

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da administração oral do Canabidiol em
voluntários sadios**

Luiz Carlos Pereira Junior

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da administração oral do canabidiol em
voluntários sadios**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Luiz Carlos Pereira Junior

Orientador: Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

**Ribeirão Preto
2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Junior, Luiz Carlos Pereira

Avaliação da administração oral do canabidiol em voluntários sadios. Ribeirão Preto, 2013.

86 p. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientação: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz

1. Canabidiol. 2. Concentração plasmática. 3. VAMS. 4. IDATE. 5. REF. 6. Ansiedade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Carlos Pereira Junior

Avaliação da administração oral do Canabidiol em voluntários sadios

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Toxicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Mauricéia que sempre se esforçaram incansavelmente para que eu pudesse concluir mais essa etapa de minha vida; são eles o alicerce sobre o qual me edifiquei, são o meu porto seguro, são eles a maior riqueza que possuo. Este trabalho é dedicado também à Euripedina Tavares Duarte (*in memoriam*), minha amada bisavó e Valéria Gomide Carvalho Nascimento (*in memoriam*), adorada madrinha; que com amor e carinho auxiliaram o meu crescimento moral.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, minha orientadora, pela confiança em mim depositada, apoio, ensinamentos que perdurarão por toda vida e compreensão e paciência durante os dois anos de mestrado,

Ao Professor Dr. Antônio Waldo Zuardi, pela oportunidade, esclarecimentos e confiança depositada,

À Sônia, Gilda e Cidinha, do Laboratório de análises toxicológicas, pela colaboração e companheirismo que, sem dúvida, serviram de estímulo durante os momentos difíceis, naturais em qualquer que seja a jornada a ser empreendida,

Aos amigos Mateus, Flávia, Samuel, Marina e Greyce que sempre estiveram presentes orientando, corrigindo, aconselhando e também nos momentos de descontração,

À Sandra, do laboratório de Neuropsicofarmacologia, pela companhia e auxílio nas incontáveis manhãs de sábado,

À Lívia Ces, companheira de trabalho, por toda ajuda prática e extrema eficiência,

À Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur pela credibilidade e apoio dedicados ao nosso estudo,

Ao Professor Dr. Marco Aurélio que se prontificou a tornar nosso trabalho ainda mais primoroso,

Ao Luis Felipe, pela colaboração e empenho durante a fase final do nosso trabalho,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro fornecido durante o mestrado,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e todos seus funcionários, em especial à Rose e Rosana secretárias da Comissão de Pós-Graduação em, à Karina e David secretários do Comitê de Ética em Pesquisa,

Ao grande amigo e primo Rodolfo Freitas, companheiro de longas datas, pelos conselhos e apoio nas horas difíceis. Encerramos mais uma etapa, porém, nossa amizade nos manterá sempre unidos,

Aos companheiros de moradia Alex, Willian, Fernando, Antônio, Roberto, pela companhia e aprendizado de convivência,

A todos meus familiares, tios, avós e primos pelos incentivos constantes,

Aos meus Pais que sempre me apoiaram nas decisões ao longo da vida e são os amigos com os quais eu sempre poderei contar. Obrigado pelo Amor que dedicam aos seus filhos,

Aos meus irmãos Lucas, Thomaz e Maria Luiza que jamais deixaram de me dar apoio, sempre companheiros e prestativos em qualquer situação,

Eu agradeço a Deus, por nunca tirar as provas do meu caminho, mas sempre por ter-me conferido a força espiritual necessária para superar barreiras. Sem Deus eu não chegaria a lugar algum, eu não teria forças para viver a vida. Eu agradeço a Deus, fonte de toda bondade.

RESUMO

JUNIOR, L.C.P. **Avaliação da administração oral do Canabidiol em voluntários saudáveis**. 2013. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Diante das evidências da existência de um sistema endocanabinóide em humanos, possivelmente disfuncional em transtornos de ansiedade e do crescente interesse terapêutico no uso do canabidiol (CBD), justifica-se um estudo da comparação entre as concentrações plasmáticas do CBD, administrados por via oral na forma de pó e dissolvido em óleo, para que se defina a forma de administração ideal do CBD e sua eficácia terapêutica na dose de 150mg, baseados em estudos cinéticos e dinâmicos (PK/PD). Neste contexto, o estudo investigou 39 voluntários saudáveis, alocados aleatoriamente em 3 grupos, que receberam 150 mg de CBD, em cápsulas na forma de pó (Grupo 1), dissolvido em óleo de milho (Grupo 2) e amido de milho (Grupo placebo). A concentração plasmática do CBD, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, foi determinada nos tempos: 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 h, após a administração do fármaco. Os instrumentos de avaliação de medidas psicológicas foram: escala analógica de humor (VAMS) e a escala de identificação de ansiedade traço estado (IDATE) e nas medidas fisiológicas foram monitoradas a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC). O teste ansiogênico aplicado foi o Teste de Simulação de Falar em Público (TSFP). No reconhecimento de expressões faciais (REF) foi realizada a tarefa *Touch*, em indicar a emoção apresentada na expressão do indivíduo. Nos resultados das medidas subjetivas (VAMS e IDATE), não se constatou o efeito ansiolítico; houve elevação da PA sistólica e diastólica e da FC; a intensidade da resposta no REF foi de 93% no Grupo 1 (pó) e de 81% no Grupo 2 (óleo). O pico plasmático médio foi de $20,70 \pm 1,68$ ng/mL em 2,5h (CBD pó) e CBD em óleo de $82,59 \pm 9,52$ ng/mL em 2h. Desta forma, este estudo PK/PD demonstrou que a forma farmacêutica ideal para a administração do CBD foi a em óleo e no estudo de dose /resposta, 150mg não possui eficácia terapêutico em relação a ansiedade.

Palavras chave: canabidiol, concentração plasmática, VAMS, IDATE, REF, ansiedade.

ABSTRACT

JUNIOR, L.C.P. **Evaluation of oral administration of cannabidiol to healthy volunteers.** 2013. 86p. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

In the face of the existence of an endocannabinoid system in humans, possibly dysfunctional in anxiety disorders and the growing interest in the therapeutic use of cannabidiol (CBD), justified a study comparing plasma concentrations of CBD, administered orally in powder form and dissolved in oil, in order to define the optimal mode of administration of the CBD and their therapeutic efficacy at a dose of 150mg, based on dynamic and kinetic studies (PK/PD). In this context, the study researched 39 healthy volunteers, allocated randomly in 3 groups, receiving 150 mg of CBD, capsules in powder form (Group 1), dissolved in corn oil (Group 2) and corn starch (placebo group). The plasmatic concentration of CBD was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry at the times: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 h, after administration of the drug. Assessment instruments of psychological measures were: analogical scale mood (VAMS) and scale identification of trait anxiety state (IDATE) and physiological measures were monitored in arterial pressure (PA) and heart rate (HR). The anxiogenic test applied was Simulated Public Speaking (TSFP). In recognition of facial expressions (REF) was performed the task *touch*, that consists in indicate the emotion shown the facial expression of the individual. The results of subjective measures (VAMS and IDATE) was not found the anxiolytic effect; there was increase of systolic and diastolic pressure and heart frequency; the response intensity in the REF was 93% in group 1 (powder) and 81% in Group 2 (oil). The peak mean plasma was 20.70 ± 1.68 ng / mL (CBD powder) in 2.5 h and 82.59 ± 9.52 ng / mL (CBD in oil) in 2h. Thus, this study PK / PD demonstrated that the ideal pharmaceutical form for administration of the CBD has been in oil and study of dose / response, 150mg has no therapeutic efficacy in relation to anxiety.

Keywords: cannabidiol, plasma concentration, VAMS, STAI, REF, anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Δ^9 -Tetraidrocanabinol.....	3
Figura 2. Estrutura do Canabidiol.....	3
Figura 3. Estrutura da Anandamida.....	4
Figura 4. Escala analógica de sintomas somáticos (VAMS).....	18
Figura 5. Escala de identificação ansiedade traço estado (IDATE).....	19
Figura 6. Exemplo da representação das seis emoções básicas.....	21
Figura 7. Evolução da criação de imagens intermediárias utilizadas na tarefa de reconhecimento de expressões faciais.....	22
Figura 8. Procedimento de preparo de amostras de voluntários.....	27
Figura 9. Cromatograma dos padrões de CBD (100 ng), Δ^9 THC (100 ng) e Δ^9 THCd3 (50ng) secos e derivatizados analisados no modo <i>Full Scan</i>	32
Figura 10. Cromatograma do padrão e espectro de massas do CBD (100 ng) no modo <i>Full Scan</i> de detecção.....	33
Figura 11. Cromatograma do padrão e espectro de massas do Δ^9 THC (100 ng) no modo <i>Full Scan</i> de detecção.....	34
Figura 12. Cromatograma dos padrões e espectro de massas do Δ^9 THC-d3 (50 ng) no modo <i>Full Scan</i> de detecção.....	35
Figura 13. Resultado cromatográfico da análise de uma amostra de plasma “branco” realizada no modo <i>S/S</i> de detecção.....	37
Figura 14. Cromatogramas e espectros de massas do CBD, Δ^9 THC e Δ^9 THC-d3/modo <i>S/S</i> de detecção.....	38
Figura 15. Cromatograma e espectro de massas do CBD referente à análise de plasma de voluntário exposto ao CBD.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Protocolo para procedimento experimental.....	25
TABELA 2. Íons utilizados na identificação e quantificação do analito.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na ansiedade subjetiva avaliada pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....47
- Gráfico 2.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na sedação avaliada pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....48
- Gráfico 3.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo no prejuízo cognitivo avaliado pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....49
- Gráfico 4.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo no desconforto avaliado pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....50
- Gráfico 5.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na ansiedade avaliada pela escala de identificação de ansiedade traço estado em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....51
- Gráfico 6.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na pressão arterial sistólica medida com um esfignomanômetro de mercúrio em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....52
- Gráfico 7.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na pressão arterial diastólica medida com um esfignomanômetro de mercúrio em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....53
- Gráfico 8.** Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na frequência cardíaca avaliada pelo pulso periférico em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público.....54
- Gráfico 9.** Comportamento cinético do canabidiol em pó.....55
- Gráfico 10.** Comportamento cinético do canabidiol em óleo.....56

