

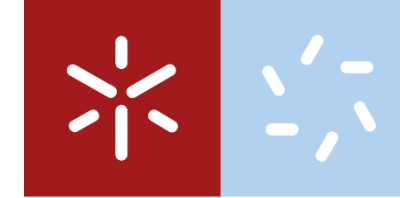
Universidade do Minho
Escola de Ciências



Análise fitoquímica e atividade biológica de *Cannabis ruderalis* em modelos *in vitro* e baseados em células

Tamara Sofia Lima dos
Santos Pinto Pereira

UMinho | 2019

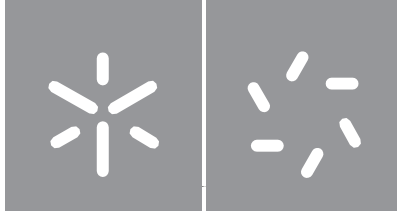


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Tamara Sofia Lima dos Santos Pinto Pereira

Análise fitoquímica e atividade biológica de *Cannabis ruderalis* em modelos *in vitro* e baseados em células

Dezembro de 2019



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Tamara Sofia Lima dos Santos Pinto Pereira

Análise fitoquímica e atividade biológica de *Cannabis ruderalis* em modelos *in vitro* e baseados em células

Dissertação de Mestrado
Bioquímica Aplicada
Especialização em Biotecnologia

Trabalho realizado sob a orientação de:
Professor Doutor Rui Pedro Soares Oliveira

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Realizar esta dissertação de Mestrado foi uma experiência verdadeiramente desafiadora e transformadora para mim, no entanto a conclusão da mesma não teria sido possível sem o apoio e orientação de várias pessoas.

Gostaria de deixar o meu primeiro obrigada ao meu supervisor, Dr. Rui Oliveira, por ter aceite este projeto e por todo o apoio e incentivo ao longo desta jornada. A sua orientação e o seu *feedback* constante, foram imprescindíveis para a realização da presente investigação.

Um obrigada também ao Dr. João Carlos Marcos, diretor do curso de Mestrado de Bioquímica Aplicada, pela persistência e dedicação na resolução dos vários obstáculos deparados durante este percurso e pela disponibilidade de recursos, que foram fundamentais para o adiantamento de vários dos passos dos protocolos executados.

Ao Dr. Pier Parpot, agradeço imenso pelo seu tempo dedicado para me elucidar melhor sobre a técnica de análise química e pelo auxílio na análise dos extratos vegetais por LC-MS/MS.

Sou especialmente grata à minha colega de laboratório, Daniela Oliveira, pelos seus conselhos inestimáveis e *feedback* sobre o meu trabalho, pela prestável disponibilidade em me ajudar a realizar qualquer ensaio e/ou resolver qualquer dúvida. Pela paciência, compreensão, momentos de amizade e conhecimento transmitido, muito obrigada.

Agradeço também, a toda a equipa técnica do Departamento de Biologia, por toda a assistência prestada, especialmente ao Sr. Luís Correia, pelo seu trabalho infundável e pela sua simpatia que é sempre bem-vinda.

Por fim, deixo o meu último obrigada à minha família e amigos, por todos os carinhos, apoio, incentivo e oportunidades. Grata, especialmente, à minha família por todo o apoio económico, pelo encorajamento e toda a força que sempre me prestaram ao longo de toda a vida académica.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Análise fitoquímica e atividade biológica de *Cannabis ruderalis* em modelos *in vitro* e baseados em células

Resumo

O cânhamo é um recurso natural altamente versátil, capaz de dar origem às demais matérias primas que incluem desde fibras resistentes a sementes altamente nutritivas e uma ampla gama de fitoquímicos com inúmeras propriedades farmacológicas associadas. *Cannabis ruderalis* surge então como espécie representativa de cânhamo, recentemente descrita, que apresenta algumas características peculiares que a diferem marcadamente das outras variedades de cânhamo e que aumentam o interesse na exploração e caracterização do seu perfil fitoquímico.

Assim, a presente investigação propõe-se a explorar a fração de metabolitos secundários solúveis em etanol e água e a atividade antioxidante *in vitro* e em modelos de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, desta subespécie pouco relatada em literatura.

Os resultados deste estudo sugerem que todos os extratos de *C. ruderalis* apresentam atividade antioxidante confirmada *in vitro*, pelos ensaios de DPPH e de sequestro de NO, sendo que o extrato etanólico a 50% (EE50%) demonstrou ser o extrato que apresenta maior atividade antioxidante e maior teor de fenólicos, o que levou à sua seleção para os ensaios *in vivo*, com *Saccharomyces cerevisiae*. Esta capacidade não pode ser atribuída a compostos específicos, pois a aplicação das técnicas de ESI-MS e ESI-MS/MS não foi suficiente para a identificação de todos os componentes das amostras. *In vivo*, através do ensaio *Spot Assay*, demonstrou-se que EE50% não é tóxico às concentrações de 7,5; 75 e 1000 µg/mL, no entanto a incubação das células de *S. cerevisiae* com EE50% + H₂O₂ resultou numa diminuição acentuada da viabilidade, o que sugere um efeito potenciador do H₂O₂ pelo extrato em estudo. Por último, através de ensaios com estirpes de *S. cerevisiae* mutadas em *yap1* e *gpx1/2/3*, verificou-se que EE50% é um possível candidato para ativar a resposta ao stress oxidativo, promovendo a expressão de enzimas envolvidas na defesa antioxidante.

Em jeito de conclusão, EE50% demonstrou citotoxicidade quando incubado com H₂O₂, sendo sugerível que outras interações semelhantes possam decorrer com outros compostos em células humanas, sendo, portanto, emergente uma padronização e consistência dos constituintes químicos da planta, no sentido de apoiar a formulação de aplicações farmacológicas adequadas, de forma a diminuir os riscos associados ao consumo de produtos derivados de linhagens de *Cannabis* medicinal.

Palavras chave: *Cannabis ruderalis*, cânhamo, fitoquímica, citotoxicidade, antioxidante.

Phytochemical analysis and biological activity of *Cannabis ruderalis* on *in vitro* cell-free and cell-based models

Abstract

Hemp is a highly versatile natural resource that can rise to other raw materials that include resistant fibers, highly nutritious seeds and a variety of phytochemicals with numerous associated pharmacological properties. *Cannabis ruderalis* emerges as a hemp representative species, recently described, that shows some peculiar characteristics that distinguish it from other varieties of cannabis, which increase the interest in its further phytochemical exploration and characterization. Thus, the current investigation proposes to explore the fraction of secondary ethanol and water soluble, as well as the antioxidant activity of this subspecies, by using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a biological model.

The results of this study suggested that all extracts of *C. ruderalis* show antioxidant activity, confirmed *in vitro*, through by the DPPH and NO scavenging assays. The 50% ethanolic extract (EE50%) revealed to be the one with the highest antioxidant activity and with the highest phenolic content, which lead to its selection for the *in vivo* assays, with *Saccharomyces cerevisiae*. This capacity can't be attributed to specific compounds, once the application of the ESI-MS and ESI-MS/MS techniques wasn't enough for the identification of all the components in the samples. Spot assay (*in vivo* experiments) revealed that EE50% isn't toxic at 7,5; 75 and 1000 µg/mL, however, the incubation of the *S. cerevisiae* cells with EE50% + H₂O₂ resulted in a sharp decrease in viability, which suggests a potentialization effect of H₂O₂ by the extract analysed. Lastly, through spot assay with *Saccharomyces cerevisiae* strains mutated at yap1 and gpx1/2/3 genes, was verified that EE50% is a possible candidate to activate the response to the oxidative stress, promoting the expression of enzymes usually involved in antioxidant defence.

In conclusion, EE50% demonstrates cytotoxicity when incubated with H₂O₂, suggesting that other similar interactions may occur with other compounds in human cells, being emergent a standardization and consistency of plant chemical constituents to support the formulation of appropriate pharmacological applications in order to mitigate the risks associated with the use of products derived from medicinal cannabis strains.

Keywords: *Cannabis ruderalis*, hemp, phytochemistry, cytotoxicity, antioxidant.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Cânhamo: Enquadramento Histórico	1
1.2. <i>Cannabis ruderalis</i> : Caracterização.....	3
1.2.1. A Origem: <i>ruderalis</i> , a “Erva Daninha”	3
1.2.2. Botânica, Anatomia e Morfologia de <i>C. ruderalis</i>	3
1.3. Constituintes do Cânhamo: Fitoquímica da Planta.....	5
1.3.1. Fitocanabinóides e Sistema Endocanabinóide	6
1.3.2 Terpenos.....	11
1.3.3 Compostos Fenólicos	14
1.6 Atividade Antioxidante.....	16
1.7. Aplicações de <i>C. ruderalis</i>	18
1.8. Problema Biológico e Objetivos Gerais	20
2. Materiais e Métodos	22
2.1. <i>C. ruderalis</i> : obtenção do material vegetal e preparação dos extratos	22
2.1.1. Extratos Etanólicos	22
2.1.2. Extratos Aquosos.....	22
2.2. Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	23
2.2.1. Ensaio de DPPH.....	23
2.2.2. Ensaio de Sequestro do Óxido Nítrico.....	24
2.3. Avaliação do Conteúdo Total de Polifenóis – Método de Folin-Ciocalteu	25
2.4. Análise Química	25
2.5. Estirpe de Levedura, Meio e Condições de Crescimento.....	26
2.6. Ensaio de Viabilidade Celular	27
2.6.1. <i>Spot Assay</i> com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	27
2.6.2. <i>Spot Assay</i> com a Estirpe Selvagem BY4741, Mutante <i>yap1</i> e Mutante <i>gpx1/2/3</i>	27
2.7. Análise Estatística.....	28

3. Resultados e Discussão	29
3.1. Análise química por ESI-MS e ESI-MS/MS levou à identificação de compostos canabinóides e não canabinóides	29
3.2. EE100%, EE50% e EAq. de <i>C. ruderalis</i> demonstram atividade antioxidante <i>in vitro</i>	32
3.3. EE50% demonstrou maior teor de fenólicos comparativamente a EE100% e EAq.	35
3.4. O extrato etanólico a 50% de <i>C. ruderalis</i> não é citotóxico em <i>S. cerevisiae</i> (<i>wt</i>) no entanto, potencia a atividade do H ₂ O ₂	37
3.5. Efeito potencializado do H ₂ O ₂ está diretamente relacionado com a condição de stress oxidativo .	40
4. Conclusão e Perspetivas futuras	45
5. Bibliografia	47
6. ANEXOS	61

Lista de Abreviaturas

2-AG – 2-Araquidonilglicerol

AA – Ácido Ascórbico

AEA – Araquidonoiletanolamida/ Anadamida

AG – Ácido Gálico

AGE – Ácidos Gordos Essenciais

CB1 – Recetor Canabinóide do tipo 1

CB2 – Recetor Canabinóide do tipo 2

CBC – Canabicromeno

CBCA – Ácido Canabicroménico

CBD – Canabidiol

CBDA – Ácido Canabidiólico

CBGA – Ácido Canabigerólico

CBG – Canabigerol

CBNA – Ácido Canabinólico

CBNDA – Ácido Canabinodiólico

DPPH – 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil

D.O. – *Optical Density* (Densidade Ótica)

ECS – Sistema Endocanabinóide

EE100% – Extrato Etanólico Absoluto

EE50% – Extrato Etanólico a 50%

EAq. – Extrato Aquoso

EtOH100% - Etanol Absoluto

EtOH50% - Etanol a 50%

FT – Fator de Transcrição

GAE – Equivalentes de Ácido Gálico

GLR – Glutaciona Redutase

GPx – Glutaciona Peroxidase

GSH - Glutaciona

ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)

SNP – *Sodium nitroprusside* (Nitroprussiato de sódio)

SOD – Superóxido Dismutase

THC – Tetrahydrocannabinol

THCA – Ácido Tetrahydrocannabinólico

THCV – Tetrahydrocannabivarina

TRX – Tio redoxina

YPD – *Yeast Peptone Dextrose* (Extrato de levedura; Peptona e Dextrose)

YPDA – *Yeast Peptone Dextrose Agar* (Extrato de levedura; Peptona; Dextrose e Agar)

wt – *wild-type*

Lista de Figuras

- Figura 1** - Representação das diferenças morfológicas (altura, caule e folha) entre as variedades *sativa*, *indica* e *ruderalis*, destacada a verde. Adaptado de: Leafly, 2015..... 4
- Figura 2** - Esquema representativo da biossíntese de terpenóides e fitocanabinóides. FPP- Pirofosfato de Farnesilo; GPP- Geranil Difosfato; THCA - Ácido Tetrahidrocanabinólico; CBDA- Ácido Canabidiólico; CBCA – Ácido Canabicroménico. Adaptado de: Russo, 2011..... 7
- Figura 3** - Locais de expressão dos recetores canabinóides, CB1, CB2 e ambos, no corpo **(A)** e cérebro humano **(B)**. **(A)** CB1: Cérebro, pulmões, sistema vascular, músculos, trato gastrointestinal e órgãos reprodutores; CB2: Baço, ossos e pele; CB1+CB2: Sistema imunitário, fígado, medula óssea e pâncreas. **(B)** CB1: Córtex, núcleo acumbens, gânglios basais, hipotálamo, cerebelo, hipocampo, amígdala e medula espinhal; CB2: células da glia; CB1+CB2: tronco encefálico. Adaptado de: Pacher, 2006..... 10
- Figura 4** - O EE50% de *C. ruderalis* potencializa o efeito oxidativo do H₂O₂ a concentrações superiores de extrato. As células de *Saccharomyces cerevisiae* BY7471 foram incubadas em meio YPD para atingir a fase de crescimento exponencial, seguidas de diluições seriadas até 10⁻⁴. Colocaram-se gotas de cada diluição em meio YPDA. Foram testadas as concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 75; 100; 500 e 1000 µg/mL e criadas 3 situações de controlo: controlo negativo contendo o solvente (EtOH50%) e dH₂O; controlo positivo contendo o solvente e 4 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo dH₂O e extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicado. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias e fotografadas. Os resultados mostrados são representativos de três experiências independentes..... 38
- Figura 5** - O mecanismo envolvido na potencialização do H₂O₂ pelo EE50% de *C. ruderalis* está diretamente relacionado com a condição de stress oxidativo. As células de cada estirpe (*wt*, *yap1* e *gpx1/2/3*) foram incubadas em meio YPD para atingir a fase de crescimento exponencial, seguidas de diluições seriadas até 10⁻⁴. Colocaram-se gotas de cada diluição em meio YPDA. Foram testadas as concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL e 10, 50 e 75 µg/mL e criadas 3 situações de controlo: controlo negativo, em que as células são apenas incubadas em YPDA; controlo positivo contendo 0,5 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo 0,5 mM de H₂O₂ e extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicada. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias e fotografadas. Os resultados mostrados são representativos de três experiências independentes. 42
- Figura 6** - Perfil positivo do espectro de massa de iões do EE100% de *C. ruderalis* obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS)..... 61

Figura 7 - Perfil positivo do espectro de massa de iões do EE50% de <i>C. ruderalis</i> obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).....	61
Figura 8 - Perfil positivo do espectro de massa de iões do EAq. de <i>C. ruderalis</i> obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).	62
Figura 9 - Perfil negativo do espectro de massa de iões do EE100% de <i>C. ruderalis</i> obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).....	62
Figura 10 - Perfil negativo do espectro de massa de iões do EE50% de <i>C. ruderalis</i> obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação taxonómica da subespécie <i>Cannabis ruderalis</i>	1
Tabela 2 - Sumário das concentrações de canabinóides encontrados em diferentes partes de plantas da espécie <i>Cannabis sativa</i> L. tipo fibra (raízes aéreas, raiz, sementes, caule, folhas e flores). Os dados estão expressos em µg/g de peso seco. Abreviações: THC - Δ9-tetrahydrocannabinol; CBD – Canabidiol; CBN – Canabigerol; THCV – Tetrahydrocannabivarina; CBC – Canabicromeno. Adaptado de: Andre <i>et al.</i> , 2016.....	8
Tabela 3 - Efeitos farmacológicos seletivos associados a alguns compostos terpenóides presentes em <i>Cannabis sativa</i> L.	13
Tabela 4 – Efeitos farmacológicos seletivos associados a alguns compostos fenólicos exclusivos em <i>Cannabis sativa</i> L.	15
Tabela 5 – Estirpes de levedura e respetivos genótipos	26
Tabela 6 - Identificação provisória de alguns dos compostos presentes em EE100%, EE50% e EAq. de <i>C. ruderalis</i> , de acordo com o espectro de massa no Anexo 1 obtido por ESI/MS e ESI-MS/MS, com base em valores de m/z já reportados em literatura.....	30
Tabela 7 – Avaliação da atividade antioxidante, <i>in vitro</i> , dos extratos EE100%, EE50% e EAq. de <i>C. ruderalis</i> . As atividades de eliminação de DPPH e NO foram lidas através dos valores de percentagem (%) de redução do DPPH e de inibição da produção de nitrito, respetivamente. Os resultados foram expressos através dos valores de IC50 (µg/mL). Os padrões incluem o ácido gálico (ensaio de DPPH) e o ácido ascórbico (ensaio de eliminação de NO). Os dados são apresentados como média de três réplicas independentes ± DP.	32
Tabela 8 – Avaliação do conteúdo fenólico total, <i>in vitro</i> , dos extratos EE100%, EE50% e EAq. de <i>C. ruderalis</i> . O teor de substâncias fenólicas foi expresso em equivalentes de padrão por massa de extrato (mg/g), sendo que o padrão utilizado foi o ácido gálico. Os dados são apresentados como média de três réplicas independentes ± DP.	36

1. Introdução

1.1. Cânhamo: Enquadramento Histórico

Originalmente, o termo “cânhamo” era uma designação comum para todas as plantas herbáceas pertencentes à espécie politípica da canábida, *Cannabis sativa* L., amplamente cultivadas pelas suas fibras resistentes em várias partes do mundo. Atualmente, este conceito passou a estar de certa forma mais associado à espécie *Cannabis ruderalis*, desde que esta foi descrita pelo botânico russo D. E. Janischewsky, em 1924, no Sul da Sibéria (Roskov, 2019), sendo que cânhamo é também o nome da fibra que se obtém a partir destas plantas.

Até hoje, não existe ainda um consenso por parte da comunidade científica relativamente à classificação deste género, no entanto, após algumas revisões da sistemática, o modelo mais aceite descreve, com base nas diferenças morfológicas, fitoquímicas e distribuição geográfica nativa das diferentes variedades, que *Cannabis sativa* L. engloba três subespécies distintas: *C. sativa* subsp. *sativa*, *C. sativa* subsp. *indica* e *C. sativa* subsp. *ruderalis*. Contudo, ao longo deste trabalho assume-se *C. ruderalis* como sendo uma espécie única (descrita por Janischewsky como tal), devido à sua ligação com o cânhamo, ao seu potencial como canábida medicinal e às suas características tão peculiares como a sua natureza espontânea e a sua capacidade de autofloração, que a diferem tão marcadamente das variedades *sativa* e *indica* e que aumentam o interesse para a exploração do seu perfil fitoquímico, com compostos bioativos e interações possivelmente não descritas até à data e promissoras para aplicação farmacológica.

A história de aplicação humana das plantas de canábida como fármaco teve início por volta do terceiro milénio antes de Cristo. O primeiro uso de canábida como remédio foi atribuído ao lendário imperador chinês Shen Nung, que se acredita ter vivido por volta de 2700 a.C. (Pisanti e Bifulco, 2019). Os seus ensinamentos foram transmitidos de boca em boca antes de aparecerem por escrito em Shen Nung Pen-Ts'ao Ching, um livro chinês de ervas medicinais cuja origem se perdeu na história, sendo hoje alvo de numerosos mitos e lendas (Jiang *et al.*, 2006). Na Europa Ocidental, alguns remédios eram também baseados em extratos de cânhamo, sendo que o texto médico do século IX, *Old English Herbarium*, aconselha cânhamo triturado para o tratamento de feridas (Pain, 2015). Durante o século XIX, o interesse médico moderno pela canábida foi atribuído ao médico irlandês William Brooke O'Shaughnessy, cujos estudos foram de extrema importância para a introdução de cânhamo indiano para a medicina britânica e norte-americana (Kalant, 2011). Após ter observado a forma como as pessoas utilizavam o cânhamo indiano como narcótico e remédio, O'Shaughnessy fez extratos de resina de canábida transformando-os em comprimidos que possibilitaram o tratamento de cólera, convulsões infantis e até tétano (Pain, 2015).

Já no presente século XXI, surgiu o primeiro produto à base de canábis, Sativex®, no Canadá. Este medicamento consiste num *spray* oral com extratos da planta, contendo concentrações semelhantes de dois dos canabinóides mais relevantes, o tetrahidrocanabinol (THC) e o canabidiol (CBD), sendo que, hoje em dia, este fármaco é aprovado em 27 países para tratar a espasticidade em pacientes com esclerose múltipla (Barnes, 2006). Também recentemente (novembro de 2018), foi anunciada uma nova solução oral Epidiolex®, baseada numa formulação purificada de CBD, disponível nos Estados Unidos, para o tratamento de convulsões associadas à síndrome de Lennox-Gastaut (LGS) ou síndrome de Dravet, duas epilepsias graves raras, com início na infância que não respondem às terapêuticas convencionais contra a epilepsia (Devinsky *et al.*, 2018). Ambos os fármacos foram desenvolvidos pela *GW Pharmaceuticals*, líder mundial no desenvolvimento e comercialização de medicamentos à base de canabinóides. O mercado comercial europeu (Portugal incluído) e não europeu oferece também uma variada seleção de produtos legais à base de CBD, obtidos a partir de cânhamo, que vão desde óleos a cápsulas e cremes.

Atualmente, as condições privilegiadas do nosso país – bom clima, abundantes horas de exposição solar, terrenos baratos, mão de obra qualificada e a preços competitivos, além da clareza na legislação – estão a atrair dezenas de empresas que pretendem tornar Portugal na porta de entrada para o mercado europeu de canábis medicinal. A Tilray Cantanhede é a empresa pioneira na produção, importação e exportação de canábis medicinal em Portugal sendo apenas uma das 40 companhias que, em cerca de um ano e meio, registaram na sua atividade económica alguma relação com o cultivo ou a transformação desta planta, nomeadamente para fins medicinais. Tal se tornou possível, uma vez que a 18 de julho de 2018 foi estabelecido, nacionalmente, o quadro legal para a utilização de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábis para fins medicinais, nomeadamente a sua prescrição e a sua dispensa em farmácia.

1.2. *Cannabis ruderalis*: Caracterização

1.2.1. A Origem: *ruderalis*, a “Erva Daninha”

O registo mais antigo descrito para *C. ruderalis* provém de um historiador viajante grego, Herótodo, que relatou vários rituais funerários de citas, tribos nómadas que vagueavam pelas estepes do Turquestão à Sibéria, que em modo de purificação inalavam a fumaça de sementes de cânhamo lançadas sobre pedras em brasa. Nas montanhas Altai da Sibéria foram então encontradas as tumbas desse povo em que constavam vários túmulos, com cadáveres bem preservados e pequenas tendas com caldeirões de cobre cheios de pedras, gelo e sementes de cânhamo (Stafford, P., 2013). As diferenças

Tabela 1- Classificação taxonômica da espécie *Cannabis ruderalis*

Classificação Taxonômica	
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Tracheobionta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Rosales</i>
Família	<i>Cannabaceae</i>
Gênero	<i>Cannabis</i>
Espécie	<i>Cannabis ruderalis</i>

nas sementes foram o que levaram Janischewsky a distinguir *C. ruderalis* (Tabela 1) das espécies *indica* e *sativa*, apesar de hoje serem reconhecidas várias diferenças entre as variedades mencionadas.

