Journal of Molecular Science**. [S.L.], v. 23, n. 13, p. 7145, jun. 2022. doi: 10.3390/ijms23137145. PMID: 35806150; PMCID: PMC9266539.

DE FILIPPIS, D., *et al.* Cannabidiol Reduces Intestinal Inflammation through the Control of Neuroimmune Axis. **PLoS ONE**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. e28159, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028159>

DE PETROCELLIS, *et al.* Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal of Pharmacology**. [S.L.], v. 163, p. 1479–1494, 2011. doi: 10.1111/bph.2011.163.issue-7

DEGENHARDT, F., STEHLE, F. e KAYSER, O. The Biosynthesis of Cannabinoids. **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**. [S.L.], p. 13–23, 2017. doi:10.1016/b978-0-12-800756-3.00002-8

DI MARZO, V. *et al.* Cannabimimetic fatty acid derivatives in cancer and inflammation. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [S.L.], v. 61, n. 1-2, p. 43–61, 2000. doi:10.1016/s0090-6980(00)00054-x

DVILANSKY, A., *et al.* Effects of ethanol, CBD and delta 'THC on proliferation of K-562 cells. **International Journal of Tissue Reaction**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 409-12, 1984. PMID: 6097561.

ELSOHLY, M. A., *et al.* Phytochemistry of Cannabis sativa L. **Phytocannabinoids**, [S.L.], p. 1–36, 2017. doi:10.1007/978-3-319-45541-9_1

ESPOSITO, G. *et al.* Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. **Neuroscience letters**, [S.L.], v. 399, v. 1-2, p. 91–95, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.047>

FAGUNDO, *et al.* Modulation of the Endocannabinoids N-Arachidonylethanolamine (AEA) and 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) on Executive Functions in Humans. **PloS one**, [S.L.] v. 8, n. 6, p. e66387, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066387>

FILIPUIC, L. E. *et al.* Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors? **Pharmaceutics**. [S.L.], v. 1, n. 13(11), p. 1823, nov. 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13111823. PMID: 34834237; PMCID: PMC8625816.

FROHNING, C. D.; KOHLPAINTNER, C.N W; BOHNEN, H-W.. Hydroformylation (Oxo Synthesis, Roelen Reaction). In: CORNILS, Boy; HERRMANN, Wolfgang A. (ed.). *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic: volume 1:applications*. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. Cap. 2. p. 31-103.

FISAR, Z., SINGH, N., e HROUDOVÁ, J. Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 231, n.1, p. 62–71, 2014. doi:10.1016/j.toxlet.2014.09.002

FOUAD, A. A., *et al.* Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity. **Environmental Toxicology Pharmacology**. [S.L.], v. 36, p. 347–357, 2013. [CrossRef]

FREIMUTH, N., RAMER, R., HINZ, B. Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 332, n. 2, p. 336-344, 2010.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behaviour**, v. 47, p. 963-991, 1990.

HANUS, L. *et al.* HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, p. 14228–14233, 1999. doi: 10.1073/pnas.96.25.14228

HANUŠ, L. O. et al. Enantiomeric cannabidiol derivatives: synthesis and binding to cannabinoid receptors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 1116, 2005. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b416943c>.

HANUS, L. *et al.* Phytocannabinoids: a unified critical inventory. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 33, n. 12, p. 1357-1392, 2016. Royal Society of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1039/c6np00074f>.

HENSHAW, F. R., *et al.* The Effects of Cannabinoids on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Systematic Review of In Vivo Studies. **Cannabis and Cannabinoid Research**. [S.L.], v. 6, n. 3, p. 177-195, jun. 2021. doi: 10.1089/can.2020.0105. PMID: 33998900; PMCID: PMC8266561.

HERMA, T. F., CASCELLA, M., MUZIO, M. R. Mu Receptors. In StatPearls. **StatPearls Publishing**, 2022.

HILL, A. J., *et al.* Cannabidivarin is anticonvulsant in mouse and rat. **British Journal of Pharmacology**. [S.L.], v. 167, p. 1629–1642, 2012. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02207.x. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

IFFLAND, K., GROTENHERMEN, F. An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies. **Cannabis and cannabinoid research**, [S.L.], v.2, p.139-154, 2017.