LISTA DE ABREVIATURAS

CBD	Canabidiol
Δ^9 -THC	Delta-9-tetraidrocanabinol
TSFP	Teste de simulação de falar em público
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
FMRI	Imagem de ressonância magnética funcional
GAD	Transtorno de ansiedade generalizada
PTSD	Transtorno de estresse pós-traumático
ACC	Córtex cingulado anterior
CBN	Canabinol
ml	Mililitros
min	Minutos
11-OH-THC	Onze hidróxi tetraidrocanabinol
HLM _s	Enzimas microssomais hepáticas
RD	Retinopatia diabética
ICAM1	Molécula de adesão intercelular um
CD18	Molécula de adesão de leucócitos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
BPRS	Escala de avaliação psiquiátrica leve
IBS	Síndrome do cólon irritável
IN	Intranasal
PEG	Polietileno glicol
PG	Polipropileno glicol
IMC	Índice de massa corpórea
VAMS	Escala analógica de humor
IDATE	Escala de identificação de ansiedade traço estado
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
FC	Frequência cardíaca
DA	Dopamina
TREF	Tarefa de reconhecimento de expressões faciais

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Efeito ansiolítico do canabidiol	6
1.2. Comportamento Cinético do Canabidiol	8
1.3. Expressão emocional e identidade facial	9
1.4. Vias alternativas para administração do Canabidiol.....	11
1.5. Outras aplicações terapêuticas do Canabidiol	12
2. OBJETIVOS	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
3.1. Casuística	16
3.2. Cápsulas de CBD.....	16
3.3. Instrumentos de avaliação.....	16
3.4. Testes ansiogênicos.....	20
3.4.1 Simulação do falar em público (SFP).....	20
3.4.2 Reconhecimento de Expressões Faciais (REF).....	21
3.5. Protocolo clínico	24
3.6. Determinação da concentração plasmática do CBD por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	26
3.6.1. Preparo das amostras	26
3.6.2. Análise cromatográfica	28
3.7. Determinação do Canabidiol e Tetraidrocanabinol	29
3.7.1. Padrões, reagentes e fármacos.....	29
3.7.2. Equipamentos e Acessórios	29
3.7.3. Determinação analítica do Canabidiol e Tetraidrocanabinol por cromatografia gasosa em plasma humano	29
3.7.3.1. Preparo das soluções utilizadas na determinação analítica do canabidiol e tetraidrocanabinol.....	30
3.7.3.1.1. Calibradores	30
3.7.3.1.2. Controles de Qualidade	30

3.7.3.1.3. Padrão Interno.....	30
3.8. Análise estatística	31
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	32
4.1. Avaliação da separação cromatográfica dos analitos e identificação dos íons de identificação e quantificação	32
4.2. Curva de Calibração.....	40
4.3. Farmacocinética e efeitos clínicos.....	40
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS	68
Anexo A. Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.....	68
Anexo B. Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.....	69
Anexo C. Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	70

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* vem sendo utilizada, há séculos, pela humanidade para diversos fins, tais como alimentação, rituais religiosos e práticas medicinais (MECHOULAM, 1973). O primeiro relato do uso medicinal da planta foi atribuído aos chineses, que descreveram os seus potenciais terapêuticos, no Pen-Ts ao Ching, primeira farmacopeia conhecida no mundo, há 2000 anos (MECHOULAM; BEN-SHABAT, 1999).

A potencialidade terapêutica da *Cannabis sativa* está ligada ao grande número de substâncias químicas que já foi encontrado em amostras desta planta, sendo a principal classe a dos canabinóides (MECHOULAM, 1973).

A aplicação terapêutica dos canabinóides é um tema bastante controverso, por estes compostos apresentarem, também, efeitos psicoativos, considerados os principais vilões no uso medicinal dessa classe de compostos (HONÓRIO et al., 2006).

A *Cannabis* pode produzir vários efeitos subjetivos em humanos, tais como, euforia, disforia, sedação, boca seca, taquicardia e hipotensão postural (HOLLISTER, 1986). Do mesmo modo, o consumo de maconha encontra-se associado com prejuízo em diversas funções cognitivas, incluindo memória e percepção do tempo, além de prejuízo no desempenho de tarefas envolvendo tempo de reação, aprendizado, controle motor e atenção. Outros riscos associados à *Cannabis sativa* constituem sintomas de ansiedade em sujeitos vulneráveis (THOMAS, 1996; HALL; SOLOWIJ, 1998). Ataques de pânico e fobia constituem os sintomas agudos mais freqüentemente associados com o uso da *Cannabis* (TUNVING, 1987; THOMAS, 1996; HALL; SOLOWIJ, 1998), e em 20 a 30% dos consumidores apresentam ainda reações agudas e breves de ansiedade. (HOLLISTER, 1986; THOMAS, 1996). Estes sintomas, entretanto, usualmente ocorrem apenas com o uso de altas doses de *Cannabis* e são mais comuns na primeira exposição à droga (MANZANARES et al., 2004).

Outros trabalhos também sugeriram que o uso da planta no Brasil geralmente fumada, na forma de um preparado denominado “maconha”, contendo 5% do princípio psicoativo, delta-9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) (Figura 1), pode estar associado com sintomatologia duradoura de ansiedade. Em uma pesquisa com

peças que regularmente fumam maconha, por pelo menos dez anos, verificou-se que 21 % destes sujeitos apresentavam altos níveis de estado de ansiedade (REILLY et al., 1998), e diversos casos de agorafobia (MORAN, 1986) e de transtorno do pânico (LANGS et al.,1997; DEAS et al.,2000). Mais recentemente, Tournier et al. (2003) observaram que em estudantes universitários, o diagnóstico de agorafobia associou-se significativamente com maior predisposição ao uso de maconha, independentemente do estado de ansiedade ou de outros fatores associados. Além disso, estudos epidemiológicos também demonstraram que o uso crônico de maconha está associado com maior prevalência de comorbidade como os transtornos de ansiedade (MUESER et al.,1998; TROISI et al.,1998; COMPTON et al.,2000; MCGEE et al.,2000; DEGENHARDT et al.,2001).

De modo contrastante, muitos indivíduos mencionam redução de ansiedade e relaxamento como motivação para o uso desta droga (BOYS et al., 1999). Dessa forma, alguns autores apóiam a hipótese de que a maioria dos sujeitos com altos níveis de ansiedade usam maconha como forma de “automedicação” (STEWART et al., 1997). Isto foi parcialmente demonstrado em dois estudos em que foram avaliados os efeitos ansiolíticos do derivado sintético, Nabilone. Em um estudo duplo-cego, controlado por placebo, pacientes com transtornos de ansiedade demonstraram “acentuada redução” dos sintomas, após tratamento com Nabilone por 28 dias (FABRE; MCLENDON, 1981). Resultados similares foram verificados por Ilaria e col. (1981) em 11 pacientes com ansiedade.

Estas constatações conflitantes em relação à ansiedade poderiam ser explicadas pela observação de que os efeitos da maconha sobre a ansiedade parecem ser dose-dependentes, com baixas doses demonstrando propriedades ansiolíticas e doses mais altas sendo ansiogênicas (MANZANARES et al., 2004).

Essa diferença de efeitos observados pode ser explicada pela grande variedade de substâncias encontradas na planta. São mais de 400 componentes, sendo que aproximadamente 60 destes são componentes canabinóides. Dentre os canabinóides o Δ^9 -THC é comumente aceito como principal responsável pelos efeitos da Cannabis, entretanto, vários estudos têm demonstrado que outros componentes da planta influenciam na sua atividade farmacológica (ONAVI; GREEN; MARTIN, 1990; CARLINI et al., 1970). Um desses componentes é o canabidiol (CBD) (Figura 2) que constitui mais de 40% dos extratos de Cannabis

sativa (GRIEL, 1976) e é desprovido dos efeitos psicológicos típicos da *Cannabis* em humanos (ZUARDI et al., 1982), mas pode interagir com o Δ^9 -THC.

Esses canabinóides agem em receptores específicos identificados no cérebro de mamíferos, no final da década de 1980. Nos anos seguintes, foram identificados os ligantes endógenos para esse receptor, os endocanabinóides. Sendo os principais identificados, até então, o araconil-etanolamida, também denominado anandamida, e o 2-araconil-glicerol (MECHOULAM; FRIDE; DI MARZO, 1998) (Figura 3).