De notar que a maior diferença entre as variedades *sativa* e *indica* e *ruderalis* é a percentagem de THC, o principal componente psicoativo característico deste género. As duas primeiras variedades representam então plantas com THC percentual relativamente elevado, enquanto que *ruderalis* apresenta níveis de THC residuais (normalmente < 0,2 %) e uma percentagem de CBD considerável, um canabinóide que é associado a um elevado potencial terapêutico.

O termo *ruderalis* deriva do latim *rūdera*, plural de *rūdus* (Encyclopedia of Life, 2019) que, em termos ecológicos, é uma designação dada às comunidades vegetais que se desenvolvem em ambientes fortemente perturbados pela ação humana, o que demonstra a natureza de “erva daninha” desta espécie, que se traduz na capacidade de rápida colonização após recuperação ecológica de um meio ambiente que sofreu alteração (Leafly, 2015). Assim, *C. ruderalis* não é fortemente afetada pelas influências ambientais, uma vez que é uma espécie espontânea pois cresce de forma natural, sem precisar de pesticidas ou herbicidas (Piluzza *et al.*, 2013).

Enquanto que *sativa* e *indica* têm as suas origens enraizadas no centro e sul da Ásia, *C. ruderalis* é nativa da Rússia, podendo também ser encontrada crescendo no clima hostil do norte dos Himalaias (Royal Queen Seeds, 2019). Atualmente, plantações similares de *C. ruderalis* podem ser encontradas na maioria das áreas onde o cultivo de cânhamo já foi prevalente, como América do Norte, Canadá e Europa central e oriental, a maioria delas na Lituânia, Bielorrússia, Letónia, Estónia e países adjacentes (Amaducci *et al.*, 2015).

1.2.2. Botânica, Anatomia e Morfologia de *C. ruderalis*

O género botânico *Cannabis* representa plantas dicotiledóneas, angiospérmicas, geralmente dióicas (condição sexual natural), com cromossomas sexuais heteromórficos (X e Y) e com o sexo da planta geneticamente determinado (Kumar *et al.*, 2014). No entanto, em condições normais, uma população de cânabis pode também ser monóica/ hermafrodita (estado derivado artificialmente), como é o caso da cultura com que trabalhamos, que compreende flores de ambos os sexos numa única planta, que se tornam distinguíveis com o desenvolvimento da mesma. Na realidade, as variedades de cânhamo produtoras de fibra foram especificamente criadas para serem monóicas, de forma a impulsionar um

aumento na produtividade das sementes, uma vez que os dois sexos produzem fibras e compostos químicos com características distintas (Andre *et al.*, 2016). A maturação da semente é o processo que completa o ciclo de vida da planta, sendo que uma maturação tardia vai favorecer o acúmulo de canabinóides, tornando-se benéfico quando o objetivo é aumentar a quantidade de CBD, mas arriscado devido à perturbação na concentração de terpenos e fenóis uma vez que os canabinóides são formados pela condensação de precursores destes compostos (Clarke e Watson, 2007). Desta forma, as sementes utilizadas apresentam um ciclo vegetativo médio, de cerca de 135 dias.

Por fim, o que realmente diferencia *ruderalis* das outras espécies é o seu ciclo de floração, que é induzido de acordo com a sua maturidade, em vez de ser ativado pelo fotoperíodo como as variedades *sativa* e *indica*. As plantas de *C. ruderalis* geralmente começam a florescer entre 21 a 30 dias após as sementes terem sido semeadas, independentemente do ciclo da luz, sendo, portanto, denominadas estirpes “autoflorescentes” (Leafly, 2015). A estabilidade e o seu curto ciclo de vida fazem destacar o seu potencial quando consideramos que esta espécie pode ser utilizada para fins de hibridação, uma vez que as variedades de *sativa* e *indica* exigem uma mudança constante na iluminação para catalisar o período de floração (Royal Queen Seeds, 2019).

Relativamente à morfologia, enquanto as plantas de *C. sativa* são altas e de folhas que são finamente recortadas e com segmentos mais estritos ou de *C. indica*, que representa plantas pequenas, ostentando folhas mais largas, *C. ruderalis* raramente cresce mais que um metro de altura e apresenta folhagem tipicamente aberta, com folhas grandes, que se expressam num tom verde claro, e caules finos mas bastante fibrosos e resistentes (Rätsch, 2001) (Figura 1). De notar que, o tamanho e a forma dos folhetos diferem marcadamente, de acordo com a origem genética. As superfícies adaxial e abaxial apresentam tricomas dispersos e resinosos, capazes de segregar e armazenar uma série de metabolitos secundários, que podem atuar como mecanismo de defesa da planta (Dayanandan e Kaufman, 1976), e que incluem compostos como terpenos, fenólicos (alvos de estudo) e os demais canabinóides, sendo portanto, considerados como pequenas fábricas de fitoquímicos com múltiplas aplicações biotecnológicas. Assim, na taxonomia vernacular de hoje, o conceito “ruderalis” é aplicado a plantas que exibem de uma a três características: $CBD \geq THC$, morfologia de tipo espontânea ou floração precoce (autoflorescente) (McPartland, 2018).

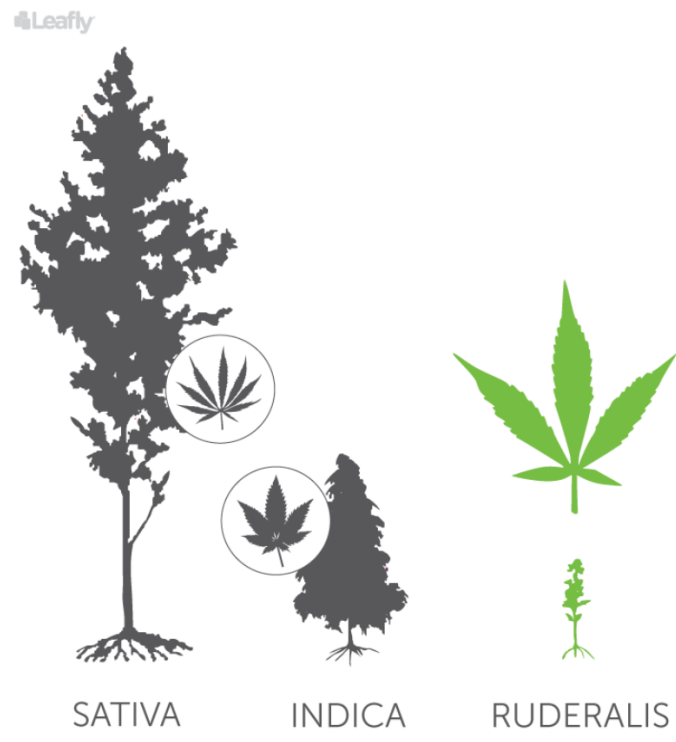


Figura 3 - Representação das diferenças morfológicas (altura, caule e folha) entre as variedades *sativa*, *indica* e *ruderalis*, destacada a verde. Adaptado de: Leafly, 2015.

1.3. Constituintes do Cânhamo: Fitoquímica da Planta

Numerosos compostos naturais são produzidos pelo género *Cannabis*, através do metabolismo secundário. Estes incluem terpenos, compostos fenólicos e, em particular, os canabinóides, alvo de maior parte dos estudos incidentes nas propriedades da planta (ElSohly *et al.*, 2017). Embora as propriedades farmacológicas dos canabinóides tenham sido extensivamente estudadas e estes sejam os bioativos de cânhamo mais reconhecidos, vários dos restantes componentes constituintes do género têm também sido associados a potentes propriedades promotoras da saúde, apesar dos estudos referentes não serem abundantes. Tal, pode justificar-se pelo facto de que as investigações normalmente aplicadas aos fitoquímicos da planta, bem como o amplo uso terapêutico generalizado dos produtos derivados da mesma, terem sido limitados ao longo do tempo por várias razões, que vão desde a ilegalidade do cultivo, à variabilidade dos demais compostos ativos ou até à reduzida abundância dos mesmos. Assim sendo, as atenções deste estudo direcionam-se para os componentes ativos da canábida, não psicotrópicos, com o objetivo de alargar o espectro de informação baseada nas espécies pertencentes ao género, nomeadamente *C. ruderalis*, uma espécie com características tão peculiares como a sua natureza espontânea ou a sua independência do fotoperíodo, que podem conferir à planta um perfil fitoquímico que inclui compostos e interações, não descritas até à data. Pela limitação encontrada perante literatura

específica para o modelo biológico em estudo, a informação utilizada na próxima secção é referente a todas as plantas pertencentes ao género *Cannabis*.

1.3.1. Fitocannabinóides e Sistema Endocannabinóide

Canabinoide é um termo genérico para descrever qualquer substância, seja ela natural ou sintética, que ative ou interaja diretamente com os recetores canabinoides do tipo 1 (CB1) ou com os recetores canabinoides do tipo 2 (CB2) (pertencentes ao sistema endocannabinóide, que será abordado de seguida). As várias classes englobam fitocannabinóides, que são compostos derivados das plantas de canábis, estruturalmente relacionados com o THC e o CBD; os endocannabinóides, que são encontrados no sistema nervoso e imunológico de alguns animais e seres humanos e os canabinóides sintéticos, uma diversidade de substâncias sintetizadas e com similaridade estrutural com os canabinóides naturais, que apresentam também capacidade para se ligar tanto aos recetores CB1 como aos recetores CB2 (Lambert e Fowler, 2005).

Os fitocannabinóides são compostos terpenofenólicos que representam um grupo de 21C ou 22C, nas suas formas carboxiladas. Mais de 90 fitocannabinóides diferentes (Fischedick *et al.*, 2010; Radwan *et al.*, 2009), geralmente classificados em 10 classes (Brenneisen, 2007), foram já reportados na literatura, sendo que os compostos predominantes são o ácido tetra-hidrocanabinólico (THCA), predominante na canábis psicotrópica (*C. sativa* subsp. *sativa* e *C. sativa* subsp. *indica*) e o ácido canabidiólico (CBDA), predominante na canábis tipo fibra (*C. ruderalis*). Nos tecidos vegetais, mais especificamente nas cavidades secretoras dos tricomas glandulares e principalmente em flores femininas, os fitocannabinóides são sintetizados a partir de precursores de ácidos gordos através de uma série de transferases e enzimas sintase (Figura 2). Porém, quando a planta é seca, armazenada e aquecida, os ácidos descarboxilam gradualmente, dando origem às suas formas neutras correspondentes (Atakan, 2012). O geranyl difosfato (GPP) e o ácido olivetólico (OA) são precursores iniciais que darão origem, tanto aos fitocannabinóides como aos terpenóides das plantas de canábis. Estes precursores são transformados por condensação em ácido cannabigerólico (CBGA), que é então oxido-ciclizado em ácido canabidiólico (CBDA), ácido Δ^9 -tetrahydrocanabinólico (Δ^9 -THCA) e ácido canabicroménico (CBCA), pelas enzimas ácido canabidiólico sintase (Taura *et al.*, 2007), ácido Δ^9 -tetrahydrocanabinólico sintase (Sirikantaramas *et al.*, 2004) e ácido canabicroménico sintase (Morimoto *et al.*, 1998), respetivamente. Alternativamente, GPP pode formar limoneno e outros monoterpenóides em plastídeos de células secretoras, ou emparelhar com isopentenil pirofosfato no citoplasma para formar farnesil pirofosfato, um composto parental dos sesquiterpenóides (Russo, 2011).

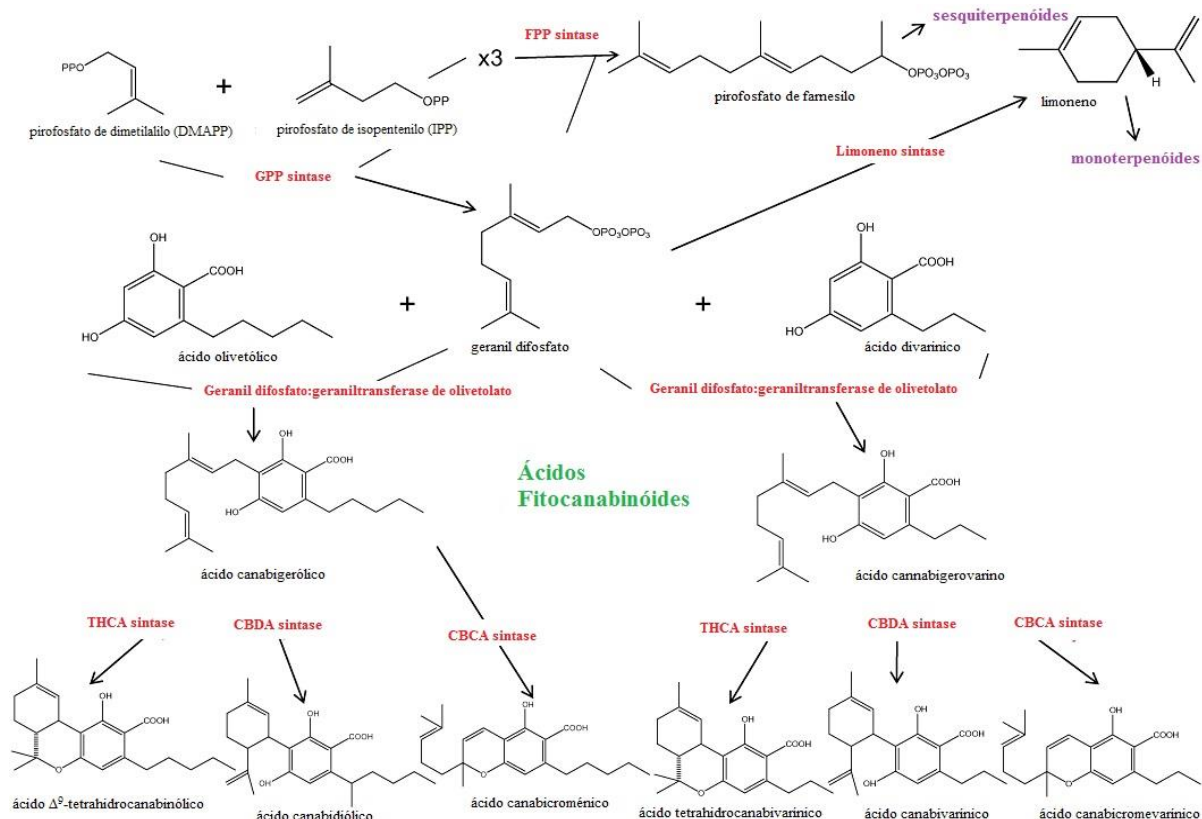


Figura 2 – Esquema representativo da biossíntese de terpenóides e fitocanabinóides. FPP- Pirofosfato de Farnesilo; GPP- Geranyl Difosfato; THCA - Ácido Tetrahydrocannabinólico; CBDA- Ácido Canabidiólico; CBCA – Ácido Canabicromênico. Adaptado de: Russo, 2011.

O Δ^9 -THC é o fitocanabinóide com maior potência psicotrópica. Este composto não cristalino, apresenta elevada lipofilia, o que facilita a sua adsorção no organismo e leva consequentemente a uma maior rapidez de ação (Gainza *et al.*, 2003). Já o CBD não apresenta qualquer atividade psicoativa, contudo, existem vários estudos que descrevem a sua capacidade neuroprotetora resultante do seu poder antioxidante contra os radicais livres de oxigénio (ROS) produzidos nos neurónios por libertação excessiva de glutamato (Zuardi, 2008). Hampson *et al.* (1998) investigou as propriedades antioxidantes desta

molécula e registou que o CBD previne os danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogénio, mostrando ser um antioxidante mais eficaz que o ascorbato (vitamina C) ou tocoferol (vitamina E). Estes dados sugerem, que o CBD pode então ser um agente terapêutico potencialmente útil para o tratamento de distúrbios neurológicos oxidativos ou outras enfermidades causadas por stress oxidativo celular.

Como já mencionado anteriormente, os fitocanabinóides encontram-se presentes na resina acumulada na cavidade secretora dos tricomas glandulares, principalmente em flores feminizadas. No entanto, foram também detetados em baixas quantidades nas sementes, nas raízes e no pólen, sendo que a concentração destes compostos depende de vários fatores como o tipo de tecido (Tabela 2), idade, condições de crescimento, tempo de colheita e condições de armazenamento (Amaducci *et al.*, 2015). É importante relevar que alguns fitoquímicos presentes na *Cannabis* podem gerar uma ação sinérgica

(denominada por efeito *entourage* ou modulação alostérica) e, portanto, variações relativamente pequenas nas proporções podem ter efeitos potencialmente grandes sobre a atividade geral dos compostos. O termo “efeito *entourage*” foi originalmente usado para descrever a interação entre 2-Araquidonilglicerol (2-AG), um endocanabinóide endógeno produzido naturalmente pelo organismo humano, e dois ésteres derivados dessa molécula, que apesar de não se ligarem a CB1, potencializam os efeitos deste composto (Ben-Shabat *et al.*, 1998). Atualmente, vários estudos reportam as interações fitocanabinóides-terpenóides que podem produzir sinergia no que diz respeito ao tratamento da dor, inflamação, depressão, ansiedade, epilepsia, cancro e infeções fúngicas e bacterianas (Russo, 2011).

Tabela 2 – Sumário das concentrações de canabinóides encontrados em diferentes órgãos de plantas da espécie *Cannabis sativa* L. (raízes aéreas, raiz, sementes, caule, folhas e flores). Os dados estão expressos em µg/g de peso seco. Abreviações: THC – Δ9-Tetrahydrocannabinol; CBD – Canabidiol; CBG – Canabigerol; THCV – Tetrahydrocannabivarina; CBC – Canabicromeno. Adaptado de: Andre *et al.*, 2016.

Concentração de canabinóides (µg/g) em diferentes órgãos de <i>C. sativa</i> L.						
Moléculas	Raízes aéreas	Raíz	Sementes	Caule	Folhas	Flores
THC	1,04		3 - 29	196 - 475	2000	76300
CBD	1,67	14,3	67 - 244	179 - 7850	1790	8590
CBN			2 - 7	0 - 47		
CBG	1,63				2000	< 600
THCV						< 600
CBC						4600

Ao cultivar as plantas em condições uniformemente controladas, é possível obter uma proporção relativamente constante destes compostos.

O sistema endocanabinóide (ECS) representa uma rede de sinalização endógena do organismo humano (estando também presente em alguns animais) bastante complexa, na qual diferentes moléculas desempenham papéis distintos no controlo e/ou modulação de numerosos processos fisiológicos relacionados com a homeostase neuronal. O desenvolvimento de ligandos sintéticos dos recetores canabinóides, como o CP 55,940 da Pfizer nos anos 80, levou à identificação de locais específicos de ligação do Δ9-THC no sistema nervoso central humano (Herkenham *et al.*, 1990) e posteriormente, à identificação do primeiro recetor canabinóide, CB1 (Matsuda *et al.*, 1990). Por volta da mesma época, foram identificados os ligandos endógenos que ativam os recetores canabinóides (denominados por endocanabinóides), com a descoberta da anadamida (AEA) e do 2-AG, diretamente libertados a partir

das membranas celulares. Entre outros efeitos, foi relatado que os endocanabinóides, lipídios pleiotrópicos, cujas ações não se restringem aos recetores canabinóides, modulam a diferenciação celular, a sinalização celular, a migração celular e o destino celular (Bab *et al.*, 2008). Estas revelações contribuíram para a descoberta do sistema endocanabinóide, que compreende os dois recetores canabinóides bem caracterizados, CB1 e CB2 (recetores acoplados à proteína G, com 48% de homologia entre eles), os ligandos endógenos e todo o processo bioquímico responsável pela síntese e degradação dessas substâncias. Posto isto, a caracterização detalhada dos seus constituintes e respetivas vias metabólicas, fornecem uma ferramenta valiosa para a discussão da ação dos demais fitocanabinóides, que são alvos terapêuticos promissores (Hill *et al.*, 2012).

A atividade dos recetores CB pode ser modulada diretamente pela ligação dos ligandos ou indiretamente, via modulação dos níveis de endocanabinóides (por exemplo, pela inibição de enzimas). Quando os agonistas parciais dos canabinóides endógenos, incluindo análogos do Δ^9 -THC, ligam a CB1 (recetor para o qual apresentam maior afinidade), inibem a libertação de neurotransmissores normalmente modulados por AEA e 2-AG, controlando dinamicamente a atividade neuronal excitatória e inibitória no sistema nervoso central (Atakan, 2012). Curiosamente, o CBD mostra apenas uma baixa afinidade de ligação a ambos os recetores, CB1 e CB2. No entanto, Thomas e os seus colaboradores (2007) demonstraram que esta molécula para além de antagonizar os agonistas dos recetores canabinóides no cérebro de ratinhos, exibe agonismo inverso nos recetores CB2 humanos. Posto isto, pode afirmar-se que tanto os agonistas como os antagonistas dos recetores canabinóides apresentam potenciais aplicações terapêuticas (Oesch e Gertsch, 2009).

De uma forma mais específica, o recetor CB1 está localizado principalmente no cérebro (Figura 3), mas pode também ser expresso no sistema nervoso periférico, fígado, tiróide, útero, ossos e tecido testicular (Russo e Guy, 2006). A maior densidade de recetores é encontrada em células dos gânglios basais, envolvidas nos movimentos de coordenação do corpo. Porém, estes recetores são também abundantes no cerebelo, região responsável pela coordenação dos movimentos do corpo; no hipocampo, responsável pela aprendizagem, memória e resposta ao stress e, no córtex cerebral, responsável pelas funções cognitivas. Dados clínicos apoiam o uso de agonistas deste recetor contra a dor inflamatória e neuropática para a melhora de espasticidade, tremores ou dores associadas à esclerose múltipla ou lesão medular. Daí a origem do fármaco Sativex®, desenvolvido para gestão dos múltiplos sintomas associados à esclerose múltipla (Barnes, 2006).

CB2 é maioritariamente expresso nas células imunitárias, baço, sistema gastrointestinal e até certo ponto no cérebro e sistema nervoso periférico (Pertwee, 2006). No sistema nervoso central, os CB2 são

expressos nos astrócitos, microglia e em células endoteliais cerebromicrovasculares (Rivers e Ashton, 2010) e tal expressão representa um papel crucial na patogênese e tratamento de condições que envolvem neuroinflamação e neurodegeneração (Cabral e Griffin-Thomas, 2009). Curiosamente, ambos os recetores foram também encontrados na placenta humana e têm vindo a demonstrar uma importante participação na regulação da atividade do transporte da serotonina, um neurotransmissor que influencia uma ampla gama de sistemas fisiológicos que intervêm essencialmente ao nível do humor, temperatura corporal, ritmo circadiano e apetite (Lucki, 1998).