JACOBSSON, S. O., *et al.* Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 1807-13, dez. 2000. doi: 10.1016/s0006-2952(00)00492-5. PMID: 11108795.

JAYAKUMAR, T. *et al.* Targeting MAPK/NF- κ B Pathways in Anti-Inflammatory Potential of Rutaecarpine: Impact on Src/FAK-Mediated Macrophage Migration. **International Journal of**

Molecular Science, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 92, 22 dez. 2021. doi: 10.3390/ijms23010092. PMID: 35008520; PMCID: PMC8745017.

JIN, D., *et al.* Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. **Science Report** **10**, [S.L.], p. 3309, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6>

JUKNAT, A., *et al.* Anti-inflammatory effects of the cannabidiol derivative dimethylheptyl-cannabidiol – studies in BV-2 microglia and encephalitogenic T cells. **The Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S.L.], v. 27, p. 289–296, 2016. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0071

KALENDEROGLU, N., *et al.* alenderoglou N, Macpherson T, Wright KL. Cannabidiol Reduces Leukemic Cell Size - But Is It Important? **Frontier in Pharmacology**, [S.L.], v. 24, n. 8, p. 144, mar. 2017. doi: 10.3389/fphar.2017.00144. PMID: 28392768; PMCID: PMC5364234.

KATHMANN, M. *et al.* Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [S.L.], v. 372, n. 5, p. 354–361, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0033-x>

KAUR, S. *et al.* A Panoramic Review of IL-6: Structure, Pathophysiological Roles and Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], p. 115327, 2020. doi:10.1016/j.bmc.2020.115327

KIM, J. H., *et al.* Impact of state-level cannabis legalization on poly use of alcohol and cannabis in the United States, 2004-2017. p. 108364, 2020. doi:10.1016/j.drugalcdep.2020.108364

KIOSIOLEK, J. Cannabidiol Alters Chemotherapy Drug Effectiveness in A Cell Culture Model. **Graduate Presentations**, 17, [S.L.], 2021. https://digscholarship.unco.edu/grad_pres_2021/17

KOGAN, N. Cannabinoids and Cancer. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 941–952, 2005. doi:10.2174/138955705774329555

KOHLER, F. E. *Medizinal-Pflanzen*. **Gera-Untermhaus**, Berlin, 1887.

KOZELA, E., *et al.* HU-446 and HU-465, derivatives of the non-psychoactive cannabinoid cannabidiol, decrease the activation of encephalitogenic T cells. **Chemical Biology & Drug Design**. [S.L.], v. 87, p. 143–153, 2015. doi: 10.1111/cbdd.12637

LEE, K. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. **Medical Biological Science and Engineering**. [S.L.], v. 2, p. 1-5, 2019. 10.30579/mbse.2019.2.1.1.

LEWIS, C. B., ADAMS, N. **Phenobarbital**. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL), jan. 2022.

LI, H. *et al.* The non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol (CBD) attenuates pro-inflammatory mediators, T cell infiltration, and thermal sensitivity following spinal cord injury in mice. **Cellular Immunology**, [S.L.], v. 329, p. 1-9, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.016>.

LI, P., *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse RAW264.7 Macrophages. **Frontiers in immunology**, [S.L.], v. 12, p. 700009, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.700009>

MACARRONE, M. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S.L.], v. 10, p. 166, 2017. doi: 10.3389/fnmol.2017.00166

MAIONE, S. *et al.* Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. **British journal of pharmacology**, [S.L.], v. 162, n. 3, p. 584–596, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01063.x>

MANJUSHA, R. K. *et al.* Antioxidant potential of piperidine containing compounds - A short review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**.v. 11, n. 66, 2018. [10.22159/ajpcr.2018.v11i8.26536](https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i8.26536). z

MARQUES, G. V. L., *et al.* Synthesis of cannabidiol-based compounds as ACE2 inhibitors with potential application in the treatment of COVID-19. **European journal of medicinal chemistry**. v. 260, p. 115760, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115760>