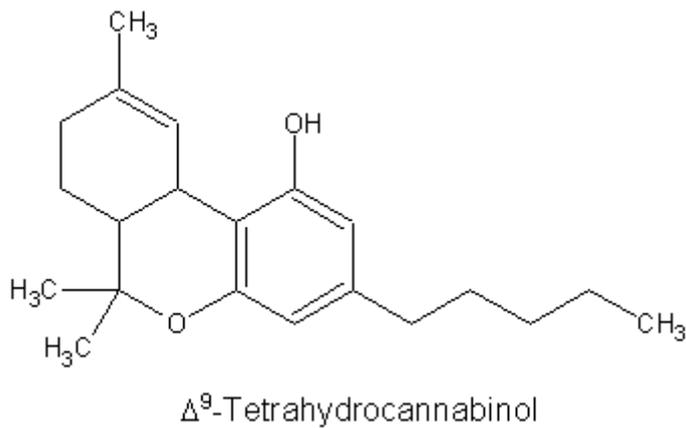


Figura 1- Estrutura do Δ^9 -Tetraidrocanabinol

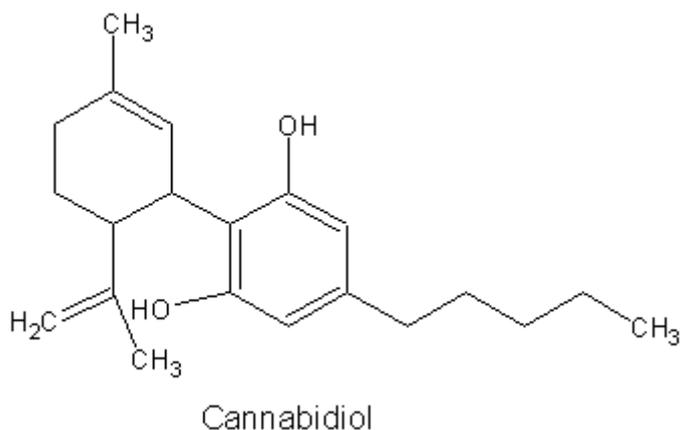


Figura 2 - Estrutura do Canabidiol

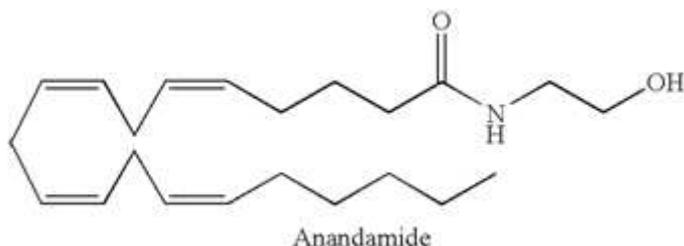


Figura 3 - Estrutura da Anandamida

Em 1990, Howlett e colaboradores observaram que os canabinóides se ligavam a membranas de encéfalo de rato de forma saturável e estereosseletiva. Além disso, observaram significativa correlação entre a ordem de afinidade pelo sítio de ligação e a ordem de potência para indução de efeitos farmacológicos, o que, somado às observações de que pequenas variações estruturais nas moléculas dos canabinóides ocasionavam grandes variações de potência, sugeriram fortemente a existência de um receptor para canabinóides no sistema nervoso de mamíferos. Ainda em 1990, um receptor específico para canabinóides foi clonado e caracterizado e um segundo receptor foi identificado nos anos seguintes. Pela ordem de descoberta, esses receptores foram denominados receptor canabinóide do subtipo 1 (CB1) e subtipo 2 (CB2) (HOWLETT et al., 2002), sendo o primeiro responsável pelos efeitos centrais dos canabinóides, e o segundo, pelos efeitos periféricos. Ambos são receptores acoplados a proteína G, que ativada, inibe a adenilato ciclase, aumenta a atividade de canais de potássio e inibe canais de cálcio, modulando a liberação de outros neurotransmissores (PIOMELLI, 2003). Os receptores canabinóides CB1 e CB2 são particularmente abundantes em algumas áreas do cérebro, sendo que a biologia e o comportamento associado a essas áreas são consistentes com os efeitos comportamentais produzidos pelos canabinóides. Os receptores CB1 são encontrados no sistema nervoso central (SNC) e atinge maior densidade nas células dos gânglios basais e cerebelo, envolvidas nos movimentos de coordenação do corpo (postura e movimento). Também são abundantes no hipocampo, responsável pela aprendizagem, memória e resposta ao stress e, no córtex cerebral, responsável pelas funções cognitivas; estão presentes no sistema nervoso periférico (SNP) e em vários órgãos periféricos (VICENZO;

BIFULCO; PETROCELLIS, 2004). No hipotálamo podem mediar algumas ações dos canabinóides como hipotermia e hiperfagia (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006).

Em contraste, o receptor CB2 estão mais restritos às células e tecidos imunes (VICENZO; BIFULCO; PETROCELLIS, 2004).

Sabe-se que os efeitos do Δ^9 -THC são causados, pelo menos em parte, pela ligação ao receptor CB1 e CB2, agonista parcial cuja atividade depende do nível de expressão e da eficácia do acoplamento com estes receptores, podendo ativá-los ou inibi-los. Por outro lado, apesar do canabidiol apresentar baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2, evidências experimentais têm demonstrado que o CBD é capaz de antagonizar os receptores agonistas CB1 / CB2 em concentrações moderadamente baixas (THOMAS et al., 2007). Este antagonismo provém da habilidade de induzir um agonismo inverso a esse receptor, e, portanto, tendo uma natureza essencialmente não competitiva (PERTWEE, 2008). Apesar de apresentarem muitos efeitos farmacológicos, essas ações parecem depender de um novo receptor canabinóide acoplado a proteína G, chamado receptor GPR55, que pode ser ativado pelos estabelecidos receptores agonistas CB1 / CB2, tais como o Δ^9 -THC e canabinóides endógenos. (HAYAKAWA et al., 2008). A ativação do receptor GPR55 é antagonizada pelo CBD em uma concentração que é inferior a qualquer concentração no qual desloca agonistas dos receptores CB1 ou CB2 (RYBERG et al., 2007).

Apesar de aparentemente agirem em receptores diferentes, existem alguns indícios de que o CBD pode influenciar alguns efeitos do Δ^9 -THC. Entretanto, os estudos são bastante inconclusivos a respeito de como ocorre essa interferência. Alguns trabalhos indicam que o CBD potencializa efeitos benéficos do Δ^9 -THC e atenuam os negativos (KARNIOL; CARLINI, 1974; ZUARDI et al., 1982), enquanto outros mostram não haver nenhuma influência.

Essa interação poderia ainda dever-se a propriedades do CBD opostas as do Δ^9 -THC, entre elas o efeito ansiolítico (ZUARDI et al, 1982; ZUARDI et al, 1993; KARNIOL; CARLINI, 1973; ONAIVI; GREEN; MARTIN, 1990; GUIMARÃES et al., 1990).

Estudos recentes têm demonstrado a ação do CBD no receptor 5-HT1A. O CBD desloca o agonista [3H]8-OHDPAT de receptores 5-HT1A clonados de humanos de um modo dose-dependente. Em estudos de sinal de transdução, o CBD

atua como um agonista no receptor humano 5-HT_{1A} (RUSSO et al., 2005). Esta ação do CBD é provavelmente envolvida no efeito protetor do CBD na isquemia e em seu efeito ansiolítico (CAMPOS; GUIMARAES, 2008; MISHIMA et al., 2005).

1.1. Efeito ansiolítico do canabidiol

Apesar do Δ^9 -THC ser comumente aceito como principal componente responsável pelos efeitos psicoativos da Cannabis, vários estudos têm demonstrado que outros componentes da planta influenciam na sua atividade farmacológica (CARLINI et al., 1970). Um desses componentes é o canabidiol (CBD) que constitui mais de 40% dos extratos de *Cannabis sativa* (GRIEL, 1976) e é desprovido dos efeitos psicoativos típicos da Cannabis em humanos (ZUARDI et al., 1982). Diversos estudos demonstraram que quando o CBD é administrado concomitantemente com o Δ^9 -THC, os efeitos deste último composto são antagonizados. Este antagonismo poderia dever-se a propriedades do CBD opostas as do Δ^9 -THC, que muitas vezes é ansiogênico enquanto o CBD seria ansiolítico (KARNIOL; CARLINI, 1973; ZUARDI et al., 1982; GUIMARÃES et al., 1990; ONAIVI et al., 1990).

Em um estudo inicial conduzido por Zuardi et al. (1982) a administração concomitante de CBD (1 mg/Kg) com uma alta dose de Δ^9 -THC (0,5 mg/Kg) em voluntários saudáveis, atenuou os sintomas ansiogênicos induzidos por este último composto, mas não reduziu o aumento da frequência cardíaca. Estudos posteriores com animais demonstraram que o CBD apresenta propriedades similares aos fármacos ansiolíticos, seja por meio de um paradigma de respostas emocionais condicionadas (Zuardi e Karniol, 1983), do teste de conflito de Vogel (MUSTY et al., 1984) ou do teste de labirinto em cruz elevado (GUIMARÃES et al., 1990; ONAIVI et al., 1990). Usando este último teste, efeitos ansiolíticos foram relatados para três derivados do CBD: HU-219, HU-252 e HU-291 (GUIMARÃES et al., 1990). Do mesmo modo, em camundongos, o CBD também demonstrou aumentar a conduta do animal em evitar situação estressante e reduziu a ocorrência de úlceras induzidas por estresse (MUSTY, 1984).

Baseado nestes estudos pré-clínicos (ZUARDI et al., 1993) testaram diretamente as propriedades ansiolíticas do CBD em voluntários saudáveis. Os

autores compararam os efeitos ansiolíticos do CBD (300mg) com os da ipsapirona (um agonista parcial 5HT_{1A}, 5 mg) e com o diazepam (um ansiolítico benzodiazepínico, 10 mg) em um estudo duplo-cego. Os sujeitos foram submetidos ao teste de simulação de falar em público (TSFP), um modelo em que os voluntários são solicitados a preparar um discurso em frente a uma câmera de vídeo. Este procedimento aumenta a ansiedade subjetiva e dos seus concomitantes fisiológicos e é sensível para avaliar os efeitos de compostos ansiolíticos (GRAEFF et al., 2001). Os resultados demonstraram que o CBD e os outros dois compostos ansiolíticos atenuaram a ansiedade induzida pelo teste (ZUARDI et al., 1993). Na dosagem empregada o CBD não induziu efeitos sedativos. Mais recentemente demonstramos que o CBD (400mg) reduziu significativamente a ansiedade provocada antes do procedimento de aquisição de imagens cerebrais por meio de Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT) em voluntários saudáveis (CRIPPA et al., 2004). Consistente com o efeito ansiolítico observou-se também que o CBD modulou de modo significativo a atividade de repouso predominantemente nas áreas cortical límbica e paralímbica, que comumente estão envolvidas na fisiopatologia da ansiedade (GRAY, 1982; GRAEFF, 1994). Assim, diferenças de atividade entre as duas condições foram detectadas em um agrupamento temporal medial esquerdo, que incluiu porções da amígdala, hipocampo, hipotálamo, giro do cíngulo posterior esquerdo e do giro parahipocampal esquerdo.