Resumindo, a identificação dos recetores canabinóides e ligantes lipídicos endógenos desencadeou um crescimento exponencial de estudos que exploram o ECS como um sistema mensageiro complexo ativo em diferentes órgãos e tecidos, aplicado, na última década, a um número crescente de funções fisiológicas, tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. Mais importante, a modulação de ECS revelou-se promissora numa ampla gama de doenças e condições patológicas que incluem o humor, a ansiedade, dor neuropática, esclerose múltipla e espinhal; distúrbios de movimento como a doença de Parkinson e Huntington, lesão medular, aterosclerose, enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, cancro, hipertensão, glaucoma, obesidade/ síndrome metabólica e osteoporose

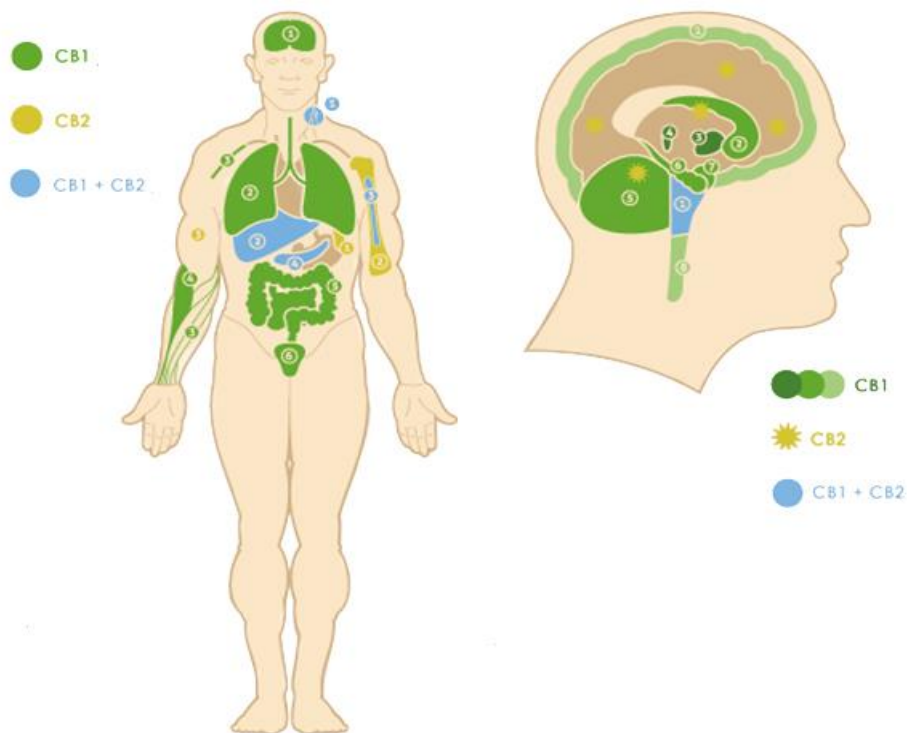


Figura 3 - Locais de expressão dos recetores canabinóides, CB1, CB2 e ambos, no corpo (A) e cérebro humano (B). (A) CB1: Cérebro, pulmões, sistema vascular, músculos, trato gastrointestinal e órgãos reprodutores; CB2: Baço, ossos e pele; CB1+CB2: Sistema imunitário, fígado, medula óssea e pâncreas. (B) CB1: Córtex, núcleo *acumbens*, gânglios basais, hipotálamo, cerebelo, hipocampo, amígdala e medula espinhal; CB2: células da glia; CB1+CB2: tronco encefálico. Adaptado de: Pacher, 2006.

(Pacher *et al.*, 2006). O crescente número de estudos pré-clínicos e clínicos com compostos que modulam o ECS, provavelmente, resultará em novas abordagens para aplicações terapêuticas de grande relevância em várias condições para as quais os tratamentos convencionais não atendem totalmente às necessidades do paciente (Mouslech e Valla, 2009).

1.3.2 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides (por vezes designados por isoprenóides) são compostos que incluem uma ampla gama de substâncias naturais. Estes são, normalmente, componentes de óleos essenciais, responsáveis pelo odor e sabor das várias plantas do género *Cannabis*, com fórmula química geral $(C_5H_8)_n$, formando o maior grupo de fitoquímicos, com mais de 120 moléculas identificadas no género (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016). Estes compostos são classificados em diversas famílias de acordo com o número de unidades repetitivas de 5 carbonos (unidades de isopreno), como monoterpenos com 10 carbonos, sesquiterpenos com 15 carbonos e triterpenos derivados de um esqueleto de 30 carbonos. Os mono- e sesquiterpenos são os principais componentes de óleos essenciais, enquanto as outras classes são normalmente associadas a bálsamos, resinas, ceras e borrachas. Os monoterpenos dominam geralmente o perfil de terpenos voláteis e incluem D-limoneno, β -mirceno, α - e β -pineno, terpinoleno e linalool. No entanto, os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno em particular, ocorrem também em grandes quantidades em extratos derivados destas plantas.

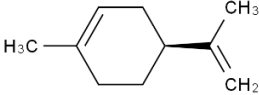
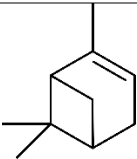
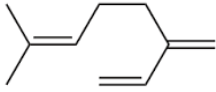
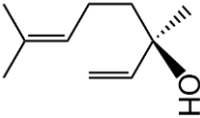
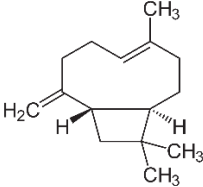
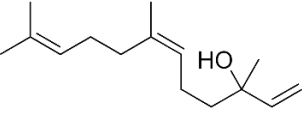
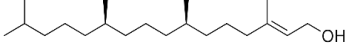
Vários destes compostos têm vindo a ser detetados em flores, raízes e folhas da planta, com os pêlos glandulares secretórios como principal local de produção. A produção e distribuição de terpenos na planta varia de acordo com numerosos parâmetros, desde o processo para obtenção do óleo essencial/ extrato, às condições ambientais e estado de maturação da planta, sendo que a sua composição relativa pode variar amplamente entre as diferentes variedades (Andre *et al.*, 2010). Elzinga *et al.* (2015) sugerem que a variação do conteúdo relativo dos terpenos entre as várias espécies, pode ser usada como ferramenta útil para a caracterização dos diferentes bio-tipos da canábis.

As funções biológicas e ecoquímicas dos terpenos não estão totalmente elucidadas, no entanto um "polimorfismo fitoquímico" parece estar presente na planta, já que a produção favorece agentes mais voláteis como o limoneno e o pineno em flores que são repelentes de insetos (Gautschi *et al.*, 2001), enquanto as folhas mais baixas expressam maiores concentrações de sesquiterpenóides amargos ou tóxicos, que atuam como substâncias repulsivas para animais em pasto e algumas espécies de fungos e bactérias (Casano *et al.*, 2011; Nuutinen, 2018). Contudo, não existem evidências, em humanos, de toxicidade por ação destes compostos. Por último, mas não menos importante, os terpenos desempenham um papel relevante como compostos de sinalização e reguladores de crescimento das

plantas (fitohormonas), sendo usados, juntamente com os canabinóides, como marcadores quimiotaxonómicos, uma vez que são ambos considerados metabolitos secundários fisiologicamente ativos (Andre *et al.*, 2016). De notar que as feromonas sintetizadas a partir dos terpenos constituintes da canábis são substitutos inofensivos ao meio ambiente dos inseticidas convencionais, para capturar insetos prejudiciais às culturas (Figueiredo *et al.*, 2006).

No que diz respeito à farmacologia destes compostos, os terpenos presentes na canábis apresentam uma ampla gama de efeitos biológicos conhecidos, sendo que alguns podem estar envolvidos na regulação e/ou modificação dos efeitos do THC e outros canabinóides (Hazekamp *et al.*, 2016), interação designada por “efeito *entourage*”, já abordada na secção 1.3.1. O efeito de sinergia deste componente psicoativo tem sido o principal foco de atenção para os investigadores que procuram um estudo mais aprofundado dos terpenos na canábis. Este efeito, abrange a potenciação da atividade de outros componentes ativos ou inativos, existentes na planta, na medida em que estes compostos se ligam aos mesmos recetores, alterando a sua conformação química, resultando num aumento da passagem dos canabinóides, pela barreira hematoencefálica (Russo, 2011). Os terpenóides possuem a capacidade de influenciar até mesmo os neurotransmissores como a serotonina e a dopamina, alterando a taxa a que são produzidos e destruídos. Vários estudos estendem a lista com outras propriedades medicinais evidenciadas por ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabela 3), que incluem os seus efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antibacterianos (Andre *et al.*, 2016; Singh e Sharma, 2015; Vásquez *et al.*, 2012), tornando a compreensão científica dos benefícios terapêuticos dos terpenos, cada vez mais num desafio promissor para a medicina. De notar que estes compostos mostram atividade anticancerígena frequentemente por ação pró-apoptótica mas não mostram ser tóxicos para células ou tecidos saudáveis, sendo portanto, bastante neuro-, hépato- e nefroprotetores. Devido ao seu comportamento antioxidante, demonstrou-se que os terpenos fornecem proteção relevante sob condições de stress oxidativo em várias doenças, incluindo doenças hepáticas, renais, neurodegenerativas e cardiovasculares, diabetes e processos de envelhecimento (González-Burgos e Gómez-Serranillos, 2012). Estes compostos, amplamente utilizados na indústria alimentar (aditivos), na cosmética e em medicamentos tradicionais, apresentam baixa toxicidade, elevada biodisponibilidade e um bom índice terapêutico, o que significa que a quantidade necessária para causar efeito terapêutico é muito inferior à concentração limite para que sejam associados efeitos tóxicos.

Tabela 3 - Efeitos farmacológicos seletivos associados a alguns compostos terpenóides presentes em *Cannabis sativa* L.

Estrutura Química dos Terpenóides	Efeitos Farmacológicos Seletivos	Referências
 <p>D-Limoneno</p>	Imunoestimulante; Ansiolítico; Indutor de apoptose em células de cancro de mama; Ativo contra acne bacteriana; ↓ refluxo gastroesofágico.	Komori <i>et al.</i> , 1995; Komiya <i>et al.</i> , 2006; Vigushin <i>et al.</i> , 1998; Kim <i>et al.</i> , 2008; Harris, 2010.
 <p>α- Pineno</p>	Anti-inflamatório; Broncodilatador; Inibidor da acetilcolinesterase.	Gil <i>et al.</i> , 1989; Falk <i>et al.</i> , 1990; Perry <i>et al.</i> , 2000.
 <p>β-mirceno</p>	Anti-inflamatório; Analgésico; Sedativo/ Relaxante muscular/ Hipnótico; Bloqueador da carcinogénese hepática, via aflatoxinas.	Lorenzetti <i>et al.</i> , 1991; Rao <i>et al.</i> , 1990; Vale <i>et al.</i> , 2002.
 <p>Linalol</p>	Ansiolítico; Sedativo por inalação, em ratinhos; Anestésico local; Analgésico; Anticonvulsivante.	Russo, 2001; Buchbauer <i>et al.</i> , 1993; Re <i>et al.</i> , 2000; Peana <i>et al.</i> , 2006; Elisabetsky <i>et al.</i> , 1995.
 <p>β-cariofileno</p>	Citoprotetor gástrico; Antimalárico; Agonista seletivo CB2;	Tambe <i>et al.</i> , 1996; Campbell <i>et al.</i> , 1997; Gertsch <i>et al.</i> , 2008.
 <p>Nerolidol</p>	Sedativo; Penetrante da pele; Antimalárico potente;	Binet <i>et al.</i> , 1972; Cornwell e Barry, 1994;
 <p>Fitol</p>	Previne teratogénese da vitamina A; ↑ GABA	Arnhold <i>et al.</i> , 2002; Bang <i>et al.</i> , 2002.

1.3.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos mais amplamente distribuídos de metabolitos secundários no reino vegetal. Em química orgânica, estes compostos consistem num grupo hidroxilo ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático e apresentam as seguintes propriedades químicas: alguns são solúveis em água, outros são solúveis em solventes orgânicos, alguns são encontrados como glicosídeos e outros são grandes polímeros insolúveis (San Miguel-Chávez, 2017). Este grupo heterogêneo apresenta mais de 10.000 estruturas diferentes, que inclui ácidos fenólicos, flavonóides, como flavonóis e flavonas, estilbenos e lignanas (Andre *et al.*, 2010).

Em plantas do gênero *Cannabis*, cerca de 20 flavonóides foram identificados, principalmente pertencentes às subclasses flavona e flavanol, que incluem as versões O-glicosídicas das agliconas apigenina, luteolina, kaempferol e quercetina, bem como canflavina A e canflavina B, que são flavonas isoprenóides metiladas exclusivas deste gênero (Ross *et al.*, 2005). Estes compostos são onnipresentes e têm muitas funções na bioquímica, fisiologia e ecologia de plantas, sendo também importantes na nutrição e saúde humana e animal. Alguns efeitos farmacológicos dos flavonóides da canábis foram detetados, como a inibição da produção de prostaglandina E2 pela canaflavina A e B e inibição da atividade da aldose redutase em lentes de ratinhos pelas diglicosilflavonas C, orientinas e quercetinas. Uma nova pesquisa reportada na revista *Phytochemistry* mostra as canaflavinas A e B como sendo aproximadamente 30 vezes mais efetivas que a Aspirina® na redução da inflamação, em modelos celulares (Rea *et al.*, 2019). Flores-Sanchez e Verpoorte (2008) sugerem uma possível modulação dos canabinóides por parte destes compostos.

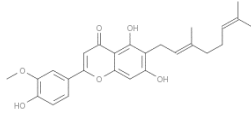
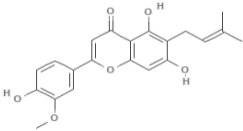
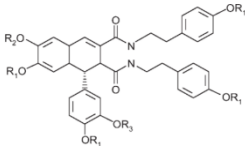
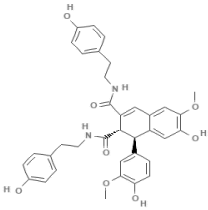
Dezanove estilbenos com estruturas características como espiranas, fenantrenos e bibenzilos, foram também isolados a partir da planta (Flores-Sanchez e Verpoorte, 2008). Estes metabolitos secundários conferem funções essenciais na reprodução e crescimento das plantas, uma vez que são produzidos como mecanismos de defesa contra patógenos, parasitas e predadores (Ramawat e Mérillon, 2013). Frequentemente, os estilbenóides são constituintes das raízes da planta, e apresentam atividades antifúngica e antibacteriana (Kostecki *et al.*, 2004). No entanto, outros estudos sugerem as suas atividades anti-inflamatória (Djoko *et al.*, 2007), neuroprotetora (Lee *et al.*, 2006), antineoplásica (Yamada *et al.*, 2006), antioxidante (Stivala *et al.*, 2001) e protetora cardiovascular (Leiro *et al.*, 2005).

Cerca de 11 compostos identificados como amidas fenólicas e lignanamidas foram descritas em frutos e raízes de *Cannabis sativa* L., sendo que pequenas quantidades de lignanas foram encontradas também em extratos hidrofílicos de sementes de cânhamo (Lesma *et al.*, 2014). Demonstrou-se que o perfil de lignana das sementes de cânhamo é dominado por siringaresinol e medioresinol, seguido por secoisolariciresinol, lariciresinol e pinioresinol (Amarendra *et al.*, 2012). Para as lignanamidas canabisina

B e D, foi relatada uma potente atividade inibitória de apetite (Lajide *et al.*, 1995), enquanto que para as canabisininas D e G, foi demonstrada uma atividade citotóxica (Ma *et al.*, 2002). Quanto às amidas fenólicas foram evidenciadas a atividade citotóxica (Chen *et al.*, 2006), antineoplásica (Ma *et al.*, 2004), anti-inflamatória (Kim *et al.*, 2003) e analgésica leve (Slatkin *et al.*, 1971). De notar que, mais uma vez, as concentrações destes compostos dependem do tipo de tecido, idade, variedade, condições de crescimento, tempo de colheita e condições de armazenamento (Keller *et al.*, 2001).

Como se verifica, o género *Cannabis* não produz apenas canabinóides, mas uma série de metabolitos secundários cuja atenção tem sido camuflada devido à importância notória dos compostos principais desta planta. Um aspeto interessante é que os canabinóides não são os únicos compostos exclusivos desta espécie. Fenólicos como as canflavinas as canabisininas surgem também como componentes únicos da planta, com efeitos farmacológicos seletivos já demonstrados em literatura (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeitos farmacológicos seletivos associados a alguns compostos fenólicos exclusivos em *Cannabis sativa* L.

Estrutura Química dos Fenólicos	Efeitos Farmacológicos Seletivos	Referências
 <p>Canflavina A</p>  <p>Canflavina B</p>	<p>Inibição da produção de prostaglandina E2;</p> <p>↑ poder anti-inflamatório;</p> <p>Atividade antileishmanial.</p>	<p>Barrett <i>et al.</i>, 1985; Rea <i>et al.</i>, 2019; Ibrahim <i>et al.</i>, 2010.</p>
 <p>Canabisinina B</p>  <p>Canabisinina D</p>	<p>Atividade inibitória de apetite;</p> <p>Indução de autofagia em células HepG2;</p> <p>Citotoxicidade contra células LNCaP.</p>	<p>Lajide <i>et al.</i>, 1995; Brunelli <i>et al.</i>, 2009; Ma <i>et al.</i>, 2002.</p>

No entanto, nos últimos anos, o número de estudos incidente na farmacologia dos compostos fenólicos tem vindo a aumentar devido, essencialmente, à sua elevada capacidade de atuar como potentes antioxidantes, sob determinadas condições fisiológicas, e desta forma, proteger as plantas contra o stress oxidativo (Chanda e Dave, 2009). Em humanos, foi evidenciada uma correlação positiva entre uma dieta rica em compostos fenólicos e uma incidência reduzida de doenças crónicas como cancro, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Arts e Hollman, 2005). Estes efeitos não podem ser totalmente explicados pelas propriedades antioxidantes fenólicas, devido à reduzida biodisponibilidade destes compostos (Karakaya, 2004). Contudo, estes fitoquímicos possuem, em maior ou menor grau, atividade anticarcinogénica/ antimutagénica, antiaterosclerótica, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (Andre *et al.*, 2010), o que os torna alvos de estudo bastante promissores para novas pesquisas.

1.6 Atividade Antioxidante

Espécies reativas, endógenas e exógenas, de oxigénio (ROS) e radicais livres estão diretamente envolvidos no desenvolvimento de danos oxidativos a tecidos. Os organismos aeróbicos usam a mitocôndria como principal gerador de energia, para a realização das suas funções vitais. Para isso, estes organelos produzem ATP através de reações de oxidação e redução, que invariavelmente resultam na geração de espécies como o anião superóxido, radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio, que sendo instáveis, estabilizam, sequestrando eletrões de outras biomoléculas, resultando na sua oxidação (Velázquez *et al.*, 2003). O desequilíbrio entre a sobreprodução destas espécies e a capacidade antioxidante inerente do organismo desenvolve a condição de stress oxidativo nas células, que por sua vez leva a alteração da homeostase e conseqüentemente, à morte celular. Assim, ROS e espécies radicais não oxigénio estão implicados na etiologia e progressão de vários distúrbios agudos e crónicos, como diabetes, aterosclerose, imunossupressão, neurodegeneração e envelhecimento (Saeed *et al.*, 2012).

Aumentos nos níveis de ROS, como aqueles que podem ocorrer durante períodos de stress oxidativo, são detetados por moléculas reguladoras sensíveis ao estado *redox* na célula, que atuam para neutralizar os seus efeitos prejudiciais, através de um sistema de defesa antioxidante natural, que envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Enquanto que os antioxidantes enzimáticos convertem os produtos metabólicos oxidados em H_2O_2 e posteriormente em H_2O , usando cofatores como Fe, Zn, Cu e Mn, os antioxidantes não enzimáticos interceptam e suprimem reações em cadeia de radicais livres. A vitamina A, C e E, polifenóis vegetais, flavonoides, carotenoides, glutathiona e ácido úrico são bons exemplos de antioxidantes não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos funcionam como principal linha de defesa endógena celular contra o stress oxidativo e incluem como proteínas chave a superóxido

dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Aguilar *et al.*, 2016). As SODs são enzimas capazes de converter radicais superóxido em H₂O₂ e O₂, enquanto que as enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, que se baseia em impedir a acumulação de H₂O₂ nas células. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss e mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração de radicais OH[•], indicado como o de maior potencial reativo e extrema instabilidade (Barbosa *et al.*, 2010). A atividade das enzimas em questão depende, muitas das vezes, da participação de cofatores enzimáticos e antioxidantes de origem dietética.

Vários são os estudos, emergentes na literatura, que vinculam o consumo de dietas ricas em antioxidantes naturais a um menor risco de doenças associadas ao stress oxidativo, como cancro (Wahle *et al.*, 2010; Fabiani, 2016) e doenças cardiovasculares (Lutz *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos, presentes em várias plantas, vegetais e frutos, são o grupo de fitoquímicos que têm vindo a receber maior interesse, devido à sua associação com uma elevada capacidade antioxidante. Estes, são capazes de suprimir a formação de ROS por diferentes mecanismos como: inibição de oxidases como a xantina oxidase, responsável pela produção de iões superóxido; *scavenging* direto de espécies reativas de oxigénio; ativação de enzimas antioxidantes, etc. (Basli *et al.*, 2017). No entanto, embora vários fitoquímicos como os polifenóis, exibam consistentemente atividade antioxidante e efeitos positivos na saúde, ainda não foi alcançado um consenso sobre o verdadeiro papel de cada um. Isto, deve-se em parte à capacidade destes compostos atuarem também como pró-oxidantes, sob determinadas condições, promovendo reações oxidativas (Procházková *et al.*, 2011). Algumas das condicionantes importantes dizem respeito à concentração do químico e à presença ou ausência de oxigénio ou metais de transição.

As plantas pertencentes à espécie *Cannabis sativa* L., associadas também ao conceito de cânhamo, tem vindo a demonstrar potencial atividade antioxidante, especialmente derivada dos seus recursos comestíveis (sementes, farinhas e óleos), que incluem uma ampla variedade de terpenos, fenóis, especialmente estilbenóides e lignanamidas, que apenas recentemente foram caracterizados com algum detalhe. Smeriglio *et al.* (2016) demonstraram que o óleo de semente da variedade Finola possui um potencial antioxidante significativo. Moccia *et al.* (2019) comprovaram uma atividade antioxidante significativamente alta para sementes e farinha da variedade Fedora. A panóplia de estudos incidentes nas propriedades antioxidantes desta espécie já é grande e, maior parte, demonstra uma correlação elevada com o conteúdo de fenólicos existentes na planta (Drinić *et al.*, 2018; Frassinetti *et al.*, 2018; Siano *et al.*, 2019).

Uma vez que a tendência se move em direção à substituição de antioxidantes sintéticos pelos naturais, mais seguros e com menor número de efeitos adversos à saúde humana torna-se de extrema importância explorar os efeitos antioxidantes de plantas como *C. ruderalis*, a fim de expandir a sua utilização na indústria farmacêutica e alimentar. Por outro lado, o estudo da atividade antioxidante desta subespécie permitirá uma comparação com o descrito em literatura para outras plantas do género *Cannabis*.

1.7. Aplicações de *C. ruderalis*

O género botânico *Cannabis* representa um recurso natural muito valioso, subestimado mundialmente e ofuscado pela legislação que limita fortemente tanto o seu cultivo, como o seu uso para os mais variados fins. Ainda nos dias de hoje, o termo canábis continua a ser associado, de imediato, à droga recreativa a que dá origem, enquanto que a ligação da planta ao cânhamo, cujo mercado incidente tem vindo a crescer exponencialmente nos últimos anos, continua a passar despercebida.