MASSI, P. Cannabidiol as potential anticancer drug. **British journal of clinical pharmacology**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 303–312, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04298.x>

MCKALLIP, R. J. Cannabidiol-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: A Novel Role of Cannabidiol in the Regulation of p22phox and Nox4 Expression. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 897–908, 2006. doi:10.1124/mol.106.023937

MECHOULAM, E. & HANUS, L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. **Chemistry and physics of lipids**, [S.L.], v. 121, n. 1-2, p. 35–43, 2002a. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00144-5](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00144-5)

MECHOULAM, R., PARKER, L. A., GALLILY, R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. **Journal of Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 42, n. S1, p. 11S-19S, 2002b. doi: 10.1002/j.1552-4604.2002.tb05998.x. PMID: 12412831.

MECHOULAM, R., *et al.* Cannabidiol – Recent Advances. **Chemistry & biodiversity**, [S.L.], v. 4, p. 1678-92, 2007. [10.1002/cbdv.200790147](https://doi.org/10.1002/cbdv.200790147).

MECHOULAM, R. & PARKER, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. **Annual Review of Psychology**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 21-47, 2013

MECHOULAM, P. *et al.* Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. **Natural Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 757-64, nov. 2014. doi: 10.1038/nrn3811. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25315390.

MLOST, J., BRYNK M., STAROWICZ, K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. **International Journal of Molecular Science**, [S.L.], v. 21, n. 22, p. 8870, 23 nov. 2020. doi: 10.3390/ijms21228870. PMID: 33238607; PMCID: PMC7700528.

MORALES, P., HURST, D. P., & REGGIO, P. H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. **Progress in the chemistry of organic natural products**, [S.L.], v. 103, p. 103–131, 2017a. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_4

MORALES, P. *et al.* An Overview on Medicinal Chemistry of Synthetic and Natural Derivatives of Cannabidiol. **Frontiers In Pharmacology** [S.L.] v. 8, p. 1-18, 2017b.

OLIVEIRA, Nelson. Cannabis medicinal: realidade à espera da regulamentação. Agência Senado, 2021. Disponível em <<https://www12.senado.leg.br/noticias/infomaterias/2021/07/cannabis-medicinal-realidade-a-espera-de-regulamentacao>>. Acesso em 27 dezembro 2023

PAN, H., *et al.* Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 328, n. 3, p. 708–714, 2009. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.147181>

PETRONZI, C. *et al.* Cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione-based antiproliferative agents?: design, synthesis, and cytotoxic evaluation. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 32, p. 24, 2013. doi: 10.1186/1756-9966-32-24

PICKENS, J. T. Sedative activity of cannabis in relation to its delta'-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol content. **British Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 72, n. 4, p. 49-56, abr. 1981. doi: 10.1111/j.1476-5381.1981.tb09145.x. PMID: 6269680; PMCID: PMC2071638.

PISANTI, S., *et al.* Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 175, p. 133-150, jul. 2017. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.041. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28232276.

PUNCHARD, N.A., WHEAN, C. J., ADCOCK, I. **The Journal of Inflammation**. Journal of Inflammation (London). 1(1):1, 2004 Sep 27. doi: 10.1186/1476-9255-1-1. PMID: 15813979; PMCID: PMC1074343.

RAJA, SN *et al.*, The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**. v.161, p.1976-82, 2020.

RE, P., *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, [S.L.], v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

RIBEIRO, A., *et al.* Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 35–41, 2015. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.976794>

RISS, T. L., *et al.* Cell Viability Assays. In: MARKOSSIAN, S., *et al.*, editors. **Assay Guidance Manual**. Bethesda/MD, 2004.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F1/2013> May 1 [Updated 2016 Jul 1].

RONG, C., *et al.* Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. **Pharmacological Research**, [S.L], v. 121, p. 213–218, 2017. doi:10.1016/j.phrs.2017.05.005

ROSSI, Marina. O cientista condecorado que acabou na delegacia por causa de um líder rastafári. **El País**, 2018. Disponível em <https://brasil.elpais.com/brasil/2018/02/27/politica/1519749794_845442.html>. Acesso em 25 dezembro 2023.