Estes efeitos ansiolíticos contrastam com os efeitos ansiogênicos de altas doses de Δ^9 -THC (ZUARDI et al., 1982; MATHEW et al., 1999) e podem ajudar a reconciliar os achados aparentemente conflitantes obtidos com a *Cannabis sativa* em relação à ansiedade (JOHNS, 2001; TOURNIER et al., 2003). Do mesmo modo, estas propriedades ansiolíticas do CBD também poderiam explicar o uso da *Cannabis* por pacientes com transtornos de ansiedade para melhorar sintomas.

Portanto, os resultados destes estudos associados à observação de que o CBD não apresenta tolerância aos efeitos anti-epilépticos (CUNHA et al., 1980) nem provoca dependência ou efeitos tóxicos com o uso crônico (CONSROE et al., 1991), sugerem que o CBD pode ser usado no tratamento dos transtornos de ansiedade (ZUARDI et al., 1993).

1.2. Comportamento Cinético do Canabidiol

Estudos anteriores que mostraram efeitos ansiolíticos do CBD usaram administração oral do CBD dissolvido em óleo (ZUARDI et al., 1993; CRIPPA et al., 2004) ou em pó (FUSAR-POLI et al., 2009; BHATTACHARYY et al., 2009). São poucas as informações sobre nível plasmático do CBD após administração oral. Em estudos realizados por Argurrel et al., o CBD foi preparado em uma solução etanólica e colocado em pequenos bolos de chocolate. Após isso o solvente foi evaporado sob nitrogênio. As preparações foram: 20mg de THC com placebo; 20mg de THC com 40mg de CBD e 20mg de THC com canabinol (CBN). O pico plasmático médio do THC foi de cerca de 5ng/mL atingidos entre 1 e 2 horas. Depois de 10 horas o pico declinou para 1ng/ml. A administração concomitante de CBD com THC não alterou a farmacocinética do último. No estudo de Argurrel et al., observa-se graficamente que o pico plasmático do CBD, administrado concomitantemente com THC, na dosagem de 40mg, é atingido entre 1 e 2 horas, cujo valor é aproximadamente 5ng/mL. Ao final de 10 horas o pico plasmático de CBD caiu para menos de 0,5mg/mL. A disponibilidade sistêmica do CBD fumado variou de 11 a 45% em 5 indivíduos, com um valor médio de 31% (ARGURREL et al., 1986). Nesse mesmo estudo foi calculada uma alta depuração plasmática (960 a 1560 mL/min). Dados de meia-vida disponíveis indicam para o CBD um valor de meia-vida entre 18 e 33h (média de 24h) após administração intravenosa e 27 a 35 h (média 31h) depois de fumado. O volume de distribuição foi estimado em torno de 30L/Kg. Segundo Marilyn A. Huestis, assim como o THC, o CBD está sujeito a um significativo metabolismo de primeira passagem. Entretanto, diferentemente do THC, uma grande percentagem da dose de CBD é excretada inalterada nas fezes. Num estudo de Nadulski et al, observa-se que o CBD inibe o citocromo CYP-2C, o responsável pela hidroxilação do THC, formando o metabólito onze hidróxi tetraidrocanabinol (11-OH-THC). Nesse mesmo estudo um aumento das concentrações de THC e CBD foi encontrado após 120 minutos, o que poderia ser causado por uma melhor absorção dos alimentos.

O CBD é extensamente metabolizado por enzimas microsossomais hepáticas humanas (HLM_s), o chamado complexo CYP-450. Assim, formam-se oito metabólitos monohidroxilados (6 α -OH-, 6 β -OH-, 7-OH-, 1''-OH-, 2''-OH-, 3''-OH-, 4''-OH- e 5''-OH-

CBDs). Entre esses metabólitos, 6 α -OH-, 6 β -OH-, 7-OH- e 4"-OH-CBDs são os principais metabólitos conforme estimado por uma abundância relativa de massa/carga (m/z) igual a 478. Sete, das catorze enzimas CYP humanas recombinantes analisadas (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e CYP3A5) foram capazes de metabolizar o CBD. A correlação entre as atividades das isoformas específicas CYP e atividades oxidativas do CBD em 16 HLMS individuais, indicou que 6 β -OH- e 4"-OH-CBDs foram formados principalmente por CYP3A4. A inibição de CYP3A4 por cetoconazol e anticorpo anti-CYP3A4 confirma essa afirmação. Estudos de inibição também mostraram que 6 α -OH-CBD foi catalisado principalmente por CYP3A4 e CYP2C19, enquanto que 7-OH-CBD foi majoritariamente formado por CYP2C19 (RONGRONG JIANG, SATOSHI YAMAORI, SHUSO TAKEDA, IKUO YAMAMOTO, KAZUHITO WATANABE., 2011)

1.3. Expressão emocional e identidade facial

Expressões faciais são fortes demonstrações não verbais de emoção, que fornecem importantes informações e são vitais na complexidade social do mundo. Reconhecimento da expressão facial nos ajuda a detectar o estado emocional de outra pessoa e fornece sinais sobre como reagem durante interações sociais. Dada sua importância crucial no funcionamento social, ao longo das últimas duas décadas, neurocientistas têm mostrado mais interesse em entender os mecanismos neurais que suportam a percepção facial. Em particular, a imagem de ressonância magnética funcional (fMRI), a qual permite a investigação do cérebro humano *in vivo*, tem sido amplamente empregada para examinar os substratos neurofisiológicos do processamento emocional. (P.FUSAR-POLI et al., 2010).

A habilidade cognitiva para codificar adequadamente a informação de faces humanas tem sido investigada no contexto de muitas desordens psiquiátricas tais como, esquizofrenia, autismo, depressão, Transtorno de ansiedade generalizada (GAD) e transtorno de estresse pós-traumático (PTSD) (J.P. MACHADO DE SOUSA et al., 2010).

Há evidências que pessoas com ansiedade social tendem a evitar o contato olho a olho (MARKS et al.,1969; OHMAN,1986; GREIST,1995). De acordo com Horley e colaboradores (2003) isto poderia ser um indicador de uma exacerbada

sensibilidade social. Estudos com mecanismos visuais têm fornecido dados referentes ao modo que pessoas afetadas interagem com imagens de faces e outros estímulos emocionais (HORLEY et al., 2004). Enquanto pacientes com GAD apresentam um padrão convencional para visualizar figuras com potencial de ameaça social (FREEMAN et al., 2000), pacientes com fobia social demonstram um padrão que tem sido chamado hipervigilância/evasão. Conforme este padrão, pacientes com fobia social apresentam um primeiro estágio caracterizado por atenção aumentada para demonstrações negativas de emoção, tais como faces aborrecidas ou nervosas, seguido por uma tentativa de evitar esses estímulos aversivos.

Estudos envolvendo voluntários sadios mostram que faces com sentimento de ira são mais rapidamente detectadas entre as faces neutras que entre as faces felizes, apresentadas nas mesmas condições. Entretanto, pacientes com fobia social parecem ser mais rápidos em detectar faces com sentimento de ira comparado aos grupos controles saudável.

Em um estudo prévio de imagem de ressonância magnética funcional (fMRI) foi mostrado que o canabidiol, mas não o Δ^9 -THC, atenuou a resposta neural em estruturas do sistema límbico tais como a amígdala e o córtex cingulado anterior (ACC) durante a apresentação de faces amedrontadoras e esse efeito teve correlação significativa com a resposta de condutância da pele (FUSAR-POLI et al., 2009). A amígdala é normalmente ativada quando indivíduos são apresentados a estímulos negativos (BREITER et al., 1996; MORRIS et al., 1996, 1998, 1999; PHILIPS et al., 1997, 1998), enquanto o córtex cingulado está criticamente envolvido no processamento da informação emocional tanto em animais (HADLAND et al., 2003; RUDE BECK et al., 2006) como em humanos (KILLGORE; YURGELUM-TODD, 2004)

Há evidência de conexões anatômicas entre ACC e amígdala (GLASHGAEI et al., 2007) e estudos prévios de Neuroimagem em humanos já sugeriram que ACC está envolvido com amígdala na resposta ao medo e ansiedade (BUSH et al., 2000; PISSIOTA et al., 2003; DAS et al., 2007). Com base em descobertas anteriores (BHATTACHARYY et al., 2009; FUSAR-POLI et al., 2009) foi previsto que o canabidiol, mas não o Δ^9 -THC, mostraria um efeito modulatório nesta rede durante o processamento de faces amedrontadoras. Neste estudo os efeitos do canabidiol

sobre ativação nas regiões límbica e para-límbica contribuiu para sua capacidade de reduzir excitação autonômica e ansiedade subjetiva (P.FUSAR-POLI et al., 2010)

1.4. Vias alternativas para administração do Canabidiol

Como o CBD sofre um intenso metabolismo de primeira passagem e apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, rotas alternativas de liberação do fármaco tornam-se importantes para se obter maior eficácia terapêutica e contornar o metabolismo de primeira passagem. Um possível método, para aliviar a dor crônica em pacientes, seria através da rota transdérmica. Outra rota potencial para administração sistêmica seria a intranasal (IN), o que resulta em rápida absorção sanguínea. A liberação intranasal da droga apresenta vantagens em relação à injeção da droga, pois consiste em um tratamento não invasivo, livre de dor, e que melhora a adesão do paciente ao tratamento.