Cannabis ruderalis é uma planta altamente versátil que dá origem a produtos alternativos económicos, sustentáveis e saudáveis e, desta forma, deve ser valorizado o seu interesse comercial/ económico, de forma a maximizar o seu aproveitamento para as demais finalidades. O produto que mais se destaca é a sua fibra, uma das fibras mais longas e resistentes da natureza, também chamada de filame, muito utilizada na indústria de papel e materiais de construção. O cânhamo surge então como alternativa ecológica ao eucalipto que, num período de vinte anos, produz em um hectare, o mesmo que quatro hectares de eucaliptos (Selkirk e Spencer, 1999). Sem dúvida que o carácter ambiental é um dos pontos fortes desta espécie, uma vez que no processo produtivo, o plantio do cânhamo utiliza menos 75% de água em comparação com o algodão, menos agrotóxicos e faz um uso menos intensivo do solo (Van der Werf e Turunen, 2008). A fibra vegetal que no passado deu origem ao tecido das velas das naus que impulsionaram os portugueses à conquista do Novo Mundo surge também, atualmente, como uma alternativa economicamente competitiva para a indústria têxtil. As fibras de cânhamo demonstraram ser cerca de 30% mais resistentes que as do algodão; possuir um grande poder de absorção (de 20 a 30% do seu peso); possuir uma fibra que não se deteriora, refletir mais de 95% dos raios UV e ainda resistir ao mofo e aos micróbios, sendo por isso recomendada a quem sofre de alergias ou intolerâncias (Ranalli e Venturi, 2004). Da semente, extrai-se um óleo muito usado na indústria de cosméticos como base para cremes, champôs, óleos hidratantes, etc., além de ser uma alternativa sustentável para substituir por exemplo o petróleo, no que diz respeito à produção de combustíveis e materiais plásticos (Prade *et al.*, 2011).

A semente de cânhamo é única no reino vegetal. O seu perfil de proteínas e gorduras é dos mais completos para a nutrição do corpo humano (Leizer *et al.*, 2000). As sementes de cânhamo são

consideradas um superalimento surpreendentemente nutritivo, rico em ácidos gordos essenciais (AGE) polinsaturados, num rácio ideal de 3:1 de AGE ómega 6 e ómega 3, como são exemplo o ácido linolénico e alfa-linolénico (ALA), associados à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, problemas de pele como eczema, sintomas da menopausa e desequilíbrios hormonais (Callaway, 2004). Os AGE não são produzidos naturalmente pelo organismo humano e o cânhamo torna-se uma excelente fonte destes compostos, apresentando o total de AGE mais elevado de qualquer óleo de semente (80%). Os AGE baixam a pressão arterial e ajudam os músculos a contrair, a regular o ácido do estômago e a temperatura do corpo (Arnold *et al.*, 2015). Os AGE são também necessários para o funcionamento normal do sistema reprodutivo, regulação de hormonas e para quebrar os depósitos de colesterol nas artérias. As sementes contêm ainda pequenas quantidades de vários outros ácidos gordos polinsaturados que desempenham um papel importante no metabolismo humano (Sapino *et al.*, 2005).

Estas sementes podem ser ingeridas cruas, germinadas, transformadas em óleo ou leite de cânhamo e as folhas frescas são, normalmente, consumidas em saladas. As proteínas são o segundo principal componente das sementes, sendo que a proteína de cânhamo contém todos os 20 aminoácidos, incluindo os nove essenciais que o indivíduo adulto não tem capacidade para produzir (Tang *et al.*, 2006). Relativamente poucos alimentos à base de plantas são fontes completas de proteína, tornando as sementes de cânhamo uma adição valiosa para a dieta vegetariana ou vegana. Estas, são uma excelente fonte de fibra e em adição, contêm ainda uma ampla variedade de vitaminas e minerais e são especialmente ricas em vitamina E, magnésio, fósforo e potássio (Callaway, 2004). A vitamina E confere às sementes um elevado potencial antioxidante, uma vez que desempenha um papel fundamental na proteção do organismo contra os efeitos prejudiciais de ROS, estando relacionada com benefícios associados à doença de Alzheimer, aterosclerose e cancro (Matthäus e Brühl, 2008). A ampla gama de polifenóis (flavonoides, como flavanonas, flavonóis, flavanóis e isoflavonas) descrita para as sementes de cânhamo estão também associados à sua elevada capacidade antioxidante (Smeriglio *et al.*, 2016).

A variedade de *C. ruderalis* é também das mais recomendadas para uso medicinal, devido ao alto teor de CBD (e reduzida percentagem de THC), a molécula derivada da canábida que tem ganho cada vez mais presença na área da saúde e investigação. Tal, deve-se ao valor medicinal deste canabinóide não psicoativo, atribuído à rede de sinalização lipídica interna do organismo humano na qual ele atua, o sistema endocanabinóide, abordado na Secção 1.3.1. Este composto está disponível em cápsulas e óleo, em vários postos de venda em Portugal e outros países europeus e não europeus e o seu consumo está associado ao tratamento de várias condições de saúde. O canabidiol reduz e impede a inflamação e as náuseas, é muito útil no tratamento da esclerose múltipla, desordens de ansiedade, epilepsia e

esquizofrenia porque tem propriedades como antipsicótico, ansiolítico e mesmo como analgésico para a dor neuropática e espasmos musculares (Mechoulam *et al.*, 2002). Também tem sido observado que este composto inibe a proliferação de células cancerígenas (McAllister *et al.*, 2011), comportamento proveniente da sua atividade antioxidante, já descrita anteriormente.

A canábica é uma planta complexa capaz de produzir mais de 480 compostos químicos que representam quase todas as diferentes classes de metabolitos naturais (ElSohly e Slade, 2005). No entanto, até à data, o interesse farmacêutico têm sido principalmente direcionado a compostos canabinóides (mais de 100 isolados) e essencialmente ao THC, ao seu produto de degradação natural canabinol e a três dos principais canabinóides não psicoativos: CBD, canabicromeno e canabigerol (Pollastro *et al.*, 2017). A presente investigação pretende, assim, dar ênfase a novas possibilidades para a medicina canábica, baseadas em compostos não canabinóides, de forma a explorar a totalidade das propriedades farmacológicas desta planta multifacetada e dessa forma, aproveitar toda a matéria prima disponível e evitar qualquer desperdício de material vegetal.

1.8. Problema Biológico e Objetivos Gerais

Cannabis ruderalis representa plantas cuja informação disponível em literatura sobre a sua caracterização e atividade biológica é escassa, comparativamente a *C. sativa* e *C. indica*. Não bastando, o cânhamo, amplamente cultivado em Portugal durante o séc. X, volta a ressurgir na atualidade, como alternativa cultural e medicinal, tornando-se importante a sua descrição, caracterização e exploração de potencial. *C. ruderalis* é uma planta com a capacidade de providenciar soluções valiosas que ajudem a nossa civilização a transformar a sua economia atual numa economia mais natural. Para que se possa criar um ciclo de vida sustentável, uma economia viável deve ser baseada em fontes renováveis, económicas e naturais. Podemos criar um caminho sustentável integrando holisticamente a atividade humana nos ecossistemas que nos mantêm. Assim, o cânhamo providencia uma miríade de utilidades valiosas, incluindo têxteis, geração de energia, papel, materiais de construção, incluindo construção automóvel e outras indústrias, bio-plásticos, comida, cosméticos e não menos importante, uma fonte essencial de compostos bioativos com aplicação na medicina convencional e alternativa, à base de fitoquímicos.

No entanto, uma vez que a máxima atenção desta planta tem sido direcionada a compostos canabinóides e que escassos são os estudos que destacam compostos como os fenólicos, os terpenos ou até as lignanamidas da canábica como alvos de atividade biológica, a presente investigação visa valorizar esta subespécie no âmbito de procurar por novas aplicações, nomeadamente na área da saúde humana, baseadas em compostos essencialmente antioxidantes, provenientes das sementes, caules e

folhas de *C. ruderalis*. Assim, este projeto de investigação propõe-se a explorar a fração de metabolitos secundários solúveis em etanol e água e a atividade biológica *in vitro* e *in vivo* (em organismo modelo, *Saccharomyces cerevisiae*) desta subespécie, pouco relatada em literatura. Para tal, será realizada uma análise química a três extratos, com diferentes solventes (etanol absoluto, etanol a 50% e água), da amostra vegetal, de forma a extrair compostos de diferentes polaridades, para comparação. Posteriormente, as amostras serão avaliadas pelos seus potenciais citotóxicos e protetores (antioxidantes), de forma a comprovar as várias atividades biológicas a estas associadas.

2. Materiais e Métodos

2.1. *C. ruderalis*: obtenção do material vegetal e preparação dos extratos

Para a realização deste projeto de investigação foram selecionadas e utilizadas, como material biológico de estudo, as sementes, folhas e flores de uma planta de espécie *Cannabis ruderalis*, pertencente à variedade Fedora 17 (uma das variedades de cânhamo mais comuns). As sementes, 100% certificadas, foram semeadas em maio de 2018 e as plantas resultantes foram colhidas na colheita de agosto do mesmo ano, num campo de cultivo em Vila Caiz (localidade pertencente ao concelho de Amarante, Porto, Portugal). As amostras foram secas à temperatura ambiente, num local seco e ausente de luz durante cerca de duas semanas e posteriormente, foi realizada uma triagem inicial com diferentes solventes de extração (etanol absoluto, etanol a 50% e água desionizada), na tentativa de avaliar o método mais eficaz para extrair os compostos bioativos antioxidantes.

2.1.1. Extratos Etanólicos

Cerca de 10 g de um extrato bruto da planta de *C. ruderalis* (sementes, folhas e flores) foram triturados com o auxílio de um pilão e almofariz. Posteriormente, a extração com etanol absoluto e com etanol a 50% foram realizadas a partir da mistura de 5 g de material vegetal em 100 mL de etanol absoluto (EtOH100%) e etanol a 50% (EtOH50%), respetivamente. Os frascos foram armazenados à temperatura ambiente e protegidos da luz, durante 7 dias. Seguidamente, a mistura foi filtrada com o auxílio de um filtro de papel. Os solventes foram evaporados, através de um Rotavapor®, a uma temperatura de 40 °C e aproximadamente 50 rpm. Da evaporação dos solventes resultaram os extratos secos aos quais se adicionou água, para posterior liofilização (antes da liofilização as amostras foram armazenadas a – 80 °C, *overnight*). Após liofilização, os extratos de *C. ruderalis* foram novamente dissolvidos em EtOH100% e em EtOH50% (v/v), de forma a obter uma solução *stock* de 50 mg/mL, que foi armazenada a – 20 °C.

2.1.2. Extratos Aquosos

Após secagem da planta, foram triturados com o auxílio de um pilão e almofariz, cerca de 5 g de um extrato bruto que inclui, de igual forma, as sementes, as folhas e as flores de *C. ruderalis*. As várias estruturas da planta foram adicionadas a 100 mL de água desionizada (dH₂O) em ebulição (infusão) e deixadas em repouso à temperatura ambiente, durante 20 min. Posteriormente, a amostra foi filtrada em papel, de forma a remover os resíduos vegetais em excesso. A solução resultante foi armazenada a – 80 °C e subsequentemente, liofilizada. Após liofilização, o extrato de *C. ruderalis* foi novamente dissolvido em água destilada de forma a obter uma solução *stock* de concentração igual a 50 mg/mL, que foi armazenada a – 20 °C.

2.2. Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

2.2.1. Ensaio de DPPH

O método de DPPH é um dos métodos *in vitro* mais frequentemente usados para avaliar o potencial antioxidante de vários compostos naturais, sendo um ensaio rápido, simples e não específico para determinado tipo de substâncias. Os radicais livres são eliminados pelas substâncias antioxidantes da amostra, que agem como doadores de um átomo de H quando é adicionada a solução de DPPH, reduzindo o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}) e proporcionando assim a mudança de coloração na solução, de violeta/ púrpura para amarelo claro. A atividade antioxidante é então medida pelo decréscimo da absorvância, devido à conversão/ redução de DPPH^{*} em difenil-picril-hidrazina (Floegel *et al.*, 2011).

Para a realização deste ensaio preparou-se, inicialmente, a solução stock etanólica de DPPH a 0,04% (p/v, 10× concentrado), dissolvendo 2 mg de DPPH em 5 mL de EtOH100%. Posteriormente, numa placa de 96 poços de fundo plano, foram testadas 3 situações distintas: controlos negativos, sem a adição de extrato (50 µL de solvente (EtOH100%, EtOH50% ou dH₂O) e 100 µL de DPPH), os brancos, sem adição de DPPH (100 µL de solvente e 50 µL de extrato) e as amostras correspondentes aos 3 extratos: extrato etanólico absoluto (EE100%), extrato etanólico a 50% (EE50%) e extrato aquoso (EAq.), em que foram adicionados 50 µL de extrato e 100 µL de DPPH. As concentrações de extrato utilizadas foram 150, 125, 100, 75, 50, 25 e 10 µg/ mL e 175, 150, 125, 100, 75, 50 e 25 µg/mL para os extratos etanólicos e aquoso, respetivamente, sendo que para cada condição foram realizadas 3 réplicas.

Após incubação da reação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante o período de 20 min, foram realizadas as leituras a uma absorvância de 517 nm, no leitor de microplacas.

A percentagem de inibição de cada amostra foi calculada a partir da equação:

$$\% \text{ inibição}_{\text{Amostra}} = \frac{100 \times (\text{Abs}_{517\text{Controlo}} - \text{Abs}_{517\text{Amostra}})}{\text{Abs}_{517\text{Controlo}}$$

Onde $\text{Abs}_{517\text{Controlo}}$ corresponde ao valor médio de absorvância dos controlos e $\text{Abs}_{517\text{Amostra}}$ corresponde ao valor de absorvância das amostras.

A capacidade antioxidante foi então expressa como média de três réplicas independentes \pm DP, através de valores de IC₅₀, que é uma medida quantitativa que indica a concentração necessária dos extratos de *C. ruderalis* para atingir 50% de inibição dos radicais de DPPH^{*}. Os valores obtidos foram comparados com os valores de IC₅₀ resultantes para o padrão utilizado, ácido gálico (AG), um poderoso antioxidante natural.

2.2.2. Ensaio de Sequestro do Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO), uma molécula com importante função na sinalização celular, é produzido a partir da L-arginina numa reação catalisada pela óxido nítrico sintase. Este composto é um radical livre difusível, que desempenha o papel de molécula efetora em diversos sistemas biológicos, incluindo resposta imunológica, vasodilatação, mensageiro neuronal e atividade antimicrobiana e antitumoral (Dusse *et al.*, 2003; Balakrishnan *et al.*, 2009). No entanto, o NO comporta-se como um radical livre altamente reativo em vários processos celulares, sendo oxidado em segundos na presença de O₂, podendo consequentemente danificar biomoléculas, como os lípidos celulares.

Na presente investigação, a atividade de eliminação de NO foi estimada pelo uso da reação de Griess que se baseia na incubação dos extratos em estudo com um dador de óxido nítrico, que neste caso é o composto nitroprussiato de sódio (SNP). Sob condições aeróbicas, o NO reage com o O₂ para produzir produtos estáveis como o nitrato e o nitrito. A produção destes compostos é monitorizada através do reagente Griess, que proporciona uma coloração rosa na solução, detetável na banda do espectro de 546 nm (Tsikas, 2007).

A atividade sequestradora de NO foi então avaliada utilizando diferentes concentrações para os diferentes extratos: EE100% - 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL; EE50% - 500, 600, 700, 800 e 900 µg/mL e EAq.: 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000 µg/mL. A solução de SNP (10 mM) foi diluída em tampão fosfato (0,1 M, pH 7) e adicionada, a cada poço de uma placa de 96 poços de fundo plano, para incubação, à luz, por 140 minutos, na presença e na ausência de cada extrato.

Após o período de incubação, 50 µL do reagente Griess (sulfanilamida a 1% dissolvido em ácido fosfórico a 5% + dicloridrato de nfiletilenodiamina ediamina a 0,1% dissolvido em H₂O ultrapura) foram adicionados às amostras e aos controlos das amostras (Griess e respetivos solventes, em substituição das amostras). Os brancos continham ácido fosfórico a 2,5%, em substituição do reagente Griess.

Após incubação da reação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante o período de 10 min, foram realizadas as leituras a uma absorvância de 546 nm, no leitor de microplacas.

A percentagem de inibição foi calculada a partir da equação:

$$\% \text{ inibição}_{\text{Amostra}} = \frac{100 \times (Abs_{546\text{Controlo}} - Abs_{546\text{Amostra}})}{Abs_{546\text{Controlo}}}$$

Onde $Abs_{546\text{Controlo}}$ corresponde ao valor médio de absorvância dos controlos e $Abs_{546\text{Amostra}}$ corresponde ao valor de absorvância das amostras. O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como controlo positivo às concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL.

A capacidade antioxidante foi então expressa como média de três réplicas independentes ± DP, através de valores de IC50, que é uma medida quantitativa que indica a concentração necessária dos

extratos de *C. ruderalis* para atingir 50% de inibição dos radicais de NO. Os valores obtidos foram comparados com os valores de IC50 resultantes para o padrão utilizado, ácido ascórbico, um poderoso antioxidante natural.

2.3. Avaliação do Conteúdo Total de Polifenóis – Método de Folin-Ciocalteu

A concentração de compostos fenólicos nos extratos vegetais de *C. ruderalis* foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Lee, *et al.* 2014; Singleton *et al.*, 1999). O método baseia-se na reação de compostos fenólicos com um reagente colorimétrico, sendo caracterizado pela transferência de elétrons em meio alcalino, das substâncias redutoras/ fenólicas de determinada amostra para complexos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico para formar complexos azuis que podem ser detetados por espectrofotometria ultravioleta-visível na banda dos 760 nm (Ainsworth e Gillespie, 2007).

Para a realização deste ensaio, as soluções stock dos extratos (50 mg/mL) foram diluídas de forma a obter uma concentração de 3 mg/mL. A mistura reacional foi preparada a partir de 10 µL de extrato, 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu dissolvido em dH₂O numa proporção de 1:10 (10 % (p/v)) e 40 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5 % (p/v). O branco foi concomitantemente preparado, contendo 90 µL de dH₂O e 10 µL de extrato. Foi também realizado o controlo negativo a partir de 10 µL de solvente, 50 µL de Folin-C e 40 µL de Na₂CO₃.

As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante o período de 1 h. A absorbância foi determinada usando um espectrofotómetro num $\lambda = 760$ nm. As amostras foram preparadas em triplicado para cada análise e o valor médio de absorbância foi obtido. O mesmo procedimento foi repetido para a solução padrão de AG, permitindo assim a obtenção da reta de calibração que foi alcançada através da relação entre os valores de absorvância e os valores de concentração testados para o padrão: 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 50 µg/mL.

Os valores de concentração de fenólicos foram obtidos através da absorvância de cada amostra e dos valores de interseção e respetivo declive da reta de calibração. O conteúdo de fenólicos nos extratos foi expresso em termos de equivalentes de ácido gálico (mg de AG/ g de extrato).

2.4. Análise Química

As amostras de EE100%, EE50% e EAq. foram preparadas para análise a partir de extrato seco dissolvido em 30% metanol (v/v), de modo a obter uma concentração final de 100 ppm. EE100%, EE50% e EAq. foram analisados por Espectrometria de Massa de Ionização por Electropulverização (ESI-MS/MS) a partir de uma infusão direta no espectrómetro com sistema de captura de iões linear Thermo LXQ (*Thermo LXQ Linear Ion Trap MS/MS*), equipado com uma bomba de seringa, taxa de fluxo de 5 µL/min

e vácuo sob 5×10^{-5} torr. As análises foram monitorizadas tanto no ião seletivo negativo como no ião seletivo positivo [M-H] e [M+H], respectivamente. Dados espectrais de massa [M-H] / [M+H] – (m/z) foram obtidos para cada extrato para posterior identificação experimental dos compostos presentes nos extratos por comparação com a literatura. O software utilizado na análise química foi o software Xcalibur™, operado no modo *Full Scan*.

2.5. Estirpe de Levedura, Meio e Condições de Crescimento

Para os ensaios de viabilidade celular foi utilizado como modelo biológico a estirpe *wild-type* (*wt*) de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e duas estirpes derivadas, uma mutada no fator de transcrição YAP1 e outra no grupo de enzimas da glutathione peroxidase (Gpx1, Gpx2 e Gpx3). Todas as linhagens utilizadas e respectivos genótipos são mostrados na Tabela 5. A estirpe mutada em Yap1 não possui o gene que codifica o fator de transcrição (FT) YAP1, um FT básico do zíper de leucina envolvido na resposta ao stress oxidativo e homeostase *redox*, levando a um bloqueio na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes (Delaunay *et al.*, 2000). De forma semelhante, a mutação em Gpx leva a uma inibição na atividade da peroxidase, cuja principal função bioquímica é oxidar substratos orgânicos tendo o H₂O₂ como molécula aceitadora de elétrons (Mulgund *et al.*, 2015).

Tabela 5 – Estirpes de levedura e respectivos genótipos.

Estirpe	Genótipo	Referência
BY4741	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
yap1	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
gpx1/2/3	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gpx1::URA3 gpx2::His3MX6 gpx3::kanMX6</i>	Avery e Avery, 2001

As culturas *stock* foram desenvolvidas em meio sólido YPDA (extrato de levedura 1% (p/v) BD Bacto™, peptona 2% (p/v) BD Bacto™, glucose 2% (p/v) e agar 2%), incubadas a 30 °C, durante 2 dias e mantidas a 4 °C, durante 1 semana. A partir dessas culturas, foram preparados pré-inóculos em 5 mL de meio líquido YPD (extrato de levedura 1% (p/v) BD Bacto™, peptona 2% (p/v) BD Bacto™ e glucose 2% (p/v)), a partir de colônias isoladas de levedura. As culturas foram mantidas num agitador orbital, a 30°C e 200 rpm, durante a noite e o crescimento das mesmas foi monitorizado pela medição da densidade ótica a 600 nm (D.O.₆₀₀) para garantir, posteriormente, uma densidade celular entre 0,4 - 0,8, de forma a que as células se encontrem na fase exponencial de crescimento para os ensaios realizados em 2.6.

2.6. Ensaio de Viabilidade Celular

2.6.1. Spot Assay com *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

Após a incubação *overnight*, a proliferação celular foi medida através da leitura de D.O.₆₀₀ sendo que, posteriormente a cultura foi diluída com meio fresco, de forma a atingir uma D.O.₆₀₀ \approx 0,1 para um volume de 5 mL. A cultura foi mantida num agitador orbital, durante 4 h, a 30°C e 200 rpm, a fim de obter uma D.O.₆₀₀ entre 0,4 - 0,8 de forma a garantir que as células se encontravam na fase exponencial de crescimento.

Numa tentativa de avaliar a capacidade antioxidante do EE50% de *C. ruderalis* em cultura de *S. cerevisiae* BY4741, foram então testadas as concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 75; 100; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e criadas 3 situações de controlo: controlo negativo contendo o solvente (EtOH50%); controlo positivo contendo o solvente e 4 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicado.

Assim, após medição da D.O.₆₀₀, foram preparadas todas as condições em meio líquido YPD (adição de reagentes ao meio de cultura antes da inoculação), sendo que posteriormente foram transferidos 100 μl de cada amostra para tubos *ependorf* contendo 900 μl de dH₂O esterilizada. Para cada amostra, foi efetuada uma série de 4 diluições seriadas (no intervalo de 10⁻¹ a 10⁻⁴).

5 μL de cada volume diluído foram colocados em placas YPDA. As células foram incubadas, a 30°C e 200 rpm e por 60 minutos foram colhidas amostras a cada 15 minutos. Por fim, as culturas foram incubadas a 30 °C, durante 2 dias e posteriormente foram fotografadas, com recurso a um ChemiDoc™ XRS. O mesmo procedimento foi realizado para testar as concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do EE50%.