RUFINO, M. S. M, *et al.* Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, Fortaleza/CE, v. 125, dez. 2006.

RUFINO, M. S. M, *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, Fortaleza/CE, v. 127, jul. 2007a.

RUFINO, M. S. M, *et al.* Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS+. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, Fortaleza/CE, v. 127, jul. 2007b.

QUEIROLO, R. *et al.* Why Uruguay legalized marijuana? The open window of public insecurity. **Addiction**, 2018. doi:10.1111/add.14523

SAQUIB, U, *et al.* Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, [S.L], v. 9, n. 25, p. 17937-17950, 3 abr. 2018. doi: 10.18632/oncotarget.24788. PMID: 29707159; PMCID: PMC5915167.

SCHERMA, M., *et al.* Brain activity of anandamide: a rewarding bliss? **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 40, p. 309–323, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0075-x>

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Natural Neuroscience**, [S.L.], v. 1039, n. 46, p. 1062-1067, 2002.

SCHULTES, R. E., *et al.* Cannabis: an example of taxonomic neglect. **Cannabis And Culture**, [S.L.], p. 21-38, 31 dez. 1975. DE GRUYTER MOUTON. <http://dx.doi.org/10.1515/9783110812060.21>.

SCHULTZE, N., *et al.* Mitochondrial functions of THP-1 monocytes following the exposure to selected natural compounds. **Toxicology**, [S.L.], v. 377, p. 57–63, 2017. doi:10.1016/j.tox.2016.12.006

SERMET, S. Cannabidiol selectively modulates interleukin (IL)-1 β and IL-6 production in toll-like receptor activated human peripheral blood monocytes. **Toxicology**, [S.L.], v. 464, p. 153016, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153016>

SHIVASTAVA, A. *et al.* Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. **Molecular cancer therapeutics**, [S.L.], v. 10, p. 1161-72, 2011. 10.1158/1535-7163.MCT-10-1100.

SILVA, M. J. S. d. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 4.ed. rev. atual. Rio de Janeiro: **Inca**, p. 111, 2018. . ISBN 978-85-7318-351-1 (versão eletrônica)

SILVA, R. L., *et al.* DMH-cannabidiol, a cannabidiol analog with reduced cytotoxicity, inhibits TNF production by targeting NF-kB activity by activating A2A receptor and inhibiting p38. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S.L.], 2019. doi:10.1016/j.taap.2019.02.011

SINGH, N., HROUDOVÁ, J. & FISAR, Z. Cannabinoid-Induced Changes in the Activity of Electron Transport Chain Complexes of Brain Mitochondria. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 56, p. 926–931, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0545-2>

SISIGNANO, M.; BARON, R.; SCHOLICH, K.; GEISLINGER, G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, [S.L.] v. 10, p. 694-707, 2014.

SMAL, E., & CRONQUIST, A. A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. **Taxon**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 405–435, 1976. <https://doi.org/10.2307/1220524>

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.. Álcoois a partir de compostos carbonílicos: oxidação-redução e compostos organometálicos. In: SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.. *Química Orgânica 1*. 10. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2012. Cap. 12. p. 555-560.

SOLINAS, M. *et al.* Cannabidiol and Cancer — An Overview of the Preclinical Data. **InTech**, [S.L.], 2015. DOI: 10.5772/59193

SUDAKIN, D. Naltrexone: Not Just for Opioids Anymore. **Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 71–75, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13181-015-0512-x>

SULTAN, A. S., *et al.* Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. **The Breast**, [S.L.], v.41, p. 34–41, 2018. doi:10.1016/j.breast.2018.06.009

SUNDA, F., & AROWOLO, A. A molecular basis for the anti-inflammatory and anti-fibrosis properties of cannabidiol. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [SL.] v. 34, n. 11, p. 14083–14092, 2020. <https://doi.org/10.1096/fj.202000975R>

TAKEDA, S., *et al.* Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. **Drug Metabolism & Disposition**, [S.L.], v. 36, p. 1917–1921, 2008. doi: 10.1124/dmd.108.020909

TAKEDA, S., *et al.* Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 214, p. 314–319, 2012. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.029

TAKEDA, S., *et al.* Cannabidiolic acid-mediated selective down-regulation of c-fos in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. **Journal of Natural Medicines**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 286–291, 2016. doi:10.1007/s11418-016-1030-0

TANAKA, T., NARAZAKI, M., KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. a016295, set. 2014. doi: 10.1101/cshperspect.a016295. PMID: 25190079; PMCID: PMC4176007.