A absorção nasal do CBD em camundongos foi rápida ($T_{MA} \leq 10$ minutos). O CBD foi detectado na primeira amostra coletada 5 minutos após administração IN. Dentre as maiores preocupações nas formulações IN é a sensibilidade da mucosa nasal para solventes e outros aditivos das formulações. O polietileno glicol (PEG) foi usado como veículo nesse estudo, uma vez que exerce uma leve toxicidade local na mucosa. Assim, o PEG pode ser menos irritante quando comparado com outros glicóis, como polipropileno glicol (PG).

O estado de equilíbrio da concentração plasmática de CBD em porquinhos da índia, depois da aplicação transdérmica do gel, foi 6.3 ± 2.1 ng/mL o que foi atingido em 15.5 ± 11.7 horas. A obtenção de um significativo estado de equilíbrio da concentração plasmática sugere que o CBD é útil para o tratamento da dor crônica através dessa rota de administração. O uso de Transcutol HP (dietileno glicol monoetil éter EP/USP-NF), um intensificador para permeabilização do CBD pela pele, aumenta a concentração plasmática do CBD em 3.7 vezes. Ele age como um solubilizante e é adequado, pois não é tóxico e é compatível com a pele. O Transcutol aumenta a taxa de permeabilização, na pele, para várias drogas. Ele é usado na formulação do gel (KALPANA S. PAUDEL; DANA C. HAMMELL; REMIGIUS U. AGU; SATYANARAYANA VALIVETI; AUDRA L. STINCHCOMB, 2010).

1.5. Outras aplicações terapêuticas do Canabidiol

Estudos preliminares revelam que o Canabidiol é capaz de prevenir o desenvolvimento de Alodinia induzida por Paclitaxel em fêmeas de camundongos C57BI6 (WARD SJ; RAMIREZ MD; NEELAKANTAN H; WALKER EA; 2011). O Paclitaxel consiste em uma droga usada no tratamento de cânceres de mama, ovário, esôfago, bexiga, cabeça e pescoço. Sua ação farmacológica baseia-se na inibição da mitose por se ligar especificamente à subunidade β -tubulina dos microtúbulos e antagoniza a desorganização dessa proteína-chave citoesquelética, resultando no aparecimento de feixes de microtúbulos e estruturas aberrantes derivadas de microtúbulos na fase mitótica do ciclo celular. Consequentemente ocorre interrupção da mitose. O uso prolongado pode causar maior incidência de hipersensibilidade, mialgia e neuropatia. Alodinia consiste em um distúrbio da atividade cerebral que se manifesta como uma sensação de dor, quando o estímulo não é doloroso. Segundo o estudo realizado por esse grupo, o tratamento concomitante com CBD preveniu o desenvolvimento de Alodinia mecânica e fria induzida pelo Paclitaxel. A eficácia do CBD pode ser devido à diminuição dos níveis de citocinas próinflamatórias, uma vez que o Paclitaxel aumenta a expressão dessas citocinas.

Outra patologia que vislumbra um futuro tratamento com Canabidiol é a Retinopatia Diabética (RD), que consiste em alterações do fluxo sanguíneo da retina. A RD detectada mais facilmente é a não proliferativa, subdividida clinicamente em três categorias: leve, moderada e severa. Dilatação venosa e microaneurismas são as primeiras alterações, seguidas de hemorragia intraretinal e exsudação. O vazamento de líquido dentro da retina ocasiona um edema macular, que se não tratado, pode levar a perda irreversível da visão. Caso a hiperglicemia persista, a RD evolui para as formas moderada e severa. Resumidamente, a RD não proliferativa caracteriza-se por: isquemia, o que resulta em maior permeabilidade vascular; dispersão hemorrágica e anormalidades venosas (capilares dilatados). O progresso da RD pode levar à proliferação de novos vasos, do nervo ótico ou de qualquer lugar da retina. Eles são extremamente frágeis e tendem a sangrar facilmente, o que acarreta hemorragia vítrea. Com o passar do tempo, a neovascularização tende a sofrer fibrose e contração, levando ao deslocamento da

retina. Além disso, os novos vasos surgem da íris em uma malha trabecular da câmara anterior acarretando glaucoma neovascular. Os aspectos moleculares abrangem reações inflamatórias vasculares, pelo aumento da liberação de citocinas, expressão elevada de moléculas de adesão de leucócitos (CD18) e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM1). Formam-se também espécies reativas de oxigênio (ROS), superóxido e peroxinitrito. A atividade terapêutica do Canabidiol enquadra-se justamente com antioxidante, além de efeitos imunossupressores. O Canabidiol captura ROS e bloqueia a atividade da oxidase de NADPH. Essa droga também atenua as respostas inflamatórias das células endoteliais induzidas pela hiperglicemia. O Canabidiol não só captura, mas também inibe a formação de ROS e do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). Atualmente, estudos pré-clínicos têm fornecido fortes evidências dos efeitos intraoculares anti-inflamatórios do CBD. Em humanos o CBD é bem tolerado quando administrado cronicamente (GI LIOU; AB EL-REMESSY; AS IBRAHIM; RB CALDWELL; YM KHALIFA; A GUNES; JJ NUSSBAUM; 2009).

Uma vez que as propriedades ansiolíticas do CBD podem ser mediadas por ativação do receptor $5HT_{1A}$, e essa modulação pode induzir efeitos antidepressivos, essa hipótese tem sido recentemente testada usando o teste de natação forçada em ratos. Assim como a imipramina (30mg/Kg), usada como antidepressivo padrão, CBD (30mg/Kg) diminuiu o tempo de imobilidade dos ratos submetidos ao teste. Os efeitos do CBD foram suprimidos por um tratamento prévio com antagonista do receptor $5HT_{1A}$, sugerindo que o efeito antidepressivo é mediado por esse receptor (CRIPPA JAS et al., 2010).

Nesse mesmo estudo foram revisados os efeitos antipsicóticos do CBD. Relatou-se o uso da droga por três mulheres, cujas idades eram 22 e 23 anos, diagnosticadas com esquizofrenia e resistentes ao tratamento convencional com antipsicóticos. Os pacientes foram hospitalizados e receberam placebo durante os primeiros cinco dias. Do 6º ao 35º receberam CBD, placebo por mais cinco dias e nos últimos 15 dias foram tratadas com olanzapina. A dose inicial de CBD foi 40mg/dia, aumentada gradualmente até 1.280mg/dia. Os pacientes foram acompanhados por um psiquiatra, responsável pelo ajuste de dose, e dois psiquiatras que desconheciam a dosagem usada no momento. Esses dois últimos sujeitos aplicaram a escala de avaliação psiquiátrica leve (BPRS) e outra escala

para avaliar os efeitos adversos. Dois desses sujeitos testados apresentaram uma leve melhora com CBD, e o terceiro não respondeu ao CBD. Todos os sintomas foram exacerbados quando o CBD foi retirado. Somente um paciente melhorou mais com olanzapina que com o CBD, mas nenhum desses pacientes apresentou efeitos adversos com CBD (CRIPPA JAS et al., 2010).

Os efeitos ansiolíticos estão associados a alterações do sistema imune. Estas alterações envolvem uma maior produção de citocinas inflamatórias tais como IL- β 1, TNF- α , IL-6, e IL-17.

Estas citocinas inflamatórias são responsáveis por mediar intensa quimiotaxia de neutrófilos para sítios de inflamação (ANDOH et al., 2001; JOVANOVIC et al., 1998; MATSUZAKI; UMEMURA, 2007; GUTCHER; BECHER, 2007).

Em um estudo que compara Transtorno de ansiedade generalizada (GAD) com um grupo controle, verificou-se no primeiro um maior aumento de IL-17 e TNF- α principalmente, com uma tendência a aumento de IL-6 e IL- β 1. Estas citocinas são produzidas por células Th-17 (MORGANA et al., 2010). Neste mesmo estudo a produção de citocinas Th1 e IL-2 foi maior no grupo controle. Outras citocinas com valores maiores nos grupos controle foram as produzidas por células Th2: IL-4 e IL-5. E entre as citocinas anti-inflamatórias, IL-10 foi significativamente menor no grupo com GAD.

Em outro estudo, que fez uso do teste de labirinto em cruz elevado, utilizaram-se ratos machos aos quais se induziu o comportamento de ansiedade. Observou-se ao final uma expressão aumentada de RNAm no Hipocampo para as citocinas inflamatórias IL-1 e IL-6 (M. SKURLOVA, 2010). O estresse pode causar danos não só ao sistema imune, mas também aos sistemas endócrino e nervoso. Tais perturbações podem afetar o eixo de comunicação cérebro-intestino e levar a uma desordem na função gastrointestinal, como por exemplo, a síndrome do cólon irritável (IBS). No estudo que avaliou esta síndrome o plasma foi analisado para citocinas inflamatórias e cortisol e danos morfológicos no cólon também foram avaliados. Os níveis de citocinas inflamatórias foram maiores nos grupos submetidos a estresse quando comparados a grupos controle (H.M. SAVIGNAC et al., 2011).

Esses achados corroboram para a realização de um maior número de estudos investigativos sobre os efeitos ansiolíticos do Canabidiol.

2. OBJETIVOS

- Analisar duas diferentes formas de administração do CBD, cápsulas com o CBD puro (pó) e cápsulas com o fármaco dissolvido em óleo de milho, e verificar a curva temporal dos níveis plasmáticos com as duas formulações diferentes do CBD (pó e em óleo);
- Correlacionar as concentrações plasmáticas de CBD com testes ansiogênicos e na identificação de expressões faciais;
- Verificar se as absorções de CBD oriundas da administração de 150mg de CBD em pó e em óleo são significativamente diferentes de zero;
- Constatar se a concentração plasmática relativa à administração de cápsulas contendo CBD em óleo é significativamente maior que a concentração plasmática relativa à administração de cápsulas preenchidas com CBD em pó.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram avaliados 39 voluntários saudáveis do sexo masculino, não tabagistas, com idades entre 18 e 35 anos, cuja exposição à *Cannabis* ao longo da vida não excedesse 15 vezes, e que não tivessem feito uso da mesma ao longo do último mês.