2.6.2. Spot Assay com a Estirpe Selvagem BY4741, Mutante *yap1* e Mutante *gpx1/2/3*

De forma muito semelhante, as culturas das estirpes BY4741, *yap1* e *gpx1/2/3* foram preparadas segundo o procedimento acima descrito e monitorizadas de forma a obter uma D.O.₆₀₀ entre 0,4 - 0,8, no entanto, para este ensaio, os compostos ou extratos a serem testados foram incorporados no meio antes da solidificação.

Para este ensaio foram testadas, as concentrações de 10, 50, 75, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do EE50% e criadas, de igual forma as 3 situações de controlo: controlo negativo, em que as células são apenas incubadas em YPDA; controlo positivo contendo 0,5 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicada.

Assim, após medição da D.O.₆₀₀, foram transferidos 100 μl de cada amostra para tubos *ependorf* contendo 900 μl de dH₂O esterilizada, sendo que para cada amostra, foi efetuada uma série de 4

diluições seriadas (no intervalo de 10^{-1} a 10^{-4}). 5 μ L de cada volume diluído foram colocados em placas YPDA. Por fim, as culturas foram incubadas a 30 °C, durante 2 dias e posteriormente foram fotografadas, com recurso a um ChemiDoc™ XRS.

2.7. Análise Estatística

Os resultados foram tratados e analisados a partir do programa de cálculo *Microsoft Excel*. Salvo indicação contrária, os ensaios foram realizados em triplicado como réplicas independentes e estão apresentados através de um modelo representativo ou como média \pm desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise química por ESI-MS e ESI-MS/MS levou à identificação de compostos canabinóides e não canabinóides

A composição química do EE100%, EE50% e EAq. de *C. ruderalis* foi analisada por ESI-MS e ESI-MS/MS, uma tecnologia relacionada que permite a obtenção de informação estrutural adicional, facilitando a identificação de moléculas e a sua associação às propriedades biológicas atribuídas à planta. Uma análise química dos sinais espectrais de massa $[M-H]^- / [M+H]^+ - (m/z)$, baseada na comparação com a literatura disponível, conduziram à identificação de 9 compostos nos extratos de *C. ruderalis*, com base nos pesos moleculares correspondentes dos compostos ou fragmentos derivados (Tabela 6). Ao longo do tempo, uma enorme variedade de constituintes químicos que compõe as mais diversas classes de metabolitos naturais que incluem desde terpenos a compostos fenólicos, hidrocarbonetos, ácidos gordos, ésteres, compostos nitrogenados e canabinóides, seguidos das suas formas descarboxiladas (Borille, 2016) foram sendo identificados no género *Cannabis*. Estes, distribuem-se ao longo do espectro em função da sua estrutura química e conseqüentemente, do seu peso molecular. Contudo, as alterações químicas das várias moléculas não podem ser generalizadas a todas as variedades da planta, pelo que a limitação de informação incidente em análise de perfis metabólicos da subespécie em estudo dificultou a identificação de vários dos compostos, essencialmente não canabinóides, observados para os diferentes extratos.

As análises baseadas nos espectros dos diferentes extratos de *C. ruderalis* (apresentados no Anexo 1), revelaram 31 sinais únicos, aquando aplicada ionização positiva $[M+H]^+$. Conforme indicado na Tabela 6, o composto arginina e respetivo isómero foram identificados nos extratos EE50% e EAq., exibindo iões protonados em m/z 175 (grupo α -amina e grupo ácido α -carboxílico, separados por uma cadeia lateral linear alifática). Segundo a literatura, este aminoácido básico natural, precursor do óxido nítrico, está presente nas sementes de cânhamo em níveis elevados (Callaway, 2004). O pico base apresentado pelos três extratos, com m/z 274 não foi identificado, contudo estudos de ressonância magnética nuclear descrevem a sua estrutura como contendo uma amina, um metileno ligado a um oxigénio e dois metilenos ligados a um azoto (Cambio *et al.*, 2011). A perda de um grupo H_2O gerou um composto derivado que revelou fragmentos protonados em m/z 256, identificado como hexadecanamida (C16-CONH₂), uma amida primária de ácido gordo proveniente do ácido palmítico. Esta molécula, já reportada em *C. sativa* L, tem a capacidade de se comportar como agonista de endocanabinóides como AEA, competindo pela ligação ao local ativo dos recetores CB1 e CB2. Este comportamento desencadeia um aumento na concentração endógena dos canabinóides, resultando numa potenciação da atividade

Tabela 6 - Identificação provisória de alguns dos compostos presentes em EE100%, EE50% e EAq. de *C. ruderalis*, de acordo com o espectro de massa no Anexo 1 obtido por ESI/MS e ESI-MS/MS, com base em valores de m/z já reportados em literatura.

Pico	Extrato	Fórmula molecular	[M+H]⁺ (m/z)	[M-H]⁻ (m/z)	MSⁿ (m/z)	Identificação provisória
1	EE50% EAq	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175	-	-	Arginina L-arginina
2	EE100%	C ₁₆ H ₃₃ NO	256	-	-	Hexadecanamida Palmitamida
3	EE50% EAq.	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	304	-	MS ³ : 286	Delfinidina
4	EE100% EE50%	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315	-	MS ³ : 259	THC CBD
5	EE100% EE50%	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	318	-	-	Canabigerol
6	EE50%	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	329	327	MS ² : 312, 309	CBDHQ (HU-331)
7	EE100% EE50%	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	-	343	-	11-Nor-delta-9-thc-9-aldeído
8	EE100% EE50%	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	359	357	MS ³ : 341, 219	CBDA Δ ⁹ -THCA
9	EE50%	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	-	373	MS ³ : 329	Éter monometílico do ácido canabigerólico

dos mesmos (efeito entourage). Assim, a sua natureza bioativa torna-a num alvo promissor no tratamento de várias condições como cancro, doenças cardiovasculares, inflamação, dor, distúrbios alimentares e ansiedade (Farrell e Merkler, 2008). Por último, em m/z 304 foi identificada a delfinidina, uma antocianidina hidrofílica encontrada normalmente em várias espécies vegetais pigmentadas, com potencial atividade antioxidante associada. Delfinidina demonstrou proteger queratinócitos HaCaT humanos e a pele de camundongos contra o stress oxidativo medido por UVB e a apoptose (Afaq *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao modo de ionização negativa, as análises espectrais de massa revelaram 33 sinais, correspondentes apenas aos extratos EE100% e EE50%, uma vez que por limitação da funcionalidade do equipamento utilizado, não foi possível determinar o espectro de [M-H]⁻ do EEAq.

Assim, os sinais espectrais com maior intensidade foram atribuídos a m/z 136, 159, 201 e 357 para EE100% e 225, 327 e 357 para EE50%. O valor de m/z comum (357), com íões fragmento em m/z 341 e 219, indicou a presença de compostos com fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_4$, que pode ser atribuída tanto a CBDA como a THCA (CBD e THC nas suas formas de ácidos C3-carboxílicos). Contudo, sendo *C. ruderalis* uma espécie associada a uma percentagem de THC muito reduzida, é possível que a abundância relativa observada no espectro deste composto esteja mais relacionada com a presença de CBD, o que não retira a possibilidade de a amostra conter THC em quantidades residuais. O 11-Nor-delta-9-thc-9-aldeído foi identificado com m/z 343, que é basicamente a molécula de delta(9)-tetrahydrocannabinol carboxilada (COOH-THC). O sinal em 315 $[M+H]^+$ deriva então da fragmentação dos ácidos canabinóides (CBDA e THCA) que após perda da fração carboxílica da molécula, geram CBD e THC. Estes dois compostos foram já relatados como potentes antioxidantes contra danos oxidativos por H_2O_2 . Hampson *et al.* (1998) demonstraram que o CBD é um antioxidante mais poderoso que ascorbato e α -tocoferol, em sistemas químicos e em culturas neuronais, indicando efeitos citoprotetores adicionais para além das suas propriedades antioxidantes. Porém, os efeitos pró-oxidantes de CBD foram também já descritos em várias células imunes (por exemplo, linfócitos), evidenciando o seu comportamento indutor de apoptose (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Sugere-se que o efeito apoptótico do CBD esteja diretamente à produção de ROS e conseqüentemente, à condição de stress oxidativo a que as células ficam sujeitas. Associado a este composto é revelado um sinal em m/z 327 (com íões fragmento principais associados a m/z 312 e 309), correspondente a uma quinona produzida a partir de CBD por oxidação durante a exposição ao O_2 , identificada como CBDHQ e postulada como o metabolito reativo de curta duração de CBD. No entanto, estudos demonstraram a sua atividade como anti-angiogénico e inibidor seletivo da topoisomerase II, o que o torna um alvo terapêutico anti-tumoral de elevado interesse (Ujváry e Hanuš, 2016).

Em $[M+H]^+$ m/z 318 e $[M-H]^-$ m/z 373 foram identificados os compostos CBG e éter monometílico do ácido canabigerólico, respetivamente. O CBG, um canabinóide monoterpénico, é então a forma neutra do CBGA não identificado (ausência do grupo $-COOH$), que por sua vez, é precursor do éter monometílico do ácido canabigerólico por adição de $-CH_3$. O CBG é considerado um constituinte menor em *Cannabis sativa* L., contudo foi verificado em dois dos extratos de *C. ruderalis* (EE100% e EAq.). Porém, outros fitocannabinóides, cuja presença é marcada em praticamente todas as variedades da planta estudadas até à atualidade como são exemplo o CBNA, CBCA, CBLA e CBND, não foram identificados no modelo biológico em estudo. O mesmo se aplica para a ampla gama de compostos terpenicos e fenólicos normalmente associados a este género. Isto sugere que *C. ruderalis* apresenta uma fitoquímica única,

com vários compostos não identificados até à data e que podem representar marcadores quimiotaxonómicos específicos, bioquimicamente significativos para a aceitação desta variedade como um espécie única e promissora de uma ampla gama de aplicações biológicas. Um estudo intensivo do espectro de *C. ruderalis* deve ser feito com recurso a outros métodos que permitam ultrapassar as dificuldades encontradas na identificação destes compostos por ESI-MS/MS. Assim, sugere-se a aplicação de técnicas como a LC-MS e GC-MS, para identificação de compostos voláteis de que são exemplo os terpenóides.

3.2. EE100%, EE50% e EAq. de *C. ruderalis* demonstram atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante de um substrato pode ser medida através da capacidade do mesmo em intercalar radicais livres através de métodos de sequestro. Desta forma, numa tentativa de analisar a capacidade antioxidante dos três extratos de *C. ruderalis* (EE100%, EE50% e EAq.), realizaram-se dois ensaios colorimétricos (DPPH e sequestro do NO), que consistem na medida de redução dos radicais DPPH[•] e NO[•]. Os resultados foram expressos através dos valores de IC50 (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação da atividade antioxidante, *in vitro*, dos extratos EE100%, EE50% e EAq. de *C. ruderalis*. As atividades de eliminação de DPPH e NO foram lidas através dos valores de percentagem (%) de redução do DPPH e de inibição da produção de nitrito, respetivamente. Os resultados foram expressos através dos valores de IC50 (µg/mL). Os padrões incluem o ácido gálico (ensaio de DPPH) e o ácido ascórbico (ensaio de eliminação de NO). Os dados são apresentados como média de três réplicas independentes ± DP.

	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	Sequestro NO IC ₅₀ (µg/mL)
EE100%	-	121,64 ± 44,75
EE50%	82,24 ± 7,85	753,90 ± 32,53
EAq.	96,60 ± 6,36	1590,79 ± 42,19
Padrão (AG/AA)	0,48 ± 0,09	9,35 ± 1,63

Os resultados da avaliação antioxidante revelam que os extratos EE50% e EAq. de *C. ruderalis* apresentam maior capacidade de eliminação dos radicais de DPPH (IC50 = 82,24 ± 7,85 µg/mL e IC50 = 96,60 ± 6,36 µg/mL, respetivamente), comparativamente ao EE100% (cujo valor de IC50 não foi possível de alcançar, provavelmente devido a falhas experimentais), sugerindo que estes demonstram maior atividade antioxidante, através da sua capacidade de doação de H. No entanto, os extratos testados apresentaram baixa atividade de eliminação de DPPH em relação ao padrão utilizado (IC50 = 0,48 ± 0,09 µg/mL), ácido gálico, um poderoso antioxidante natural. Antes do processo de liofilização dos extratos, foram realizados alguns ensaios teste (n=3) com os extratos na sua forma não liofilizada. Curiosamente, os resultados demonstraram elevada capacidade antioxidante para o extrato etanólico a

50% ($IC_{50} = 20,81 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$) e um valor de $IC_{50} = 110,01 \pm 14,90 \mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico absoluto. O mesmo vai de acordo com a literatura, em que vários autores sugerem atividade antioxidante para o extrato etanólico absoluto de *C. sativa* L. (Ahmed *et al.*, 2019; Hong *et al.*, 2015). A liofilização é uma tecnologia que se baseia na remoção da água de uma determinada amostra, através do processo de sublimação, a pressão reduzida. A água passa do seu estado sólido para o gasoso a temperaturas reduzidas e na ausência de oxigênio, fatores normalmente muito favoráveis para a preservação das características fitoquímicas de extratos vegetais. No entanto, a *Cannabis* apresenta uma gama de compostos voláteis que podem ter sido perdidos aquando a aplicação da técnica. Compostos como α -pineno, β -mirceno, limoneno, 4-careno, trans-3(10)-careno-2-ol, cariofileno, β -humuleno, azuleno, gurjuneno, ledeno e óxido de cariofileno foram já identificados entre componentes voláteis de várias amostras de *Cannabis* (Arnoldi *et al.*, 2017). Maior parte destes compostos são terpénicos, aos quais estão associados, entre muitas outras propriedades, a atividade antioxidante, que por sua vez está diretamente relacionada com os valores de IC_{50} obtidos no presente estudo. Este fator pode também justificar a limitação na identificação de compostos pertencentes a esta classe, na análise química dos espectros dos vários extratos de *C. ruderalis*.

A extração dos metabolitos secundários, que caracterizam a capacidade antioxidante da amostra, depende muito da natureza química dos compostos-alvo, do método de extração, da polaridade do solvente utilizado e da composição da mesma. Assim, da mesma forma que a técnica de extração é fundamental para obter os metabolitos alvo, também diferentes solventes vão possibilitar a extração de diferentes compostos. Drinić *et al.* (2018) determinaram o impacto de diferentes solventes na atividade antioxidante de extratos de *C. sativa* L., obtidos de material herbáceo jovem e maduro e verificaram, de igual forma, que o extrato obtido com etanol a 50% apresenta maior atividade antioxidante para as duas amostras de cânhamo ($EC_{50} = 0,1331$ e $EC_{50} = 0,2055$, para cânhamo jovem e maduro, respetivamente), comparativamente a outras misturas EtOH:H₂O. De notar que, os valores de inibição do radical diminuem na ordem EtOH50% > EtOH30% > EtOH70% > dH₂O > EtOH90%, para o extrato maduro de *C. sativa* obtido através das partes aéreas da planta, o que vai de acordo com os resultados obtidos na presente investigação.

Outros estudos foram conduzidos em estimativas qualitativas e quantitativas de extratos vegetais para identificar a relação entre o solvente de extração com a atividade antioxidante. Diferentes solventes com diferentes níveis de polaridade foram selecionados para extrair o material vegetal bruto de *Citrullus colocynthis* (folhas e raízes) e *C. sativa* L. (folhas). Esta extração comparativa demonstrou que, entre os solventes à base de polaridade, o uso de EtOH100% resultou numa maior capacidade de eliminação dos

radicais de DPPH (% Inibição = $54,1 \pm 0,2$), enquanto que o uso de dH_2O , em substituição de solvente orgânico, demonstrou uma capacidade antioxidante inferior (% Inibição = $34,2 \pm 1,1$) (Ahmed *et al.*, 2019). Esta discordância entre os resultados obtidos no presente estudo e os demonstrados por Ahmed podem estar relacionados com os métodos de extração dos compostos em meio aquoso. Isto porque, na presente investigação, o extrato aquoso foi obtido por infusão, enquanto que as amostras de Ahmed foram extraídas à temperatura ambiente. Estudos sugerem que o uso da temperatura pode ser favorável à extração de compostos fenólicos. O calor pode tornar as paredes celulares permeáveis, diluir e dissolver os compostos a serem extraídos e diminuir a viscosidade do solvente, facilitando assim a extração (Barbosa *et al.*, 2016). Contudo, deve tomar-se atenção aos compostos terpênicos existentes nas amostras, que a elevadas temperaturas podem ser perdidos e contribuir para uma diminuição da capacidade antioxidante dos extratos em estudo.

O material vegetal usado para a preparação do extrato também pode influenciar a atividade de remoção do DPPH. Moccia *et al.* (2019) reportaram percentagens de inibição de radicais de DPPH variáveis no que diz respeito a extratos obtidos a partir de sementes, farinha e óleo de *C. sativa* L (% Inibição_{semente} = 922 ± 43 ; % Inibição_{farinha} = 1709 ± 75 ; % Inibição_{óleo} = 192 ± 13), o que está de acordo com os resultados demonstrados por Siano *et al.* (2018) (% Inibição_{semente} = $51,5$; % Inibição_{farinha} = $46,8$; % Inibição_{óleo} = $8,2$). Então, verifica-se que a inclusão de outras partes da planta no extrato, pode proporcionar uma maior/menor atividade de eliminação de DPPH, devido à presença/ausência de determinados compostos.

No que respeita às plantas de canábis, o tempo de colheita é também um fator determinante para a atividade antioxidante demonstrada pela planta, uma vez que, como dito anteriormente, uma maturação tardia vai favorecer a acumulação de canabinóides, que são formados pela condensação de precursores de terpenos e fenóis (Drinić *et al.*, 2018). Pela análise dos espectros apresentados no Anexo 1 para os diferentes extratos de *C. ruderalis* verifica-se que há uma distribuição relativamente homogênea dos compostos ao longo do eixo correspondente à massa molecular, sendo que as diferentes classes são atribuídas a determinadas gamas de massa (relação não linear), como por exemplo: terpenos – 100 a 250 Da; ácidos gordos – 250 a 300 Da; fenólicos – 150 a 300 Da; principais canabinóides – 300 a 500 Da. Contudo, uma vez que não foi possível verificar uma gama variada de compostos como terpenos e fenólicos existentes na amostra, não se pode retirar uma ideia conclusiva sobre a correlação da presença destes compostos com a atividade antioxidante observada. Tal se pode justificar pela escolha do solvente utilizado e/ou pelas técnicas de análise selecionadas.

Curiosamente, no que respeita ao ensaio de sequestro de NO, o EE100% foi o que induziu 50% de inibição da produção de nitrito a concentrações mais baixas (IC50 = 121,64 ± 44,75 µg/mL), seguindo-se o EE50% (IC50 = 753,90 ± 32,53 µg/mL) e, por último, o EAq. que revelou um valor de IC50 = 1590,79 ± 42,19 µg/mL. Apesar dos recentes estudos aprofundados, a caracterização dos compostos antioxidantes ainda é fragmentária, pelo que em literatura é também escassa a informação disponível sobre a capacidade de captação dos radicais de NO por parte dos componentes fitoquímicos da planta. Notavelmente, está em falta uma caracterização mais abrangente dos extratos de *Cannabis*, quando à sua capacidade antioxidante. No entanto, Eshwarappa *et al.* (2015), concluiu que o extrato orgânico (metanol) de *Ficus glomerata*, uma planta pertencente à família Moraceae (uma das famílias filogeneticamente mais próximas da *Cannabis*) apresenta maior atividade de eliminação de óxido nítrico (IC50 = 163,37 ± 04 µg/mL), quando comparado ao extrato aquoso (IC50 = 172,37 ± 02 µg/mL), o que vai de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Sendo o óxido nítrico uma molécula reativa que causa citotoxicidade severa nas células vivas, a sua remoção torna-se de primordial importância na terapia antioxidante. Assim, os resultados obtidos no presente estudo são sugestivos de que, particularmente, o extrato etanólico absoluto tem um efeito perceptível na eliminação destes radicais, que pode estar relacionado com a presença de alguns constituintes da amostra, não identificados.

3.3. EE50% demonstrou maior teor de fenólicos comparativamente a EE100% e EAq.

Diversas atividades biológicas atribuídas a extratos vegetais, particularmente a atividade antioxidante e eliminação de radicais livres, bem como a capacidade antimicrobiana e anticancerígena, devem-se à presença de misturas complexas que incluem compostos fenólicos e flavonoides. Os fenóis, principalmente, são compostos biologicamente ativos, potentes antioxidantes com comportamento de eliminação de radicais livres (Rashidi *et al.*, 2016). Considerando os benefícios associados a dieta com base polifenólica, as plantas medicinais e aromáticas surgem como uma fonte promissora desse grupo de fitoquímicos (Gupta e Sharma, 2006). Assim, na tentativa de avaliar o conteúdo fenólico total dos extratos de *C. ruderalis*, realizou-se um ensaio colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, em que as substâncias redutoras/ fenólicas da amostra, em pH alcalino (Na₂CO₃), reduzem o Folin e formam um óxido de coloração azul, detetável na banda do espectro de 760 nm. O teor de substâncias redutoras foi expresso em equivalentes de padrão por massa de extrato (mg/g), sendo que o padrão utilizado foi o ácido gálico (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação do conteúdo fenólico total, *in vitro*, dos extratos EE100%, EE50% e EAq. de *C. ruderalis*. O teor de substâncias fenólicas foi expresso em equivalentes de padrão por massa de extrato (mg/g), sendo que o padrão utilizado foi o ácido gálico. Os dados são apresentados como média de três réplicas independentes \pm DP.

Amostras	GAE* (mg/g extrato)
EE100%	59,24 \pm 10,13
EE50%	68,89 \pm 1,21
EAq.	39,26 \pm 0,47

*GAE – Equivalentes de Ácido Gálico

O conteúdo fenólico total entre os vários extratos que incluem as sementes e as partes aéreas de floração de *C. ruderalis* (folhas e flores) não foi muito variável. Os teores fenólicos máximo e mínimo foram registrados por EtOH50% e dH₂O (68,89 \pm 1,21 GAE/g de extrato e 39,26 \pm 0,47 GAE/g de extrato, respectivamente), enquanto o EE100% resultou num total de polifenóis de 59,24 \pm 10,13 GAE/g de extrato. Curiosamente, Ahmed *et al.* (2019) relatam um teor de polifenóis superior para o extrato aquoso (29,98 \pm 0,56 GAE/g de extrato) comparativamente ao extrato etanólico (2,70 \pm 0,109 GAE/g de extrato), sendo que os extratos foram obtidos a partir de folhas de *C. sativa*. O teor reduzido de polifenóis verificado para o extrato etanólico pode ser facilmente compreendido através da percepção da influência do conteúdo da planta utilizado para a obtenção dos extratos. Assim, verificamos que há diferenças na medida em que, no presente estudo os extratos incluem as sementes e as partes aéreas de floração (folhas e flores) de *C. ruderalis*, enquanto que na investigação de Ahmed são apenas utilizadas as folhas. Vários estudos sugerem que a atividade antioxidante atribuída à planta deriva da excelente estabilidade oxidativa (maior resistência à oxidação) por parte das sementes de cânhamo industriais, concebida pela presença de compostos fenólicos que atuam como agentes antioxidantes. Por exemplo, Smeriglio *et al.* (2016) determinou um total de fenóis equivalente a 267,5 \pm 8,84 GAE/g de extrato para óleo de semente de cânhamo da variedade Finola, enquanto que Siano *et al.* (2018) verificaram um teor de fenóis de 767 \pm 41 GAE/g de extrato para sementes de cânhamo da variedade Fedora. De notar que, há um notório aumento no teor destes compostos aquando avaliados extratos de sementes, comparativamente a partes aéreas ou somente folhas de cânhamo.