THOMAS, B. F., & ELSOHLY, M. A. The Botany of Cannabis sativa L. **The Analytical Chemistry of Cannabis**, [S.L.], p. 1–26, 2016. doi:10.1016/b978-0-12-804646-3.00001-1

TORRES, S., *et al.* A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 90-103, 2011.

TOUW M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. **Journal of psychoactive drugs**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 23–34, 1981. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471447>

TSAI, C. F., *et al.* Regulatory Effects of Quercetin on M1/M2 Macrophage Polarization and Oxidative/Antioxidative Balance. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 67, 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14010067>

VÁRADI, L. *et al.* Evaluation of novel Griess-reagent candidates for nitrite sensing in aqueous media identified via molecular fingerprint searching. **Royal Society Chemistry Advances**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 3994-4000, 2019. <http://dx.doi.org/10.1039/c8ra07656a>

VAZ, Z.R., *et al.* Antinociceptive action of 2-(4- bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304 - 312, 1996.

VERTY, A. N., *et al.* The cannabinoid receptor agonist THC attenuates weight loss in a rodent model of activity-based anorexia. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 1349–1358, 2011. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.19>

VUOLO, F., *et al.* Evaluation of Serum Cytokines Levels and the Role of Cannabidiol Treatment in Animal Model of Asthma. **Mediators of Inflammation**, [S.L.], v. 2015, p. 1-5, 25 maio 2015. doi: 10.1155/2015/538670. Epub 2015 May 25. PMID: 26101464; PMCID: PMC4458548.

WANG, L. *et al.* Medical cannabis or cannabinoids for chronic non-cancer and cancer related pain: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. **British medical journal**. [S.L.], p. 1034, 8 set. 2021. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.n1034>.

WARD, S. J., *et al.* Cannabidiol Prevents the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57Bl6 Mice. **Anesthesia & Analgesia**. [S.L.], v. 113, n. 4, p. 947-950, out. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e3182283486>.

WARD, S. J. *et al.* Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT(1A) receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. **British**

Journal of Pharmacology. v. 171, n. 3, p. 636-645, 2014. doi: 10.1111/bph.12439. PMID: 24117398; PMCID: PMC3969077.

WATANABE, K., *et al.* Conversion of cannabidiol to Δ^9 -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. **Forensic Toxicology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 16–21, 2007. doi:10.1007/s11419-007-0021-y

WHITE, C. M. A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol's (CBD) Therapeutic Actions and Potential. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, n. 7, p. 923-934, 7 fev. 2019. doi:10.1002/jcph.1387

WHO Expert Committee on Drug Dependence (2017). Cannabidiol (CBD) pre-review report. Agenda item 5.2. Geneva: World Health Organization. **Thirty-ninth meeting**, Geneva, p. 6-10, November 2017.

WU, J. Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow. **Acta Pharmacologica Sinica**. [S.L.], v. 40, n. 3, p. 297-299, 22 jan. 2019. doi:10.1038/s41401-019-0210-3

XIONG, W., *et al.* Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. **Journal of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 209 n. 6, p. 1121-34, 4 jun. 2012. doi: 10.1084/jem.20120242. Epub 2012 May 14. PMID: 22585736; PMCID: PMC3371734.

ZILLIOX, L. A. Neuropathic Pain. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 512–532, 2017. doi:10.1212/con.0000000000000462

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109 - 110, 1983.

ZUARDI A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Revista brasileira de psiquiatria**, São Paulo, Brazil, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2006. <https://doi.org/10.1590/s1516-44462006000200015>

ZUARDI, A. Cannabidiol: From an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Revista brasileira de psiquiatria**, São Paulo, Brazi, v. 30, p. 271-80, 2008. [10.1590/S1516-44462008000300015](https://doi.org/10.1590/S1516-44462008000300015).