Os voluntários foram randomicamente alocados em três grupos de 13 sujeitos para receberem CBD em pó, CBD dissolvido em óleo de milho e placebo. Os grupos foram emparelhados em relação à idade, escolaridade (nível superior), índice de massa corpórea (IMC: 24 ± 3). Para assegurar o pareamento, o primeiro participante teve seu tratamento sorteado entre as três formas disponíveis; o próximo (que tenha características pareadas com o primeiro) teve o tratamento sorteado entre as duas formas restantes; e o terceiro (pareado com os dois anteriores) obrigatoriamente recebeu o tratamento que faltava.

Os critérios de exclusão foram: uso de qualquer medicação, presença de doença física ou mental e tabagismo. Foi solicitado aos participantes, que se abstivessem da ingestão de bebidas alcoólicas e compostos com cafeína nas 24 horas que antecederam o estudo.

3.2. Cápsulas de CBD

O CBD em pó, com aproximadamente 99,9% de pureza foi fornecido pela THC-Pharm (Frankfurt, Alemanha). Foram acondicionados em cápsulas de gelatina idênticas 150 mg de CBD em pó ou dissolvido em óleo de milho e amido (placebo).

3.3. Instrumentos de avaliação

Medidas Psicológicas

1) **Escala Analógica de Humor** (*Visual Analogue Mood Scale –VAMS*) (NORRIS, 1971). Trata-se de uma escala composta por 16 itens, sendo que cada

um destes possui uma linha reta de 100 mm que liga dois adjetivos opostos (Figura4). O sujeito assinalou como se sentia no momento do preenchimento com relação a cada uma das condições com um traço vertical, sendo que o centro da linha é como o mesmo se sente habitualmente e, seguindo para os opostos, aumenta a intensidade de uma ou outra condição. Esta escala foi traduzida por Zuardi et al. (1993) e a mesma foi dividida em 4 fatores (sedação mental, sedação física, ansiedade, outros sentimentos e atitudes) semelhantes a versão original. No entanto, o presente estudo utilizou a nomenclatura proposta por Parente et al., 2005, os quais propuseram as seguintes denominações: (1) ansiedade; (2) sedação (no lugar de sedação mental); (3) prejuízo cognitivo (no lugar de sedação física) e (4) desconforto (no lugar de outros sentimentos e atitudes).

2) Escala de identificação de ansiedade traço-estado (IDATE) a qual foi designada para avaliar sintomas psicológicos que pudessem, indiretamente, afetar a ansiedade (Figura5). É composta por 20 itens, nos quais os indivíduos assinalaram como se sentiam no momento, variando de quase nunca (0) até quase sempre (4).

V A M S

SUJEITO: FASE:.....

INSTRUÇÕES: Avalie como você se sente agora em relação aos itens abaixo e marque cada linha com um traço vertical no ponto que melhor descreve seus sentimentos. O centro de cada linha indica como você habitualmente se encontra e as extremidades indicam o máximo de cada condição.

ALERTA	_____	SONOLENTO
CALMO	_____	AGITADO
FORTE	_____	FRACO
CONFUSO	_____	COM IDÉIAS CLARAS
ÁGIL	_____	DESAJEITADO
APÁTICO	_____	DINÂMICO
SATISFEITO	_____	INSATISFEITO
PREOCUPADO	_____	TRANQUILO
RACIOCÍNIO DIFÍCIL	_____	PERSPICAZ
TENSO	_____	RELAXADO
ATENTO	_____	DISTRAÍDO
INCAPAZ	_____	CAPAZ
ALEGRE	_____	TRISTE
HOSTIL	_____	AMISTOSO
INTERESSADO	_____	DESINTERESSADO
RETRAÍDO	_____	SOCIÁVEL

Figura 4: Escala analógica de sintomas somáticos (VAMS)

QUESTIONÁRIO DE AUTO-AVALIAÇÃO IDATE PARTE II

NOME: _____ DATA: ___/___/___

INSTRUÇÕES: Leia cada pergunta e faça um círculo ao redor do número à direita que melhor indicar como você se sente. Não gaste muito tempo em uma única afirmação, mas tente dar a resposta que mais se aproximar de como você se sente geralmente.

	Quase nunca (1)	As vezes (2)	Frequentemente (3)	Quase sempre (4)
01. Sinto-me bem _____	1	2	3	4
02. Canso-me facilmente _____	1	2	3	4
03. Tenho vontade de chorar _____	1	2	3	4
04. Gostaria de ser tão feliz quanto os outros parecem ser _____	1	2	3	4
05. Perco oportunidades porque não consigo tomar decisões rápidas _____	1	2	3	4
06. Sinto-me descansado _____	1	2	3	4
07. Sinto-me calmo, ponderado e senhor de mim mesmo _____	1	2	3	4
08. Sinto que as dificuldades estão se acumulando de tal forma que não as consigo resolver _____	1	2	3	4
09. Preocupo-me demais com as coisas sem importância _____	1	2	3	4
10. Sou feliz _____	1	2	3	4
11. Deixo-me afetar muito pelas coisas _____	1	2	3	4
12. Não tenho confiança em mim mesmo _____	1	2	3	4
13. Sinto-me seguro _____	1	2	3	4
14. Evito enfrentar crises e problemas _____	1	2	3	4
15. Sinto-me deprimido _____	1	2	3	4
16. Estou satisfeito _____	1	2	3	4
17. Às vezes ideias sem importância entram em minha cabeça e ficam me preocupando _____	1	2	3	4
18. Levo os desapontamentos tão a sério que não consigo tirá-los da cabeça _____	1	2	3	4
19. Sou uma pessoa estável _____	1	2	3	4
20. Fico tenso e perturbado quando penso em meus problemas do momento _____	1	2	3	4

Figura 5: Escala de identificação ansiedade traço estado (IDATE)

Medidas fisiológicas

A pressão arterial (PA) foi avaliada por meio de um aparelho de mercúrio (Becton Dickson, Brasil) e a frequência cardíaca foi aferida através do pulso periférico.

3.4. Testes ansiogênicos

3.4.1 Simulação do falar em público (SFP)

O procedimento de SFP foi similar ao usado por McNair et al (1982) com as modificações introduzidas por Guimarães et al. (1987). A sessão experimental foi conduzida em uma sala com atenuação sonora e temperatura controlada. As medidas basais foram realizadas no início da sessão experimental (B), antes dos tratamentos. No início do teste foram realizadas as medidas pré-estresse (Pré) e em seguida o voluntário assistiu a um vídeo com as instruções da tarefa.

Nessas instruções o voluntário foi solicitado a realizar um discurso sobre “O Sistema de transporte de sua Cidade”, e lhe foi dito que o discurso seria gravado e posteriormente analisado por psicólogos. Foi explicado que os sujeitos teriam 2 minutos para preparação do mesmo e que o discurso seria interrompido na metade para preenchimento de escalas.

Após espera de 2 minutos de preparação da fala, foram realizadas as medidas antecipatórias da fala (A). O discurso foi então iniciado, com o sujeito tendo a oportunidade de se visualizar em tela de TV enquanto realizava a atividade. O discurso foi interrompido no meio (após dois minutos) para que pudesse ser tomadas medidas de desempenho (D). Vinte minutos após o encerramento do discurso foram realizadas medidas pós-estresse (Pós). Os avaliadores estavam “cegos” em relação ao grupo ao qual o sujeito pertencia.

3.4.2 Reconhecimento de Expressões Faciais (REF)

Tarefas de reconhecimento das expressões faciais-Tarefa touch

Os participantes não familiarizados com os estímulos foram submetidos a uma sessão cuja tarefa consistiu em indicar a emoção apresentada na expressão do indivíduo (estímulo apresentado).

Os estímulos, utilizados, foram fotografias de diversos atores representando características típicas de diversas emoções básicas. Tais estímulos foram anteriormente padronizados por Ekman e Friesen (1976).

As emoções escolhidas para realização da tarefa foram: alegria, tristeza, medo, nojo, raiva, e surpresa (Figura6).



Figura 6: Exemplo da representação das seis emoções básicas por um dos atores

Os estímulos foram manipulados para que se apresentassem diversas intensidades para cada emoção, partindo-se de faces neutras (0%) até chegar à representação típica de uma expressão emocional (100%).

Nesta tarefa o sujeito deveria focar com maior ponderação os elementos ou características faciais menos mutáveis como rosto, olhos, nariz e boca, ao invés dos aspectos mutáveis como cabelo, por esta razão, cabelos e orelhas foram retirados de todos os estímulos.

Confecção dos estímulos

Os filmes utilizados na tarefa foram confeccionados com o objetivo de transformar imagens estáticas em imagens dinâmicas, possibilitando assim avaliar a influência desta variável, além de permitir maior precisão nas análises dos dados no que diz respeito à intensidade necessária para o reconhecimento.

Através de um software as imagens que representam cada emoção foram manipuladas ao serem submetidas à técnica de computação gráfica *morphing*. O algoritmo de *morphing* pode gerar qualquer imagem no contínuo de A para B e a posição da imagem neste contínuo é especificada parametricamente. Essa parametrização é que nos dá a proporção de A e B na imagem gerada e, conseqüentemente a similaridade em relação a A ou B pode ser controlada (BENSON; PERRET, 1991).

Para fazer o morfismo entre faces, através do software, é necessário marcar manualmente todos os pontos que definem os contornos da face e de cada elemento facial. Para cada ponto na primeira face há seu equivalente na segunda. Utilizando esses pontos como referencial de “partida” e “alvo”, o algoritmo de *morph* gera as figuras intermediárias entre uma face e outra.