Em jeito de conclusão, o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante de *C. sativa* foram já correlacionados por vários autores (Djeridane *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Šeruga *et al.*, 2011), no entanto há flutuações entre as duas variáveis, que podem ser comprovadas pelos resultados obtidos no presente estudo. Em 3.2. verificou-se uma atividade antioxidante não mensurável para o extrato EE100% no ensaio de DPPH, enquanto que o seu teor fenólico não difere muito do observado para EE50% e EAq.

Desta forma, conclui-se que a atividade antioxidante não depende integralmente do teor fenólico total da amostra, uma vez que compostos como os terpenóides, canabinóides e outros, estão também associados à captação de radicais livres. No entanto, Drinić *et al.* (2018) demonstraram um coeficiente de determinação de 0,7, indicador que as duas variáveis estão bem correlacionadas. Fenóis e flavonoides são portadores de atividade antioxidante, sendo que esta atividade está diretamente relacionada com as suas propriedades *redox*, uma vez que estes agem como doadores de hidrogénio e inibidores de oxigénio singlete (Djeridane *et al.*, 2006). A flutuação entre as variáveis compostos fenólicos e atividade antioxidante pode ser atribuída a uma série complexa de fatores bióticos e abióticos que incluem a variedade da planta, condições climáticas e do solo, sazonalidade, bem como a diferentes técnicas de extração (solventes, temperatura, tempo de extração, etc.).

3.4. O extrato etanólico a 50% de *C. ruderalis* não é citotóxico em *S. cerevisiae* (wt) no entanto, potencia a atividade do H₂O₂

Os ensaios de viabilidade foram executados conforme descrito na secção 2.6.1. para avaliar os efeitos do EE50% em resposta ao stress oxidativo induzido por H₂O₂, em *S. cerevisiae* BY7471. O H₂O₂ é um modelo oxidante bem estabelecido em células de levedura, devido à facilidade que apresenta em difundir-se facilmente através das membranas celulares e chegar a locais distantes dos seus principais locais de produção. Esta espécie metastável pode originar facilmente radicais superóxido relativamente instáveis (O₂^{•-}), bem como radicais hidroxilo (OH[•]), considerados as espécies de oxigénio mais reativas (PubChem). Vários estudos demonstram que o stress oxidativo induzido por oxidantes químicos como o H₂O₂, pode levar a danos nas células e conseqüentemente, à morte celular (Jamieson, 1998; França *et al.*, 2017). Além disso, o H₂O₂ é um metabolito de oxigénio natural no metabolismo aeróbico de células e tecidos, pelo que se torna adequado para um estudo em organismos biológicos. Testando este composto oxidante em meios de cultura de *S. cerevisiae* é possível formular uma hipótese sobre a capacidade protetora do EE50% de *C. ruderalis*, que se traduz na sobrevivência das colónias.

Assim, no presente ensaio, foram testadas, as concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 75; 100; 500 e 1000 µg/mL, e criadas 3 situações de controlo: controlo negativo contendo o solvente (EtOH50%) e dH₂O; controlo positivo contendo o solvente e 4 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo dH₂O e extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicado (Figura 4). Foram retiradas alíquotas da cultura para diluições em série até 10⁻⁴ e pequenas gotas foram colocadas no meio YPDA, previamente preparado. As células foram incubadas, a 30°C e 200 rpm, por 60 minutos de forma

a criar réplicas das amostras a cada 15 minutos. Por fim, as placas foram incubadas durante 2 dias a 30 °C, para avaliar os efeitos do extrato na perda de viabilidade induzida pelo H₂O₂.

Analisando o ensaio às concentrações testadas, verifica-se que a viabilidade observada no controlo negativo (Fig. 4A, 4G e 4M) não apresenta diferenças consideráveis comparativamente ao controlo de extrato (Fig. 4C, 4I e 4O), indicando que o extrato de *C. ruderalis* não é tóxico às concentrações de 7,5, 75 e 1000 µg/mL. No que diz respeito aos controlos positivos (Fig. 4B, 4H e 4N) observa-se uma redução de viabilidade, evidentemente marcada em Fig. 4B (o que era de esperar) e uma perda menos expressiva nas Fig. 4H e 4N, induzida pelo stress oxidativo causado pelo H₂O₂. Para as três situações representantes do controlo positivo seria de esperar uma resposta semelhante por parte das células, uma vez que foi testada sempre a mesma concentração de H₂O₂, no entanto, apesar deste composto ser das espécies reativas mais estáveis, quando se apresenta na sua forma não dissolvida, sofre decomposição rápida e espontânea, sendo, portanto muito instável à luz, ao calor e a determinadas enzimas (Pędziwiatr et al.,

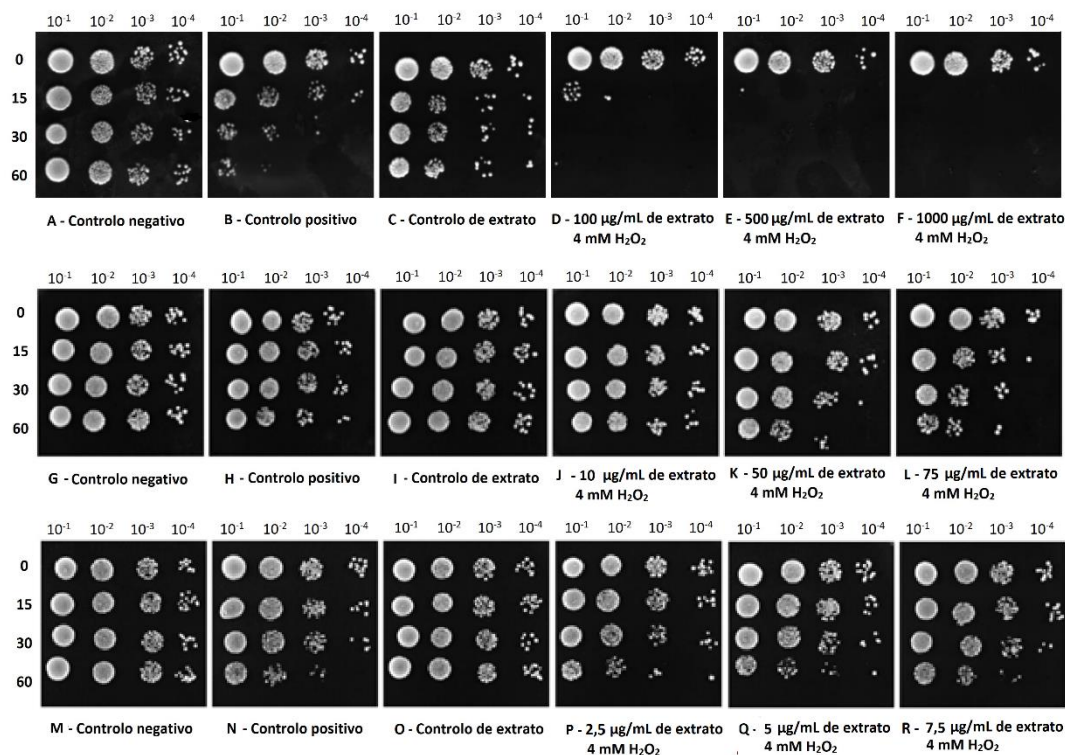


Figura 4 - O EE50% de *C. ruderalis* potencializa o efeito oxidativo do H₂O₂ a concentrações superiores de extrato. As células de *Saccharomyces cerevisiae* BY7471 foram incubadas em meio YPD para atingir a fase de crescimento exponencial, seguidas de diluições seriadas até 10⁻⁴. Colocaram-se gotas de cada diluição em meio YPDA. Foram testadas as concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 75; 100; 500 e 1000 µg/mL e criadas 3 situações de controlo: controlo negativo contendo o solvente (EtOH50%) e dH₂O; controlo positivo contendo o solvente e 4 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo dH₂O e extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicado. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias e fotografadas. Os resultados mostrados são representativos de três experiências independentes.

2018). Portanto, qualquer fator determinante para a sua estabilidade, ao longo do manuseio deste reagente, pode justificar as diferenças entre os resultados respetivos aos controlos positivos.

Na co incubação dos extratos com H_2O_2 (Fig. 4D, E e F/ Fig. 4J, K e L e Fig. 4P, Q e R), a sobrevivência das colónias foi de igual forma alterada. Ao aumento da concentração de extrato, corresponde uma diminuição da viabilidade celular. A concentrações reduzidas (Fig. 4P e R) de EE50%, as células parecem ter desenvolvido uma resposta adaptativa ao stress oxidativo induzido pela combinação de H_2O_2 + extrato, uma vez que a viabilidade de *S. cerevisiae* é superior ao controlo positivo (em que apenas é testado H_2O_2). Moccia *et al.* (2019) sugerem que uma produção moderada de ROS intracelular, pode desencadear uma resposta adaptativa que resulta numa maior resistência ao stress oxidativo. A resposta adaptativa em *S. cerevisiae* é ativada através do sistema de defesa antioxidante endógeno, que engloba uma variedade de pequenas moléculas como o ascorbato, glutatona ou tocoferóis e também algumas enzimas bem caracterizadas, cujas principais etapas metabólicas passam pela catálise alternada da dismutação do radical superóxido em O_2 ou H_2O_2 , pela superóxido dismutase (Sod) e pela decomposição do H_2O_2 intracelular em H_2O e O_2 , pela catalase (Cat) e glutatona peroxidase (Gpx).

A concentrações superiores de extrato (100, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) é notória uma perda de viabilidade consideravelmente mais acentuada, no entanto, demonstrando o extrato etanólico a 50% atividade antioxidante significativa *in vitro*, seria de esperar que a viabilidade celular de *S. cerevisiae* aumentasse comparativamente ao controlo positivo, devido à capacidade de proteção antioxidante apresentada pelo extrato de *C. ruderalis* em estudo. Este efeito sugere um comportamento pró-oxidante do extrato a concentrações superiores (visível principalmente na Fig. 4C), que foi já descrito para vários compostos naturais antioxidantes, de que são exemplo os polifenóis (Tedesco *et al.* 2010; Calabrese *et al.* 2012) e o CBD (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Este fenómeno, definido como “efeito hormético”, descreve que a concentrações mais baixas os compostos bioativos demonstram efeitos opostos aos obtidos a concentrações mais altas (por exemplo, a dosagens reduzidas os compostos normalmente tóxicos/ inibitórios mostram efeito estimulatório ou benéfico ao organismo exposto). Como já mencionado, o espectro de massa de EE50% exibiu uma presença marcada do composto CBDA, molécula que também descarboxila em condições de oxidação. Assim sendo, pode sugerir-se que a indução de stress oxidativo pelo H_2O_2 culminou na geração do composto CBD, que a elevadas concentrações revelou a sua natureza pró-oxidante. Este comportamento pró-oxidante vai então desencadear um aumento no stress a que as células estão sujeitas, quer através da geração de mais ROS, quer através da inativação dos sistemas endógenos antioxidantes (Mahaseth e Kuzminov, 2017). A inativação destes sistemas, que incluem os sequestrados de H_2O_2 ou até vias de reparo de DNA, pode levar a uma acumulação endógena de

espécies reativas e conseqüentemente, à diminuição acentuada da viabilidade de *S. cerevisiae* como a verificada também em Fig. 4D, E e F. Assim, pode até assumir-se que há um efeito de potencialização do H₂O₂ por parte do EE50% de *C. ruderalis*.

Um exemplo semelhante ao observado para o(s) componente(s) que definem a natureza antioxidante e pró-oxidante do EE50% é o do ácido ascórbico. AA é um antioxidante importante nos eucariontes superiores. Jamieson *et al.* (1998) confirma ter encontrado este composto em *S. cerevisiae*, embora os níveis pareçam baixos, o que o torna parte do sistema de defesa oxidativo não enzimático deste organismo. Por outro lado, há estudos que evidenciam a sua natureza pró-oxidante na medida em que sugerem que o AA potencializa a toxicidade do H₂O₂, tanto *in vivo* (Lundbeck, 1954), como *in vitro* (Samuni *et al.*, 1983). Interações semelhantes podem ocorrer entre o H₂O₂ e compostos constituintes de *C. ruderalis*.

Outras combinações potenciadoras de stress oxidativo foram também estudadas em outras plantas do género. Por exemplo, Alagbonsi e Olayaki (2017) realizaram um estudo com ratinhos para tentar perceber de que forma o stress oxidativo estava envolvido no efeito gonadotóxico reportado para *C. sativa* L. Aquando a suplementação dos ratinhos com *C. sativa* + melatonina / AA, verificou-se um efeito exacerbado de stress oxidativo e espermatotoxicidade, induzida pela potencialização de melatonina / AA pelo extrato, enquanto que a combinação melatonina + AA (sem suplementação de extrato) evitou essa condição. Os mecanismos envolvidos na ação pró-oxidante (em células saudáveis) da melatonina ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto efeito pró-oxidante de AA foi já demonstrado por vários autores. Os exemplos descritos sugerem que o extrato de *C. ruderalis* é capaz de potenciar o efeito tóxico de vários compostos, muitas vezes incluídos na dieta como é o caso do AA, pelo que se torna emergente a identificação e caracterização dos componentes com natureza pró-oxidante, na medida de evitar combinações que possam ser prejudiciais para células saudáveis e levar, conseqüentemente a danos oxidativos e ao desenvolvimento de condições/ doenças associadas.

3.5. Efeito potencializado do H₂O₂ está diretamente relacionado com a condição de stress oxidativo

As enzimas antioxidantes são consideradas a principal linha de defesa dos sistemas celulares, pois equilibram o estado *redox* nas células, estabilizando/desativando os radicais livres antes de estes atacarem e danificarem os componentes celulares (Krishnamurthy e Wadhwani, 2012). A perceção dos mecanismos envolventes na inibição destes sistemas de defesa é um ponto fulcral para evitar o desenvolvimento de condições de stress oxidativo causadas por compostos vegetais (ou outros) e para delinear estratégias de tratamento com aplicação clínica. Assim, na tentativa de identificar quais os

potenciais mecanismos responsáveis pelos resultados obtidos em 3.4., realizou-se um ensaio de viabilidade em que foram utilizados como modelos biológicos a estirpe *wt* de *Saccharomyces cerevisiae* (como controlo) e duas estirpes derivadas, uma mutada no fator de transcrição Yap1 e outra no grupo de enzimas da glutathione peroxidase (Gpx1, Gpx2 e Gpx3), com o objetivo de confirmar se o efeito potenciador do H₂O₂ pelo EE50%, está efetivamente relacionado com o excesso de radicais livres e consequentemente, com a condição de stress oxidativo. *S. cerevisiae* parece ser um organismo modelo adequado ao estudo da resposta adaptativa ao stress oxidativo induzido pelo H₂O₂, porque para além de ser geneticamente manipulável, os seus sistemas de defesa antioxidante são bem caracterizados, a sequência do seu genoma é acessível e a disponibilidade de mutantes afetados em todos os genes não essenciais, facilita muito o estudo das suas funções (Ng *et al.*, 2008).

O YAP1 é um fator de transcrição (*basic leucine zipper* (bZIP)), envolvido na resposta ao stress oxidativo e homeostase *redox* e representa a subfamília de proteínas ativadoras (tipo AP1) na adaptação de leveduras à resposta ao stress ambiental (YAP1 – *Yeast AP1-like*). Este regulador desempenha um papel fundamental na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes e componentes das vias celulares de redução de tiol, incluindo o sistema de tioredoxina (Trx2, Trx1), o sistema de glutaredoxina (Gsh1, Gsr1), superóxido dismutase (Sod1, Sod2), glutathione peroxidase (Gpx) e peroxidases específicas de tiol (Tsa1, Ahp1), que permitem manter as concentrações intracelulares de peróxidos e outros ROS em níveis muito baixos, por meio de mecanismos rigidamente controlados (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019). No entanto, a resposta adaptativa não é completamente abolida num mutante *yap1*, indicando o envolvimento de outros fatores na adaptação. Importante notar que a sua ativação por H₂O₂, ou produtos químicos reativos ao tiol, provoca respostas génicas adaptativas distintas. A glutathione peroxidase (Gpx), pertencente à família Yap1, é por si só uma enzima citosólica pertencente ao sistema de defesa antioxidante celular que catalisa a redução do H₂O₂ em H₂O e O₂, de forma dependente da glutathione (GSH) (Nicholls, 1972). Essa reação torna-se importante na remoção de níveis baixos de peróxido de hidrogénio que podem danificar a célula, uma vez que tais níveis não são eficientemente decompostos pelas catalases (Cohen e Hochstein, 1961).

De notar que o procedimento foi muito semelhante ao descrito em 3.4.: foram testadas as concentrações de 10, 50, 75, 100, 500 e 1000 µg/mL de EE50% de *C. ruderalis* e criadas, de igual forma as 3 situações de controlo (controlo negativo, em que as células são apenas incubadas em YPDA; controlo positivo contendo 0,5 mM de H₂O₂ e o controlo de extrato, contendo 0,5 mM de H₂O₂ e extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicada), sendo que os compostos e extratos testados foram adicionados ao meio YPDA antes da solidificação; foram retiradas alíquotas da

cultura para diluições em série e gotas de 5 μL foram colocadas no meio YPDA. Posteriormente, as células foram incubadas, durante 2 dias, a 30 $^{\circ}\text{C}$, para avaliar os efeitos do extrato na perda de viabilidade induzida pelo H_2O_2 nas diferentes estirpes (Figura 5).

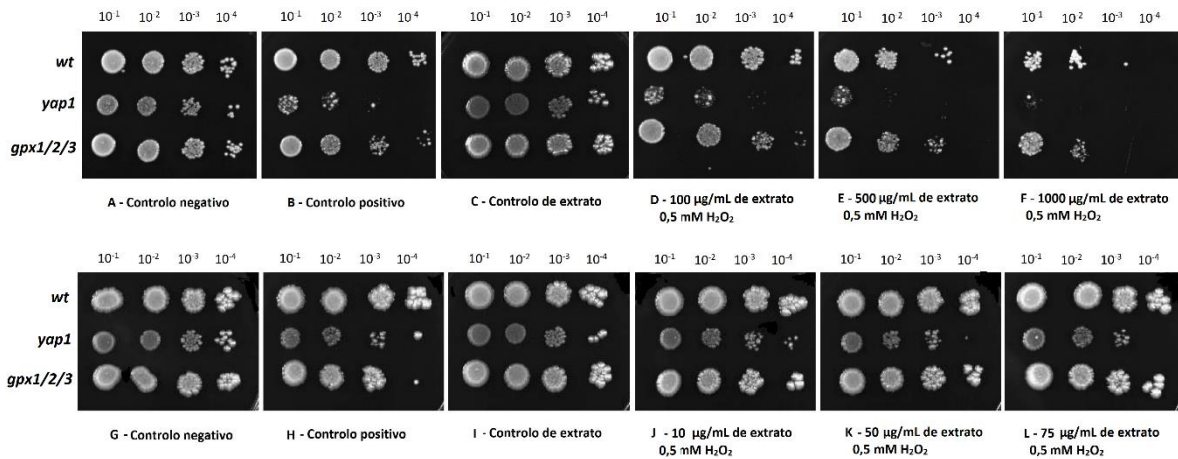


Figura 5 - O mecanismo envolvido na potencialização do H_2O_2 pelo EE50% de *C. ruderalis* está diretamente relacionado com a condição de stress oxidativo. As células de cada estirpe (*wt*, *yap1* e *gpx1/2/3*) foram incubadas em meio YPD para atingir a fase de crescimento exponencial, seguidas de diluições seriadas até 10^{-4} . Colocaram-se gotas de cada diluição em meio YPDA. Foram testadas as concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e criadas 3 situações de controlo: controlo negativo, em que as células são apenas incubadas em YPDA; controlo positivo contendo 0,5 mM de H_2O_2 e o controlo de extrato, contendo 0,5 mM de H_2O_2 e extrato numa concentração equivalente à concentração máxima de extrato aplicada. As placas foram incubadas a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 2 dias e fotografadas. Os resultados mostrados são representativos de três experiências.

Numa primeira abordagem, pela observação comparativa entre os controlos negativos (5A e 5G) e os controlos de extrato (5C e 5I), verifica-se que não há diferenças significativas de viabilidade entre os mesmos, o que é indicador de que o extrato de *C. ruderalis* não é tóxico às concentrações testadas (75 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No que diz respeito aos controlos positivos, o H_2O_2 induz o seu efeito oxidativo de forma marcada nos mutantes, na medida em que a redução de viabilidade de *yap1* e de *gpx1/2/3* torna-se evidente comparativamente a *wt*. Os resultados em 14B representam de forma mais elucidativa o que seria de esperar para esta condição, sendo que *yap1* mostra ser a estirpe mais suscetível ao stress oxidativo induzido pelo H_2O_2 , seguida de *gpx1/2/3*, enquanto que a estirpe *wt* parece não ser afetada à concentração de H_2O_2 testada. Relativamente à co-incubação das células com extrato e H_2O_2 , a potencialização do H_2O_2 é novamente realçada a concentrações superiores de extrato (5D, E e F), na medida em que se observa uma redução de viabilidade marcada em todas as estirpes, comparativamente ao controlo positivo. A um aumento de concentração de extrato, corresponde uma diminuição da viabilidade celular, sendo que à máxima concentração de extrato testada é demonstrada uma perda significativa de viabilidade em *wt*, uma perda quase total em *yap1* e uma perda considerável em *gpx1/2/3*. A redução de viabilidade de *S. cerevisiae*, *wt*, foi já descrita em 3.4. e associada à falta de

capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos em combater o excesso de radicais livres existentes, derivados do efeito sinérgico entre o H₂O₂ e determinados compostos do EE50%. Assim, já era de esperar que uma mutação em Yap1, resultasse num bloqueio geral da resposta celular ao stress oxidativo e conseqüentemente, numa diminuição ainda mais acentuada da viabilidade de *S. cerevisiae*. No que diz respeito à deleção de Gpx, é evidente que a capacidade de proteção antioxidante interna da célula foi diminuída, no entanto, o efeito não é tão frisado comparativamente a *yap1*, uma vez que foi apenas comprometida a eficácia de uma das enzimas com função de diminuição/ eliminação de radicais livres.

A concentrações reduzidas o efeito em *yap1* parece ser semelhante ao acima descrito, mas o mesmo não se observa para as restantes estirpes. Em *gpx1/2/3* parece pronunciar-se novamente uma resposta adaptativa ao stress oxidativo induzidos por H₂O₂ e EE50%. No que diz respeito a *wt*, a estirpe não aparenta sofrer danos capazes de induzir diminuição de viabilidade celular, contudo, exhibe colónias de diferentes tamanhos e morfologias (não mostrado), que podem ser resultado de mutações induzidas pela toxicidade sinérgica causada pelo H₂O₂ + extrato. Curiosamente, Frassinetti *et al.* (2018) avaliaram já os efeitos antimutagénicos de sementes de cânhamo e extratos de brotos contra mutagénese induzida por H₂O₂ e concluíram que, nas células expostas ao H₂O₂, os extratos de *C. sativa* foram capazes de reduzir significativamente o efeito mutagénico causado pelo H₂O₂. No entanto, o presente estudo revela citotoxicidade do extrato de *C. ruderalis* a concentrações elevadas, o que torna sugestivo o desenvolvimento de um estudo abrangente sobre a genotoxicidade e mutagénese do mesmo.

Até à data, não foram ainda relatadas pesquisas que relacionam os efeitos antioxidantes/ citotóxicos de extratos de *Cannabis* com a atividade de expressão de enzimas antioxidantes que modulam os níveis de H₂O₂, em levedura. No entanto, Hong *et al.* (2015) demonstraram que os extratos etanólico e de fluido supercrítico de sementes de cânhamo (*C. sativa* L.) aumentam a expressão génica de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx, em células HepG2 (linha celular de hepatoma), aquando incubadas com H₂O₂. O mesmo parece acontecer no presente estudo com EE50%, uma vez que a inibição destas enzimas em *yap1* (SOD e CAT) e *gpx1/2/3* leva a um decréscimo acentuado na viabilidade de *S. cerevisiae* devido à incapacidade de remoção dos radicais livres excessivos. Outro estudo, com HepG2, verificou que a regulação positiva da expressão de enzimas antioxidantes nas células promove um efeito protetor contra citotoxicidade ou apoptose induzida por stress oxidativo (Bak *et al.*, 2011). A indução da expressão dessas enzimas antioxidantes parece ser essencial para a prevenção de várias doenças mediadas por radicais livres, como cancro, artrose e inflamação crónica. Assim, EE50% pode ser um possível mediador de indução de expressão de enzimas como SOD, CAT e GPx, na medida em que parece estimular a expressão destas enzimas antioxidantes que desencadeiam uma resposta adaptativa,

sob determinadas condições. Davies *et al.* (1995), relataram que a adaptação de *S. cerevisiae* ao H₂O₂ requer um aumento na síntese de enzimas antioxidantes e cerca de, pelo menos, mais 21 proteínas são expressas após a adaptação ao H₂O₂. Portanto, podemos ver a resposta adaptativa como um método de prevenção do desenvolvimento de doenças associadas à condição de stress oxidativo.

4. Conclusão e Perspetivas futuras

O cânhamo é um recurso natural vital, altamente versátil, capaz de dar origem às demais matérias primas que incluem fibras resistentes, sementes altamente nutritivas e uma variedade de fitoquímicos com inúmeras propriedades farmacológicas associadas. No entanto, o valor comercial, económico e farmacológico desta planta tem vindo a ser bastante subestimado nas últimas décadas, devido à sua associação com a droga recreacional proveniente. Felizmente, a nível europeu, a *Cannabis* já começou a chamar a atenção da indústria farmacêutica devido ao seu potencial em tratar várias condições cujos medicamentos convencionais não mostram eficácia. *Cannabis ruderalis*, surge como uma subespécie, recentemente descrita (1924), que representa plantas com níveis mais elevados de CBD, percentagem reduzida de THC e características muito peculiares como a sua natureza selvagem e a sua capacidade de autofloração. A curiosidade desperta na busca de novos fitoquímicos ou interações entre os mesmos, não descritas no género, com propriedades relevantes para aplicação farmacológica com base em compostos naturais.

Os extratos de *C. ruderalis* foram avaliados pelas suas propriedades antioxidantes, citotóxicas e foi ainda avaliado o seu teor fenólico total. Os resultados do presente estudo sugerem que todos os extratos (EE100%, EE50% e EAq.) apresentam atividade antioxidante (Tabela 5), confirmada *in vitro*, pela capacidade de eliminar DPPH e/ou NO, que é atribuída possivelmente a compostos cuja identificação não foi possível. A análise química preliminar dos extratos poderia ser melhorada, a fim de obter uma identificação mais precisa dos compostos e sua respetiva quantificação, o que poderia ser alcançado por ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a MS/MS, respetivamente. Os ensaios realizados sugerem que o EE50% é o extrato com maior atividade antioxidante, uma vez que reduz eficazmente os radicais de DPPH e NO, o que levou à sua seleção para os ensaios *in vivo*, com *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, um terceiro ensaio de medida de potencial oxidante seria útil para comprovar com maior nível de certeza que este é o extrato com maior capacidade em reduzir radicais livres. A avaliação do potencial quelante de ferro seria uma abordagem atraente a integrar no estudo da capacidade antioxidante dos extratos de *C. ruderalis*, visto que o Fe^{2+} é um elemento muito presente em reações metabólicas oxidativas importantes, que culminam na geração de radicais como o $OH\cdot$, altamente reativo. No entanto, devido à limitação na disponibilidade de reagentes para o presente estudo, não foi possível incluir este ensaio, tornando-se uma sugestão para investigação futura.

O presente estudo permitiu verificar que a extração de determinado tipo de metabolitos secundários é dependente do método utilizado, uma vez que a aplicação de diferentes técnicas de extração

possibilitarão a presença/atuação de diferentes compostos. A comprovar temos o exemplo com os ensaios prévios de DPPH, em que foram utilizados extratos não liofilizados, que demonstraram uma capacidade antioxidante superior para o EE50% e uma atividade considerável para EE100%, demonstrada já em literatura para a espécie *Cannabis sativa* L mas não alcançada na presente investigação. Este facto indica que o processo de liofilização reduziu a presença de compostos voláteis, provavelmente terpenos, aos quais estão associados entre muitas outras propriedades a atividade antioxidante. Assim, torna-se sugerível que em estudos posteriores a técnica de liofilização não seja aplicada para este modelo biológico, uma vez que a variação do conteúdo relativo destes compostos entre linhagens pode ser usada como ferramenta útil para caracterização dos diferentes bio-tipos da planta. No sentido de confirmar a perda destes compostos específicos poderia ainda realizar-se uma análise química pela técnica de GC-MS/MS (normalmente utilizada para analisar orgânicos voláteis) do extrato EE50% antes e depois do processo de liofilização.

In vivo, verificou-se que o extrato EE50% de *C. ruderalis* não é tóxico às concentrações de 7,5; 75 e 1000 µg/mL, no entanto a incubação das células de *S. cerevisiae* com EE50% + H₂O₂ resultou numa diminuição acentuada da viabilidade, o que sugere um efeito potenciador do H₂O₂ pelo extrato em estudo. Concluiu-se que este efeito sinérgico é possivelmente, resultante do efeito pró-oxidante característico de um dos compostos identificados no espectro de EE50% (CBD) e determinados flavonoides a concentrações elevadas, sendo sugerível que outras interações semelhantes possam decorrer com outros compostos em células humanas. Por último, verificou-se que EE50% é um possível candidato para ativar e aprimorar a resposta ao stress oxidativo, promovendo a expressão de enzimas envolvidas na defesa antioxidante como por exemplo as catalases, superóxido dismutases (pertencentes a Yap1) e Gpx, comprovado em 3.5., pela diminuição acentuada de viabilidade em testes com *yap1* e *gpx1/2/3*. Uma investigação direcionada às atividades antígeno-tóxica e antimutagénica de EE50% deve ser realizada, de forma a delinear qual o potencial deste extrato em promover o reparo de DNA e consequentemente, evitar o desenvolvimento de doenças associadas ao stress oxidativo, como o cancro e outras doenças degenerativas.

C. ruderalis é uma subespécie representante de cânhamo, amplamente utilizado nas demais aplicações que incluem alimentação, cosmética e saúde, pelo que se torna emergente uma padronização e consistência dos constituintes químicos além de Δ9-THC e CBD. Assim, o estudo abrangente da toxicidade dos extratos derivados desta planta torna-se uma necessidade básica, no sentido de apoiar a formulação de aplicações farmacológicas adequadas, de forma a diminuir os riscos associados ao consumo de produtos derivados de linhagens de *Cannabis* medicinal.

5. Bibliografia

- Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M. H., Khan, N., Zaid, M. A., & Mukhtar, H. (2007). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127 (1), 222-232.
- Aguilar, T. A. F., Navarro, B. C. H., & Pérez, J. A. M. (2016). Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. In *A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2*. IntechOpen, 3-20.
- Ahmed, M., Ji, M., Qin, P., Gu, Z., Liu, Y., Sikandar, A., Iqbal, M. F., & Javeed, A. (2019). Phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of *Citrullus colocynthis* L. And *Cannabis sativa* L. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17 (3), 6961-6979.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2 (4), 875.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79 (2), 324-331.
- Alagbonsi, I. A., & Olayaki, L. A. (2017). Role of oxidative stress in *Cannabis sativa*-associated spermatotoxicity: evidence for ameliorative effect of combined but not separate melatonin and vitamin C. *Middle East Fertility Society Journal*, 22 (2), 136-144.
- Amaducci, S., Scordia, D., Liu, F. H., Zhang, Q., Guo, H., Testa, G., & Cosentino, S. L. (2015). Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*, 68, 2-16.
- Andre, C. M., Larondelle, Y., & Evers, D. (2010). Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Current Nutrition & Food Science*, 6 (1), 2-12.
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 19.
- Arnhold, T., Elmazar, M. M., & Nau, H. (2002). Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-trans-retinoic acid. *Toxicological Sciences*, 66 (2), 274-282.
- Arnold, W., Giroud, S., Valencak, T. G., & Ruf, T. (2015). Ecophysiology of omega fatty acids: a lid for every jar. *Physiology*, 30 (3), 232-240.
- Arnoldi, S., Roda, G., Casagni, E., Dell' Acqua, L., Dei Cas, M., Fare, F., Rusconi, C., Visconti, G. L., & Gambaro, V. (2017). Characterization of the volatile components of *Cannabis* preparations by Solid-Phase Microextraction Coupled to Headspace-Gas Chromatography with Mass Detector (SPME-HSGC/MS). *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 08 (01).
- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1), 317S-325S.

- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2 (6), 241-254.
- Avery, A. M., & Avery, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (36), 33730-33735.
- Bab, I., Ofek, O., Tam, J., Rehnelt, J., & Zimmer, A. (2008). Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 69-74.
- Bak, M. J., Jeong, J. H., Kang, H. S., Jin, K. S., Jun, M., & Jeong, W. S. (2011). Stimulation of activity and expression of antioxidant enzymes by solvent fractions and isolated compound from *Cedrela sinensis* leaves in HepG2 cells. *Journal of Medicinal Food*, 14 (4), 405-412.
- Balakrishnan, N., Panda, A. B., Raj, N. R., Shrivastava, A., & Prathani, R. (2009). The evaluation of nitric oxide scavenging activity of *Acalypha indica* Linn root. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2 (2), 148-150.
- Bang, M. H., Choi, S. Y., Jang, T. O., Kim, S. K., Kwon, O. S., Kang, T. C., Won, M., Park, J., & Baek, N. L. (2002). Phytol, SSADH inhibitory diterpenoid of *Lactuca sativa*. *Archives of Pharmacal Research*, 25 (5), 643-646.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*. 23 (4), 629-643.
- Barbosa, N. A., Paes, M. C. D., & Pereira, J. (2016). Influência da temperatura e do solvente na obtenção de extrato de milho de grãos pretos. In *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 31., 2016, Bento Gonçalves. Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.
- Barnes, M. P. (2006). Sativex®: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7 (5), 607-615.
- Barrett, M. L., Gordon, D., & Evans, F. J. (1985). Isolation from *Cannabis sativa* L. of cannflavin-a novel inhibitor of prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 34 (11), 2019-2024.
- Basli, A., Belkacem, N., & Amrani, I. (2017). Health benefits of phenolic compounds against cancers. *Phenolic Compounds-Biological Activity*. London: InTechOpen, 193-210.
- Beal, J. E., Olson, R., Lefkowitz, L., Laubenstein, L., Bellman, P., Yangco, B., Morales, J. O., Murphy, R., Powderly, W., Plasse, T. F., Mosdell, K. W., & Shepard, K. V. (1997). Long-term efficacy and safety of dronabinol for acquired immunodeficiency syndrome-associated anorexia. *Journal of Pain and Symptom Management*, 14 (1), 7-14.
- Ben-Shabat, S., Frider, E., Sheskin, T., Tamiri, T., Rhee, M. H., Vogel, Z., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., & Mechoulam, R. (1998). An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *European Journal of Pharmacology*, 353 (1), 23-31.

- Beutler, J. A., & Marderosian, A. H. (1978). Chemotaxonomy of Cannabis I. Crossbreeding between *Cannabis sativa* and *C. ruderalis*, with analysis of cannabinoid content. *Economic Botany*, 32 (4), 387-394
- Binet, L., Binet, P., Miocque, M., Roux, M., & Bernier, A. (1972). Recherches sur les propriétés pharmacodynamiques (action sédative et action spasmolytique) de quelques alcools terpéniques aliphatiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 30, 611-616.
- Borille, B. T. (2016). Caracterização química da planta *Cannabis sativa* L. a partir de sementes apreendidas pela Polícia Federal no Estado do Rio Grande do Sul.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14 (2), 115-132.
- Brenneisen, R. (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In *Marijuana and the Cannabinoids*, 17-49. *Humana Press*.
- Brunelli, E., Pinton, G., Bellini, P., Minassi, A., Appendino, G., & Moro, L. (2009). Flavonoid-induced autophagy in hormone sensitive breast cancer cells. *Fitoterapia*, 80 (6), 327-332.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jäger, W., Plank, C., & Dietrich, H. (1993). Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82 (6), 660-664.
- Cabral, G. A., & Griffin-Thomas, L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A. T., Iavicoli, I., Di Paola, R., Koverech, A., Cuzzocrea, S., Rizzarelli, E., & Calabrese, E. J. (2012). Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822 (5), 753-783.
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140 (1-2), 65-72.
- Campbell, W. E., Gammon, D. W., Smith, P., Abrahams, M., & Purves, T. D. (1997). Composition and antimalarial activity *in vitro* of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Medica*, 63 (03), 270-272.
- Casano, S., Grassi, G., Martini, V., & Michelozzi, M. (2011). Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and Aromatic Plants Seminar*, 925, 115-121.
- Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2019). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.

- Chanda, S., & Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (13), 981-996.
- Chen, J. J., Huang, S. Y., Duh, C. Y., Chen, I. S., Wang, T. C., & Fang, H. Y. (2006). A new cytotoxic amide from the stem wood of *Hibiscus tiliaceus*. *Planta Medica*, 72 (10), 935-938.
- Clarke, R. C., & Watson, D. P. (2007). Cannabis and natural cannabis medicines. In *Marijuana and the Cannabinoids*, 1-15. *Humana Press*.
- Cohen, G., & Hochstein, P. (1961). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Science*, 134 (3492), 1756-1757.
- Cornwell, P. A., & Barry, B. W. (1994). Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46 (4), 261-269.
- Dayanandan, P., & Kaufman, P. B. (1976). Trichomes of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 63 (5), 578-591.
- Davies, J. M., Lowry, C. V., & Davies, K. J. (1995). Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317 (1), 1-6.
- Delaunay, A., Isnard, A. D., & Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 19 (19), 5157-5166.
- Devinsky, O., Verducci, C., Thiele, E. A., Laux, L. C., Patel, A. D., Filloux, F., Szaflarski, P. J., Wilfong, A., Clark G. D., Park, Y. D., Seltzer, L. E., Bebin, E. M., Flamini, R., Wechsler, R. T., & Friedman, D. (2018). Open-label use of highly purified CBD (Epidiolex®) in patients with CDKL5 deficiency disorder and Aicardi, Dup15q, and Doose syndromes. *Epilepsy & Behavior*, 86, 131-137.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97 (4), 654-660.
- Djoko, B., Chiou, R. Y. Y., Shee, J. J., & Liu, Y. W. (2007). Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (6), 2376-2383.
- Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo, Asniza, M., & Abdul Khalid, S. H. . (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech, (tourism)*, 13.
- Drinić, Z., Vidović, S., Vladić, J., Koren, A., Kiprovski, B., & Sikora, V. (2018). Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of *Cannabis sativa* L. *Lekovite Sirovine*, 38, 17-21.
- Dusse, L. M. S. A., Vieira, L. M., & Carvalho, M. D. G. (2003). Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39 (4), 435-450.

- Elisabetsky, E., Marschner, J., & Souza, D. O. (1995). Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*, 20 (4), 461-465.
- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78 (5), 539-548.
- ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 103, 1.
- Elzinga, S., Fishedick, J., Podkolinski, R., & Raber, J. C. (2015). Cannabinoids and terpenes as chemotaxonomic markers in cannabis. *Natural Products Chemistry & Research*.
- Encyclopedia of Life. Available from <http://eol.org>. Accessed 15 July 2019.
- Ericsson, Y., Lundbeck, H., & Naujoks, R. (1957). Investigations on the Toxic Effect of Ascorbic Acid Oxidation. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 13 (3), 240-251.
- Eshwarappa, R. S. B., Iyer, S., Subaramaiha, S. R., Richard, S. A., & Dhananjaya, B. L. (2015). Antioxidant activities of *Ficus glomerata* (moraceae) leaf gall extracts. *Pharmacognosy Research*, 7 (1), 114.
- European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (Euroscarf). Available from <http://www.euroscarf.de>. Accessed 29 September 2019.
- Fabiani, R. (2016). Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: A systematic review of *in vivo* studies. *Food & Function*, 7 (10), 4145-4159.
- Falk, A. A., Hagberg, M. T., Löf, A. E., Wigaeus-Hjelm, E. M., & Zhiping, W. (1990). Uptake, distribution and elimination of α -pinene in man after exposure by inhalation. *Scand. J. Work Environ. Health*, 16, 372-378.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Plantas Aromáticas e Medicinais. Factores que afectam a produção. *Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso Teórico-Prático*, 3, 1-18.
- Fishedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71 (17-18), 2058-2073.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (7), 1043-1048.
- Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*, 7 (3), 615-639.
- França, M. B., Lima, K. C., & Eleutherio, E. C. (2017). Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118 (6), 1442-1452.
- Franco, G. R., & Viegas Junior, C. (2017). The Contribution of Studies with Canabidiol and Synthetic Analogues in the Design of New Drug Candidates for Neuropsychiatric Disorders and

Neurodegenerative Diseases. *Revista Virtual de Química*, 9 (4), 1773-1798.

- Frassinetti, S., Moccia, E., Caltavuturo, L., Gabriele, M., Longo, V., Bellani, L., Giorgi, G., & Giorgetti, L. (2018). Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 262, 56-66.
- Gainza, I., Nogué, S., Martínez Velasco, C., Hoffman, R. S., Burillo-Putze, G., Dueñas, A., Gómez, J., & Pinillos, M. A. (2003). Intoxicación por drogas. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 99-128.
- Gautschi, O., Tschopp, S., Olie, R. A., Leech, S. H., Simoes-Wust, A. P., Ziegler, A., Baumann, B., Odermatt, B., Hall, J., Stahel, R. A., & Zangemeister-Wittke, U. (2001). Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. *Journal of the National Cancer Institute*, 93 (6), 463-471.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xie, X. Q., Altmann, K. H., Karsak, M., & Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (26), 9099-9104.
- Gil, M. L., Jimenez, J., Ocete, M. A., Zarzuelo, A., & Cabo, M. M. (1989). Comparative study of different essential oils of *Bupleurum gibraltaricum* L. *Die Pharmazie*, 44 (4), 284-287.
- Gómez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D., & de Fonseca, F. R. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *Journal of Neuroscience*, 22 (21), 9612-9617.
- Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19 (31), 5319-5341.
- Gupta, V. K., & Sharma, S. K. (2006). Plants as natural antioxidants. *Natural Product Radiance*, 5 (4), 326-334.
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J., & Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (14), 8268-8273.
- Harris, B. (2010). Phytotherapeutic uses of essential oils. In: Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (eds). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press: Boca Raton, 315-352.
- Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. (2016). Cannabis: from cultivar to chemovar II-a metabolomics approach to Cannabis classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1 (1), 202-215.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (5), 1932-1936.
- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 133 (1), 79-97.

- Hong, S., Sowndhararajan, K., Joo, T., Lim, C., Cho, H., Kim, S., Kim, G. H., & Jhoo, J. W. (2015). Ethanol and supercritical fluid extracts of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) increase gene expression of antioxidant enzymes in HepG2 cells. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4 (2), 147-152.
- Ibrahim, A. K., Radwan, M. M., Ahmed, S. A., Slade, D., Ross, S. A., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2010). Microbial metabolism of cannflavin A and B isolated from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*, 71 (8-9), 1014-1019.
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14 (16), 1511-1527.
- Jiang, H. E., Li, X., Zhao, Y. X., Ferguson, D. K., Hueber, F., Bera, S., Wang, Y. F., Zhao, L. C., Liu C. J., & Li, C. S. (2006). A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 108 (3), 414-422.
- Kalant, H. (2001). Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Research and Management*, 6 (2), 80-91.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (6), 453-464.
- Keller, A., Leupin, M., Mediavilla, V., & Wintermantel, E. (2001). Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres. *Industrial Crops and Products*, 13 (1), 35-48.
- Kim, Y., Han, M. S., Lee, J. S., Kim, J., & Kim, Y. C. (2003). Inhibitory phenolic amides on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells from *Beta vulgaris* var. cicla seeds. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17 (8), 983-985.
- Kim, S. S., Baik, J. S., Oh, T. H., Yoon, W. J., Lee, N. H., & Hyun, C. G. (2008). Biological activities of Korean *Citrus obovoides* and *Citrus natsudaoides* essential oils against acne-inducing bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (10), 2507-2513.
- Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2007). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9 (4), 413-430.
- Komiya, M., Takeuchi, T., & Harada, E. (2006). Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research*, 172 (2), 240-249.
- Komori, T., Fujiwara, R., Tanida, M., Nomura, J., & Yokoyama, M. M. (1995). Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation*, 2 (3), 174-180.
- Kostecki, K., Engelmeier, D., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S., & Greger, H. (2004). Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona cf. pierrei*. *Phytochemistry*, 65 (1), 99-106.
- Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. (2012). Antioxidant enzymes and human health. *Antioxidant Enzyme*, 1-17.

- Kumar, S., Kumari, R., & Sharma, V. (2014). Genetics of dioecy and causal sex chromosomes in plants. *Journal of Genetics*, 93 (1), 241-277.
- Lajide, L., Escoubas, P., & Mizutani, J. (1995). Termite antifeedant activity in *Xylopiya aethiopica*. *Phytochemistry*, 40 (4), 1105-1112.
- Leafly. A new way to find cannabis. Available from <https://www.leafly.ca/news/cannabis-101/what-is-cannabis-ruderalis>. Accessed (2015)
- Lee, E. J., Nomura, N., Patil, B. S., & Yoo, K. S. (2014). Measurement of total phenolic content in wine using an automatic Folin-Ciocalteu assay method. *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (11), 2364-2372.
- Leiro, J., Arranz, J. A., Fraiz, N., Sanmartin, M. L., Quezada, E., & Orallo, F. (2005). Effect of cis-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa B signaling. *International Immunopharmacology*, 5 (2), 393-406.
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S., & Raskin, I. (2000). The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 2 (4), 35-53.
- Lesma, G., Consonni, R., Gambaro, V., Remuzzi, C., Roda, G., Silvani, A., Vece, V., & Visconti, G. L. (2014). Cannabinoid-free *Cannabis sativa* L. grown in the Po valley: evaluation of fatty acid profile, antioxidant capacity and metabolic content. *Natural Product Research*, 28 (21), 1801-1807.
- Liu, S. C., Lin, J. T., Wang, C. K., Chen, H. Y., & Yang, D. J. (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chemistry*, 114 (2), 577-581.
- Lorenzetti, B. B., Souza, G. E., Sarti, S. J., Santos Filho, D., & Ferreira, S. H. (1991). Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *Journal of Ethnopharmacology*, 34 (1), 43-48.
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, 44 (3), 151-162.
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., & Palomo, I. (2019). Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. *Molecules*, 24 (2), 366.
- Ma, C. Y., Liu, W. K., & Che, C. T. (2002). Lignanamides and Nonalkaloidal Components of *Hyoscyamus niger* Seeds. *Journal of Natural Products*, 65 (2), 206-209.
- Mahaseth, T., & Kuzminov, A. (2017). Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 274-281.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346 (6284), 561.
- Matthäus, B., & Brühl, L. (2008). Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (7), 655-661.