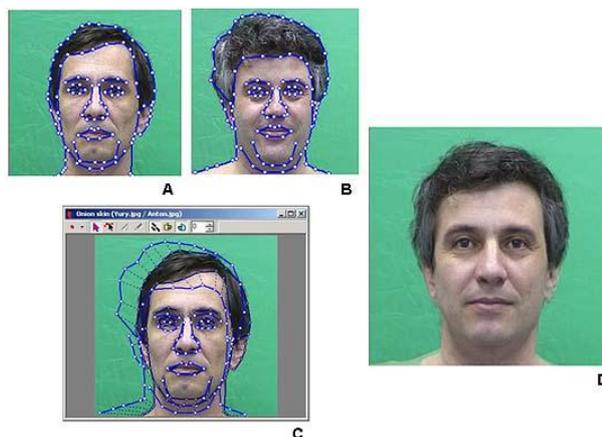


Figura 7: Evolução da criação de imagens intermediárias utilizadas na tarefa de reconhecimento de expressões faciais.

Todos os pontos que definem o contorno e os elementos faciais das faces A e B são marcados. Para cada ponto na face A, existe um correspondente na face B. Os pontos equivalentes das faces A e B são sobrepostos e as distâncias vetoriais entre eles são determinadas como na face C. A imagem D representa uma imagem

intermediária de A e B (50%). Desta forma, cada imagem que representa características típicas de cada emoção é submetida ao morfismo com uma imagem neutra, o que gera 1000 imagens intermediárias com acréscimo de 0,001% de uma para outra. Tais imagens são transferidas para um software de edição de vídeos dando assim origem a cada filme que conseqüentemente será constituído por 1000 imagens. A primeira imagem apresentada em cada filme é uma imagem neutra (0%) e a última é uma representação típica da expressão emocional (100%). Cada filme teve a duração de 10 segundos.

Descrição da Tarefa

Cada sujeito foi submetido à apresentação de 24 filmes, constituídos por 1000 imagens cada, com duração de dez segundos. Foram 6 emoções (alegria, tristeza, medo, nojo, raiva e surpresa) apresentadas 4 vezes e representadas por 4 atores diferentes (2 do sexo masculino e 2 do sexo feminino).

A ordem de apresentação dos filmes, bem como se o sujeito julgou primeiramente faces masculinas, ou femininas, foi aleatório.

Os filmes foram apresentados na tela do computador e assim que o participante foi capaz de reconhecer a emoção que estava se transformando no filme pôde parar o avanço do vídeo e deu a resposta de qual emoção foi reconhecida. Os dados relacionados ao tempo, intensidade e acurácia no reconhecimento foram salvos automaticamente no computador.

Para realização desta tarefa foi utilizado um computador, os estímulos a serem apresentados e um monitor *touch screen*. A adoção de um monitor *touch screen* nesta tarefa é justificada com o objetivo de reduzir possíveis agentes que acarretassem uma provável distração durante a tarefa, como a procura de botões correspondentes às emoções reconhecidas, o que geralmente é analisado posteriormente como tempo que o sujeito levou para reconhecer a emoção, sendo esta uma possível limitação das tarefas já adotadas até o momento.

O sujeito foi instruído sobre a forma de realização da tarefa da seguinte forma:

Após tocar na tela do monitor começará a apresentação de filmes de pessoas representando alguma emoção em sua expressão facial. Você deverá identificar essa emoção. São possíveis as seguintes respostas: alegria, tristeza, nojo, raiva,

surpresa e medo. Serão apresentados dois filmes antes de começar a tarefa em si para que você possa se adaptar e posteriormente serão exibidos 24 filmes de imagens que farão parte da tarefa. Para conclusão da tarefa você deverá emitir 26 respostas. A primeira imagem que aparecerá é a face neutra do indivíduo. Ou seja, sem esboçar nenhuma emoção. Conforme o filme for avançando o indivíduo aparecerá com um pouco mais de emoção e, assim, gradativamente a imagem se aproximará da emoção plena. Quando você for capaz de identificar a emoção apresentada, deverá tocar com um dedo na tela do monitor, esse ato fará com que o filme pare de ser apresentado e então aparecerá uma tela com as seis possíveis respostas, então você deverá tocar com o dedo na tela do monitor sobre a emoção que você reconheceu. Após tocar sobre a emoção correspondente, a tela do monitor ficará completamente branca com uma cruz no meio. Para iniciar a apresentação de um novo filme toque sobre a tela. Você deverá repetir esse procedimento até que apareça uma tela agradecendo sua participação. Cada filme tem duração de dez segundos, não é necessário esperar o avanço de todo o filme, pois a intenção é que você nos diga qual emoção reconheceu no momento exato que a reconheceu. No entanto, passado o tempo de duração do filme aparecerá uma tela solicitando que você responda qual emoção foi apresentada, você deverá então dar uma resposta necessariamente. Caso contrário, não conseguirá avançar na tarefa. Uma mensagem aparecerá informando-lhe quando isso ocorrer. Você terá tempo livre para realização da tarefa.

3.5. Protocolo clínico

Os voluntários chegaram ao laboratório após o jejum padronizado pelo estudo, constituído por leite achocolatado, pão com manteiga e uma maçã média. Inseriu-se uma cânula venosa no braço esquerdo, para os destros, ou direito para os canhotos. Em seguida foi coletada a primeira amostra de sangue e realizadas as primeiras medidas (Basal).

Após as medidas basais os voluntários receberam uma cápsula contendo um dos tratamentos. Através do cateter na veia puncionada, foram coletadas amostras de sangue aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 minutos após ingestão da droga. Após coleta de 90 minutos os voluntários foram submetidos ao teste de simulação

do falar em público e após a coleta de 150 minutos, ao teste de reconhecimento de expressões faciais (tabela 1). Cada voluntário participou de uma única sessão experimental.

Tabela 1: Protocolo para procedimento experimental

Protocolo para sessão experimental					
Tempo real	Tempo (min)	Procedimento	Fase	Amostra de sangue	Escalas
	-15	Implantação da cânula venosa	Basal	1º amostra	1º escala
	0	Ingestão da droga ou placebo			
	30			2º amostra	
	60			3º amostra	
	90	Termo de consentimento (2)	Pré-teste	4º amostra	2º escala
	95	Instruções do teste SFP			
	98	Preparação da Fala (2 min)			
	100		Antecipação da fala		3º escala
	105	Início da Fala (2 min)			
	107	Interrupção da Fala	Fala		4º escala
	113	Continuação da Fala (2 min)			
	115	Conclusão da Fala			
	120			5º amostra	
	130		Pós Fala (1)		5º escala
	150		Pós Fala (2)	6º amostra	6º escala
	155	Reconhecimento expressões faciais			
	180		Pós face	7º amostra	7º escala
	240			8º amostra	

3.6. Determinação da concentração plasmática do CBD por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

3.6.1. Preparo das amostras

Adicionou-se a 500 µL de plasma, 50 µl da solução do padrão interno Δ^9 THC-d₃, e posteriormente agitou-se em vórtex por 30 segundos.

Foram acrescentados 2,5 ml de éter de petróleo em todos os tubos e agitados em agitador mecânico por 30 minutos, posteriormente centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos.

Em seguida, 1 ml foi retirado da fração orgânica e evaporado até a secura sob fluxo de ar a 37° C, em um concentrador de amostras.

O resíduo obtido foi ressuspendido em 50 µL de acetonitrila agitados vigorosamente em vórtex por 30 segundos, 40 µL foram transferidos para o frasco do amostrador automático onde foram acrescentados 20 µl de NO-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) para a derivatização que ocorreu em 45 minutos a 80° C.

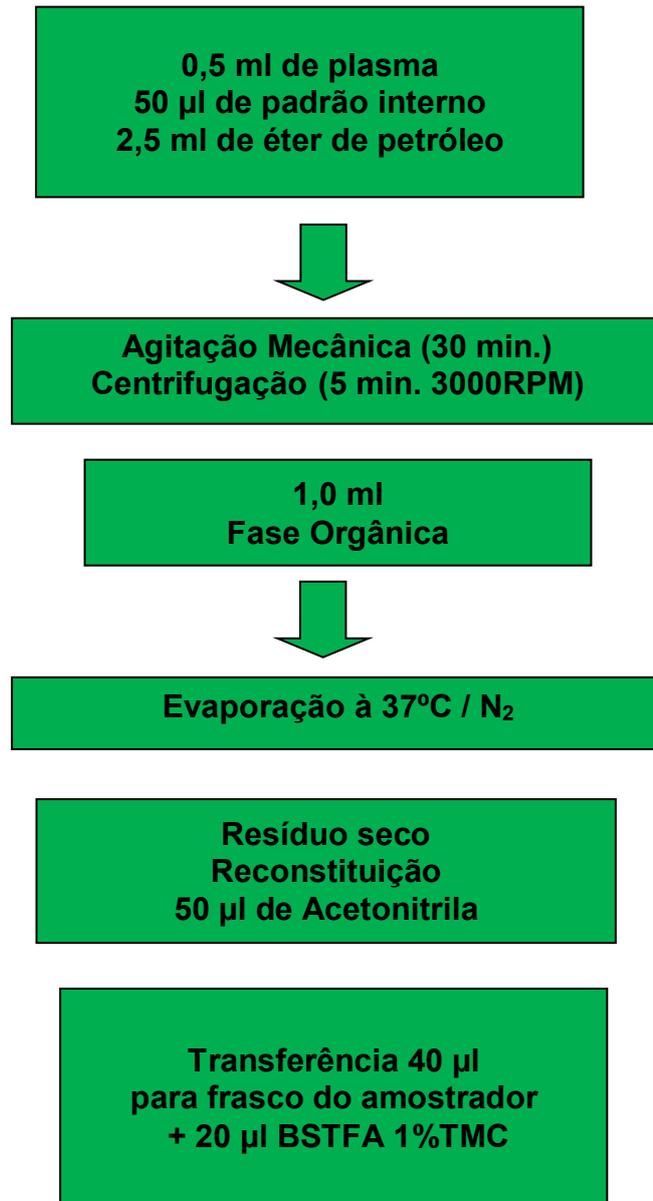


Figura 8: Procedimento de preparo de amostras de voluntários

3.6.2. Análise cromatográfica

Para a determinação das concentrações plasmáticas do Canabidiol foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa acoplada ao detector de massas. O composto foi separado utilizando uma coluna capilar HP-5MS (5% Fenil-metilpolisiloxano – 30 m x 0,25 mm, filme 0,25 μm), Agilent Technologies EUA, e Hélio como gás de arraste no fluxo de 1,0 ml/min.