- Mazzari, S., Canella, R., Petrelli, L., Marcolongo, G., & Leon, A. (1996). N-(2-hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *European Journal of Pharmacology*, 300 (3), 227-236.
- McAllister, S. D., Murase, R., Christian, R. T., Lau, D., Zielinski, A. J., Allison, J., Almanza, C., Pakdel, A., Lee, J., Limband, C., Liu, Y., Debs, R. J., Moore, D. H., & Desprez, P. Y. (2011). Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129 (1), 37-47.
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species. *Cannabis and cannabinoid research*, 3 (1), 203-212.
- Mechoulam, R., Parker, L. A., & Gallily, R. (2002). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42 (S1), 11S-19S.
- Meizer, C., Martin, S. K., & Kibnisky, D. (2014). The composition of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil and its potential as an important source of nutrition for man. *International Journal of Chemical and Biochemical Research*, 3, 13.
- Mikuriya, T. H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *California Medicine*, 110 (1), 34.
- Moccia, S., Siano, F., Russo, G. L., Volpe, M. G., La Cara, F., Pacifico, S., Piccolella, S., & Picariello, G. (2019). Antiproliferative and antioxidant effect of polar hemp extracts (*Cannabis sativa* L., Fedora cv.) in human colorectal cell lines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-14.
- Mouslech, Z., & Valla, V. (2009). Endocannabinoid system: an overview of its potential in current medical practice. *Neuroendocrinology Letters*, 30 (2), 153-179.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Horváth, B., Bátkai, S., Park, O., Tanchian, G., Gao, R. Y., Patel, V., Wink, D. A., Liaudet, L., Mechoulam, R., Pacher, P., & Haskó, G. (2011). Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 50 (10), 1368-1381.
- Mulgund, A., Doshi, S., & Agarwal, A. (2015). The role of oxidative stress in endometriosis. In *Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health 273-281*. Academic Press.
- Ng, C. H., Tan, S. X., Perrone, G. G., Thorpe, G. W., Higgins, V. J., & Dawes, I. W. (2008). Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (6), 1131-1145.
- Nicholls, P. (1972). Contributions of catalase and glutathione peroxidase to red cell peroxide removal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 279 (2), 306-309.
- Nuutinen, T. (2018). Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 198-228.
- Oesch, S., & Gertsch, J. (2009). Cannabinoid receptor ligands as potential anticancer agents-high hopes for new therapies?. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61 (7), 839-853.

- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 58 (3), 389-462.
- Pain, S. (2015). A potted history. *Nature*, 525 (7570), S10.
- Peana, A. T., Rubattu, P., Piga, G. G., Fumagalli, S., Boatto, G., Pippia, P., & De Montis, M. G. (2006). Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. *Life Sciences*, 78 (21), 2471-2474.
- Pędziwiatr, P. (2018). Decomposition of hydrogen peroxide-kinetics and review of chosen catalysts. *Acta Innovations*, (26), 45-52.
- Pellati, F., Brighenti, V., Sperlea, J., Marchetti, L., Bertelli, D., & Benvenuti, S. (2018). New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules*, 23 (10), 2639.
- Pertwee, R. G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: An overview. *International Journal of Obesity*, 30 (S1), S13-S18.
- Pertwee, R. G. (2014). *Handbook of cannabis*. Oxford University Press, USA.
- Perry, N. S., Houghton, P. J., Theobald, A., Jenner, P., & Perry, E. K. (2000). In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (7), 895-902.
- Piluzza, G., Delogu, G., Cabras, A., Marceddu, S., & Bullitta, S. (2013). Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domesticated accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60 (8), 2331-2342.
- Pisanti, S., & Bifulco, M. (2019). Medical cannabis: a plurimillennial history of an evergreen. *Journal of Cellular Physiology*, 234 (6), 8342-8351.
- Pollastro, F., Minassi, A., & Fresu, L. G. (2018). Cannabis phenolics and their bioactivities. *Current Medicinal Chemistry*, 25 (10), 1160-1185.
- Prade, T., Svensson, S. E., Andersson, A., & Mattsson, J. E. (2011). Biomass and energy yield of industrial hemp grown for biogas and solid fuel. *Biomass and Bioenergy*, 35 (7), 3040-3049.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82 (4), 513-523.
- Puga, G. M., Novais, I. D. P., & Zanesco, A. (2011). Efeitos terapêuticos da suplementação de L-arginina nas doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas. *Arquivos de Medicina*, 25 (3), 107-114.
- Radwan, M. M., ElSohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Khan, I. A., & Ross, S. A. (2009). Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 72 (5), 906-911.
- Radwan, M. M., ElSohly, M. A., El-Alfy, A. T., Ahmed, S. A., Slade, D., Husni, A. S., Manly, S. P., Wilson, L., Seale, S., Cutler, S. J., & Ross, S. A. (2015). Isolation and pharmacological evaluation of minor cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 78 (6), 1271-

1276.

- Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (Eds.). (2013). *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, 1541-2662. Heidelberg, Germany: Springer.
- Ranalli, P., & Venturi, G. (2004). Hemp as a raw material for industrial applications. *Euphytica*, 140 (1-2), 1-6.
- Rao, V. S. N., Menezes, A. M. S., & Viana, G. S. B. (1990). Effect of myrcene on nociception in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42 (12), 877-878.
- Rashidi, L., Gholami, Z., Nanvazadeh, S., & Shabani, Z. (2016). Rapid method for extracting and quantifying synthetic antioxidants in all edible fats and oils. *Food Analytical Methods*, 9 (9), 2682-2690.
- Rätsch, C. (2001). Marijuana medicine: a world tour of the healing and visionary powers of cannabis. *Inner Traditions/Bear & Co.*
- Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., Scarpantonio, A., Rinaldi, L., & Mosca, E. (2000). Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacological Research*, 42 (2), 177-181.
- Rea, K. A., Casaretto, J. A., Al-Abdul-Wahid, M. S., Sukumaran, A., Geddes-McAlister, J., Rothstein, S. J., & Akhtar, T. A. (2019). Biosynthesis of cannflavins A and B from *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry*, 164, 162-171.
- Rivers, J. R. J., & Ashton, J. C. (2010). The development of cannabinoid CB1 receptor agonists for the treatment of central neuropathies. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 10 (1), 47-64.
- Ross, S. A., ElSohly, M. A., Sultana, G. N., Mehmedic, Z., Hossain, C. F., & Chandra, S. (2005). Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16 (1), 45-48.
- Royal Queen Seeds. Available from <https://www.royalqueenseeds.pt>. Accessed 31 April 2019.
- Russo, E. B. (2001). Handbook of Psychotropic Herbs: A scientific analysis of herbal remedies for psychiatric conditions. *Haworth Press: Binghamton, NY.*
- Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163 (7), 1344-1364.
- Russo, E., & Guy, G. W. (2006). A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, 66 (2), 234-246.
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BioMed Center Complementary and Alternative Medicine*, 12 (1), 221.
- Samuni, A., Aronovitch, J., Godinger, D., Chevion, M., & Czapski, G. (1983). On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions: A site-specific Fenton mechanism. *European Journal of*

Biochemistry, 137 (1-2), 119-124.

San Miguel-Chávez, R. (2017). Phenolic antioxidant capacity: a review of the state of the art. *Phenolic Compounds-Biological Activity*.

Santos, M. A. (2013) Síntesis y evaluación farmacológica de aminoalcoholes y diaminas derivados del ácido hexadecanoico. Tesis Doctoral. Departamento de Química Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

Sapino, S., Carlotti, M. E., Peira, E., & Gallarate, M. (2005). Hemp-seed and olive oils: Their stability against oxidation and use in O/W emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 27 (6), 355-355.

Sapino, S., Carlotti, M. E., Peira, E., & Gallarate, M. (2005). Hemp-seed and olive oils: Their stability against oxidation and use in O/W emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 27 (6), 355-355.

Selkirk, S. W., & Spencer, R. D. (1999). Economics of fibre production from industrial hemp and blue gum plantations. *Australian Forestry*, 62 (2), 193-201.

Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124 (3), 1208-1216.

Siano, F., Moccia, S., Picariello, G., Russo, G. L., Sorrentino, G., Di Stasio, M., La Cara, F., & Volpe, M. G. (2019). Comparative study of chemical, biochemical characteristic and ATR-FTIR analysis of seeds, oil and flour of the edible fedora cultivar Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Molecules*, 24 (1), 83.

Singh, B., & Sharma, R. A. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, 5 (2), 129-151.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. *Academic Press*.

Slatkin, D. J., Doorenbos, N. J., Harris, L. S., Masoud, A. N., Quimby, M. W., & Schiff, P. L. (1971). Chemical constituents of *Cannabis sativa* L. root. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60 (12), 1891-1892.

Smeriglio, A., Galati, E. M., Monforte, M. T., Lanuzza, F., D'Angelo, V., & Circosta, C. (2016). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of cold-pressed seed oil from Finola Cultivar of *Cannabis sativa* L. *Phytotherapy Research*, 30 (8), 1298-1307.

Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L. Pagnoni, U. M., Albini, A. Prosperi, E. & Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (25), 22586-22594.

Tambe, Y., Tsujiuchi, H., Honda, G., Ikeshiro, Y., & Tanaka, S. (1996). Gastric cytoprotection of the non-

- steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene. *Planta Medica*, 62 (05), 469-470.
- Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (23), 8945-8950.
- Tedesco, I., Russo, M., & Russo, G. L. (2010). Commentary on 'resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance'. *Human & Experimental Toxicology*, 29 (12), 1029-1031.
- Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*, 150 (5), 613-623.
- Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 851 (1-2), 51-70.
- Ujváry, I., & Hanuš, L. (2016). Human metabolites of cannabidiol: a review on their formation, biological activity, and relevance in therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1 (1), 90-101.
- do Vale, T. G., Furtado, E. C., Santos Jr, J. G., & Viana, G. S. B. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) Brown. *Phytomedicine*, 9(8), 709-714.
- van der Werf, H. M. G., & Turunen, L. (2008). The environmental impacts of the production of hemp and flax textile yarn. *Industrial Crops and Products*, 27 (1), 1-10.
- Velázquez, E., Tournier, H. A., De Buschiazzo, P. M., Saavedra, G., & Schinella, G. R. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74 (1-2), 91-97.
- Vigushin, D. M., Poon, G. K., Boddy, A., English, J., Halbert, G. W., Pagonis, C., Jarman, M., Coombes, R. C., & Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. (1998). Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 42 (2), 111-117.
- Wahle, K. W., Brown, I., Rotondo, D., & Heys, S. D. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698, 36-51.
- Yamada, M., Hayashi, K. I., Hayashi, H., Tsuji, R., Kakumoto, K., Ikeda, S., Hoshino, T., Tsutsui, K., Tsutsui, K., Ito, T., Nozaki, H., & Iinuma, M. (2006). Nepalensinols D-G, New Resveratrol Oligomers from *Kobresia nepalensis* (Cyperaceae) as Potent Inhibitors of DNA Topoisomerase II. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54 (3), 354-358.
- Zuardi, A. W. (2008). Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 30 (3), 271-280.

6. ANEXOS

extcanrubposmetagua #14-241 RT: 0.03-0.54 AV: 228 NL: 1.76E6
T: ITMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

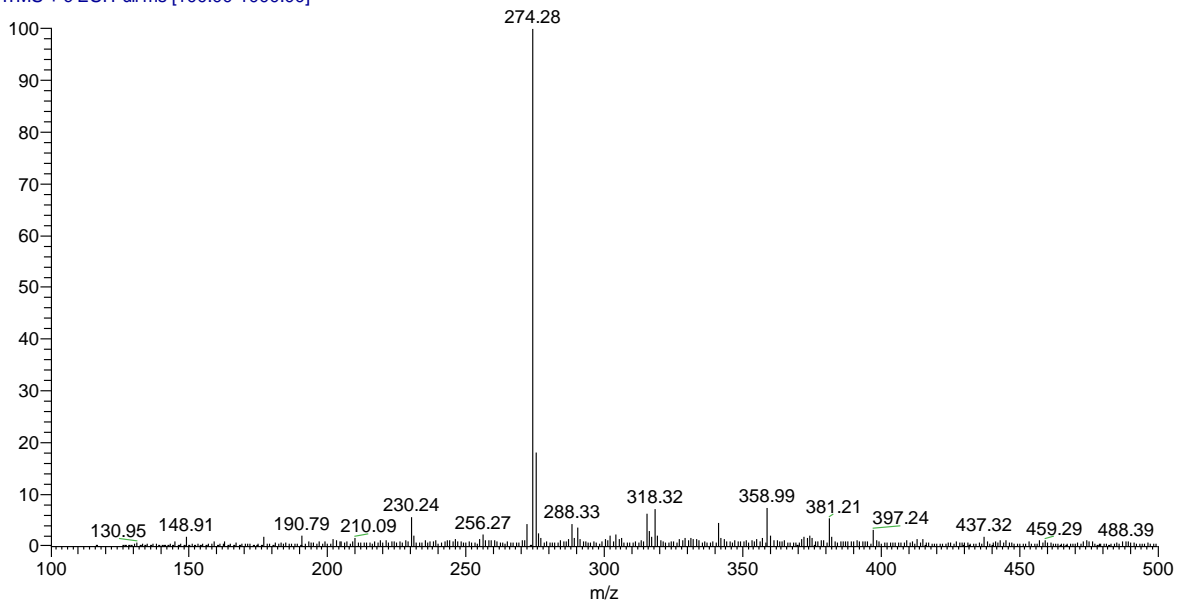


Figura 6 - Perfil positivo do espectro de massa de iões do EE100% de *C. ruderalis* obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).

Canet50porcento #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.60E6
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-1000.00]

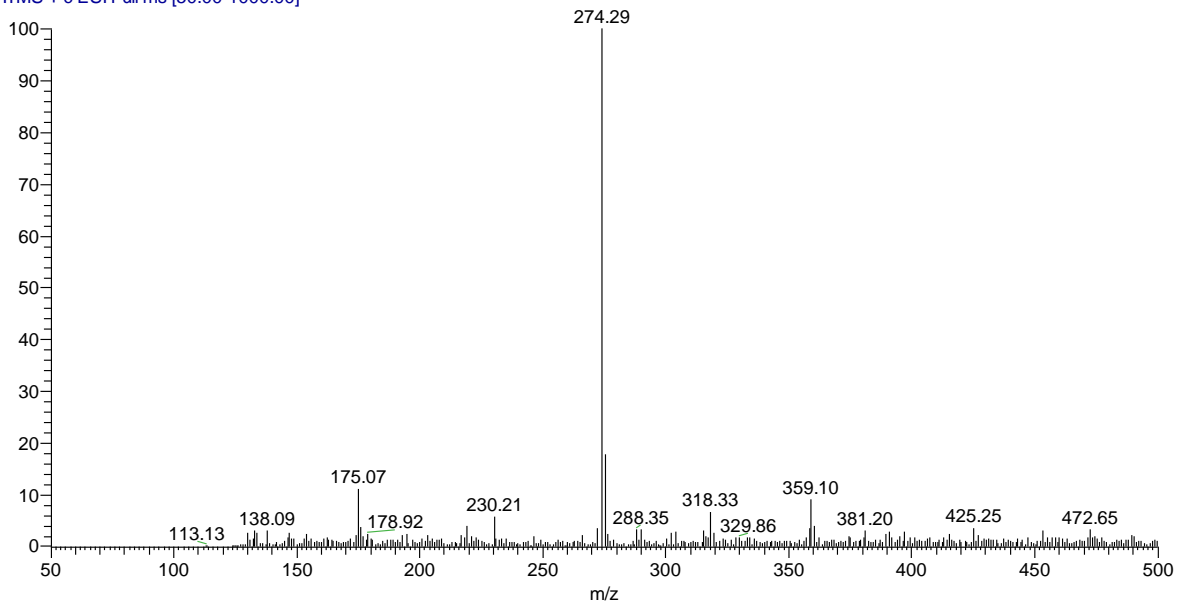


Figura 7 - Perfil positivo do espectro de massa de iões do EE50% de *C. ruderalis* obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).

Canaguapos #94-684 RT: 0.21-1.54 AV: 591 NL: 2.15E6
T: ITMS + c ESI Full ms [85.00-1000.00]

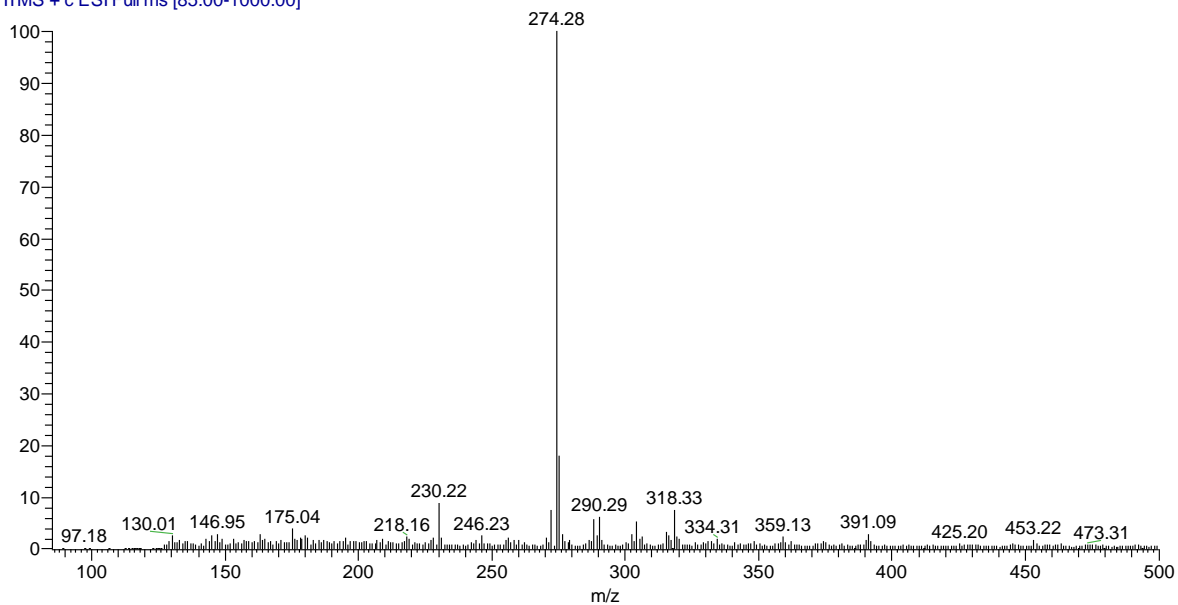


Figura 8 - Perfil positivo do espectro de massa de iões do EAq. de *C. ruderalis* obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).

extcanrubnegmetagaatune327 #29-242 RT: 0.07-0.59 AV: 214 NL: 1.66E3
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

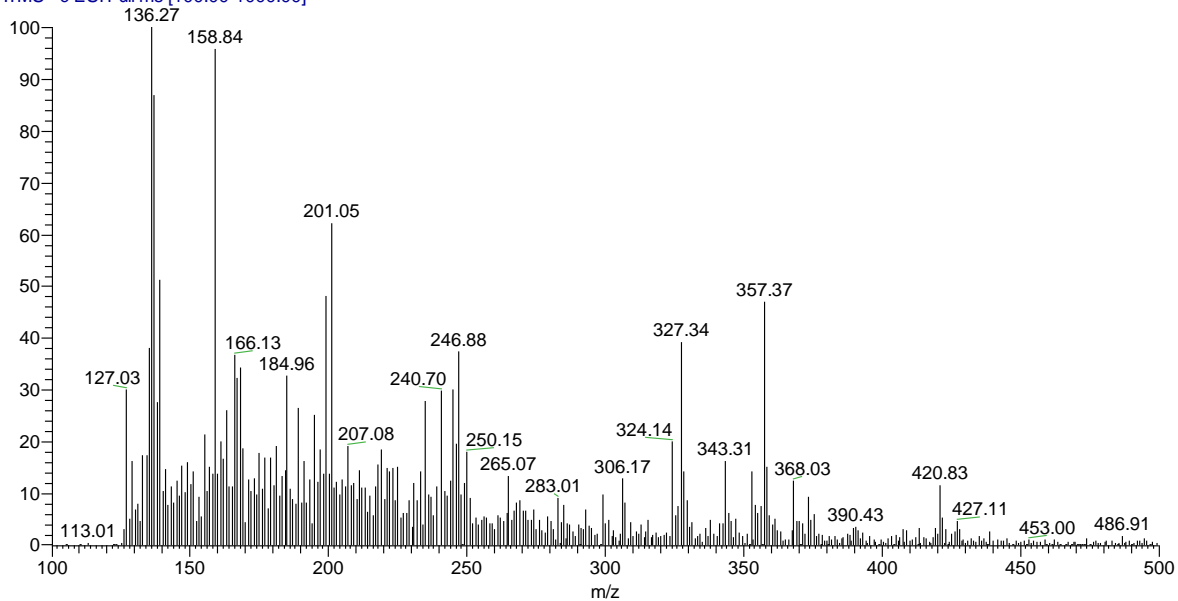


Figura 9 - Perfil negativo do espectro de massa de iões do EE100% de *C. ruderalis* obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).

Canet50percentneg #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.46E3
T: ITMS - c ESI Full ms [50.00-1000.00]

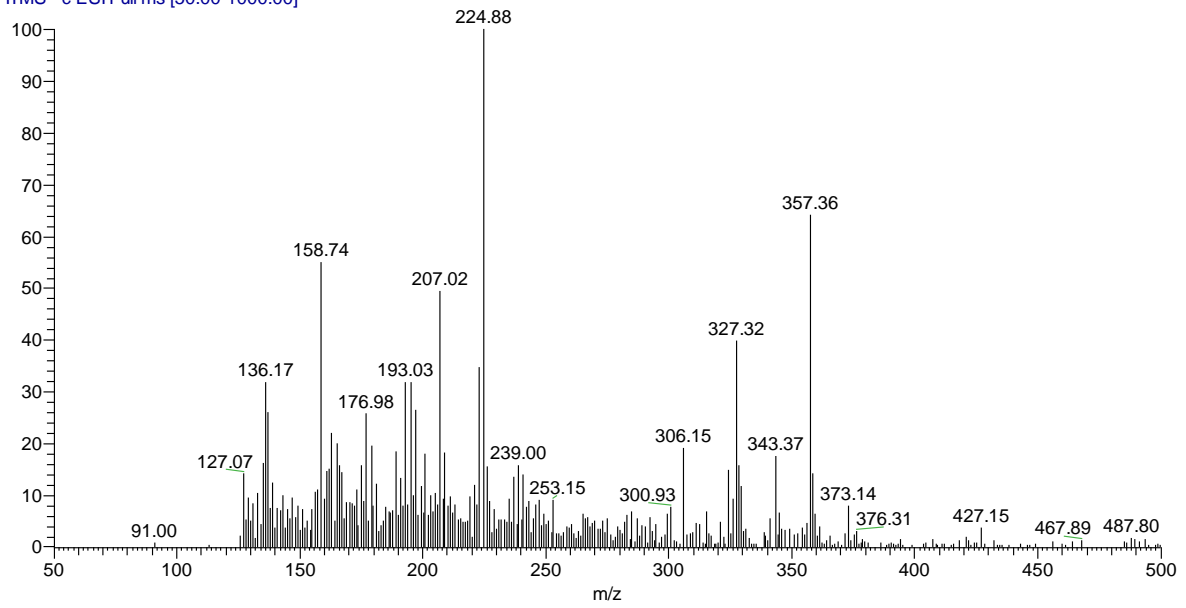


Figura 10 - Perfil negativo do espectro de massa de iões do EE50% de *C. ruderalis* obtido por espectrometria de massa de ionização por electropulverização (ESI-MS).