A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, mantida por 1 minuto, em seguida aquecida até 250°C na razão de 30°C/min e ao chegar em 250°C, um aquecimento mais lento de 10°C/min até 300°C. A temperatura do injetor ficou em 260°C. As injeções das amostras foram feitas no modo *splitless*.

Os padrões foram secos, derivatizados e injetados Inicialmente no modo *Full scan* de detecção, no qual um grande intervalo de íons é monitorado; neste modo foi obtido um espectro de massas de cada composto. Após a obtenção do espectro de massas de cada analito, foram selecionados os íons mais abundantes para a utilização do modo SIS (*Single Ion Selected*) de detecção. No modo SIS os cromatogramas apresentam um menor ruído, o que aumenta a razão sinal/ruído, melhorando as análises quantitativas.

Para a identificação dos compostos derivatizados foram monitorados os íons apresentados na tabela abaixo.

Tabela 2: Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos.

	CBD	$\Delta^9\text{THC}$	$\Delta^9\text{THC-d3}$
<i>Íons de Identificação</i>	375, 390, 391	371, 372, 386	374, 375, 389
<i>Íons de Quantificação</i>	390	371	374

3.7. Determinação do Canabidiol e Tetraidrocanabinol

3.7.1. Padrões, reagentes e fármacos.

Padrões de Δ^9 THC (1 mg/ml) e Δ^9 THC-d3 (1 μ g/ml) ambos diluídos em metanol foram adquiridos da empresa Cerilliant, EUA. Padrão de CBD foi adquirido da empresa THC Pharm, Frankfurt, Alemanha. O agente derivatizante NO-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMC) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Metanol grau HPLC foi adquirido da empresa J.T. Baker®, EUA; hexano da Mallinckrodt, EUA; éter de petróleo e acetonitrila foram adquiridos da empresa Merck Darmstadt, Alemanha.

O plasma humano branco (colhido de indivíduos não expostos ao canabidiol e tetraidrocanabinol) foi doado pelo Banco de Sangue do Hospital São Francisco, Ribeirão Preto, São Paulo.

3.7.2. Equipamentos e Acessórios

- Cromatógrafo em fase gasosa CP3800 acoplado a um espectrômetro de massas modelo Saturn 2000, ambos da empresa Varian, EUA.
- Amostrador automático CombiPal CTC, Suíça.
- Centrifuga Universal 32 Hettich, Alemanha.
- Concentrador de Amostras Caliper LifeScience Turbo Vap LP, EUA.
- Banho seco TE – 021, Tecnal, Brasil.
- Agitador TE – 140, Tecnal, Brasil.

3.7.3. Determinação analítica do Canabidiol e Tetraidrocanabinol por cromatografia gasosa em plasma humano

A investigação do Δ^9 THC foi incluída na metodologia por duas razões:

1) Por se tratar o CBD de uma substância extraída diretamente da planta, a possibilidade, ainda que remota, da presença de resíduos de Δ^9 THC que poderiam potencialmente interferir nos resultados clínicos deve ser investigada.

2) Devido ao fato da maconha ser uma droga bastante difundida entre os jovens, em particular entre os universitários, ainda que tenha sido feitas as devidas recomendações aos voluntários para a não utilização da droga antes e durante os experimentos, caso este consumo ocorra, a presença do Δ^9 THC será detectada, o que contribuirá para a interpretação dos resultados clínicos.

3.7.3.1. Preparo das soluções utilizadas na determinação analítica do canabidiol e tetraidrocanabinol

3.7.3.1.1. Calibradores

Foram preparadas soluções padrões de Δ^9 THC a partir de uma ampola de 1 mL, que foi diluída em metanol originando as seguintes concentrações: 100, 200, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 ng/ml de metanol.

O CBD foi inicialmente pesado para o preparo de uma solução estoque de 1 mg/ml de metanol. Foram pesadas 10 mg do sal e estas diluídas em 10 ml de metanol, a partir dessa solução foram feitas soluções nas concentrações de 100, 200, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 ng/mL de metanol.

3.7.3.1.2. Controles de Qualidade

Foram preparadas também soluções para o controle de qualidade de níveis baixo, médio e alto, diluídas a partir das soluções de 10000 ng/L de metanol, a concentrações de 300, 1400 e 3600 ng de CBD e Δ^9 THC/mL de metanol.

3.7.3.1.3. Padrão Interno

Para o padrão interno deuterado uma solução de 1000 ng de Δ^9 THC-d3 / mL de metanol foi preparada a partir de uma ampola de 1 ml (Δ^9 THC-d3 1 μ g/mL).

Todas as soluções de trabalho, (calibradores, controle de qualidade e padrão interno) foram armazenadas a -10°C , em tubos de vidro cobertos com papel alumínio com tampa de polietileno, previamente lavados com hexano.

3.8. Análise estatística

Os escores dos fatores VAMS e IDATE foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), analisando-se os fatores fases, grupos e interação entre eles.

O desempenho no teste de reconhecimento de expressões faciais foi submetido à análise de variância multivariada (MANOVA).

Utilizou-se o programa SPSS-17 para análise dos dados e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

A análise estatística das variáveis fisiológicas foi feita também através do programa SPSS-17.

Com base nas concentrações de CBD obtidas, para cada voluntário foi construída uma curva de concentração e calculada sua área no intervalo de tempo de quatro horas, o que resultou em treze áreas para cada grupo. O cálculo das áreas é útil para verificar e comparar a absorção do fármaco nas duas formulações.

Para testar se a absorção de CBD em pó é significativamente diferente de zero, foi efetuado um teste t, monocaudal, ao nível de significância de 5%. O mesmo procedimento foi utilizado para testar se a absorção de CBD em óleo é significativamente diferente de zero.

Para avaliar se a concentração plasmática de CBD em óleo é significativamente maior que a concentração plasmática de CBD em pó, foi utilizado um teste t, monocaudal de Welch, para comparar as médias das áreas ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da separação cromatográfica dos analitos e identificação dos íons de identificação e quantificação

Com o objetivo de obter os tempos de retenção e os espectros de massas para a definição dos íons de identificação e quantificação dos analitos de interesse, uma mistura padrão contendo CBD, Δ^9 THC e Δ^9 THC-d3 foi analisada no modo *Full Scan* de detecção. A Figura 9 apresenta o cromatograma da análise da mistura de padrões.

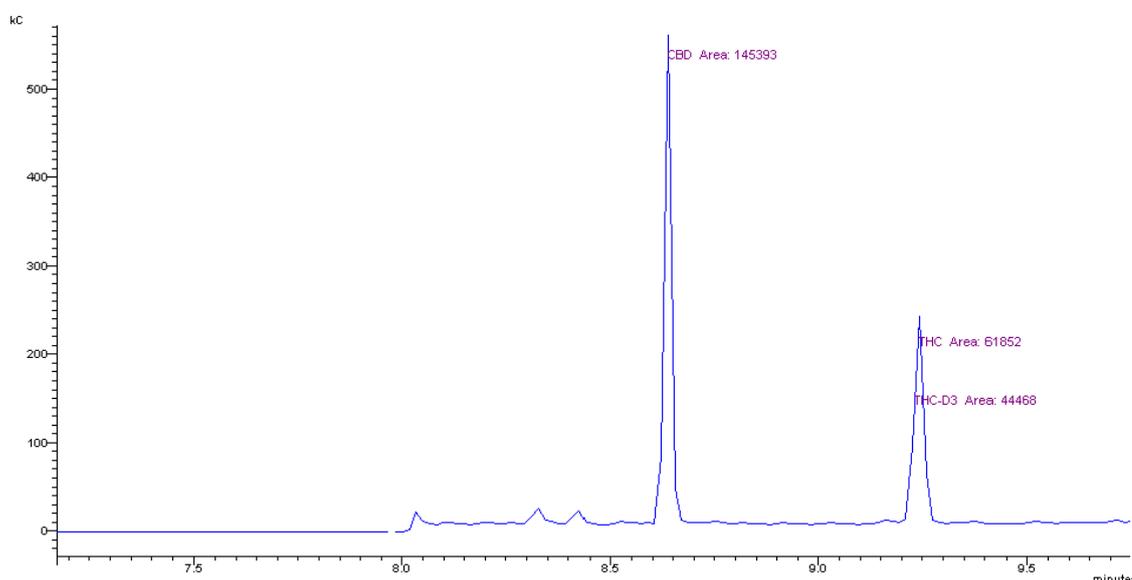


Figura 9 - Cromatograma dos padrões de CBD (100 ng), Δ^9 THC (100 ng) e Δ^9 THC-d3 (50 ng) secos e derivatizados analisados no modo *Full Scan*.

Pode ser observado que em um tempo curto de análise foi obtida uma ótima separação dos analitos, com picos bem resolvidos, simétricos e afilados. Os tempos de retenção obtidos foram CBD (8,65 min) e Δ^9 THC/ Δ^9 THC-d3 (9,25 min). As Figuras 10, 11, e 12 mostram os cromatogramas e os espectros de massas de cada analito, enquanto que a Tabela 2 apresenta os íons de identificação e quantificação característicos de cada analito após a fragmentação.

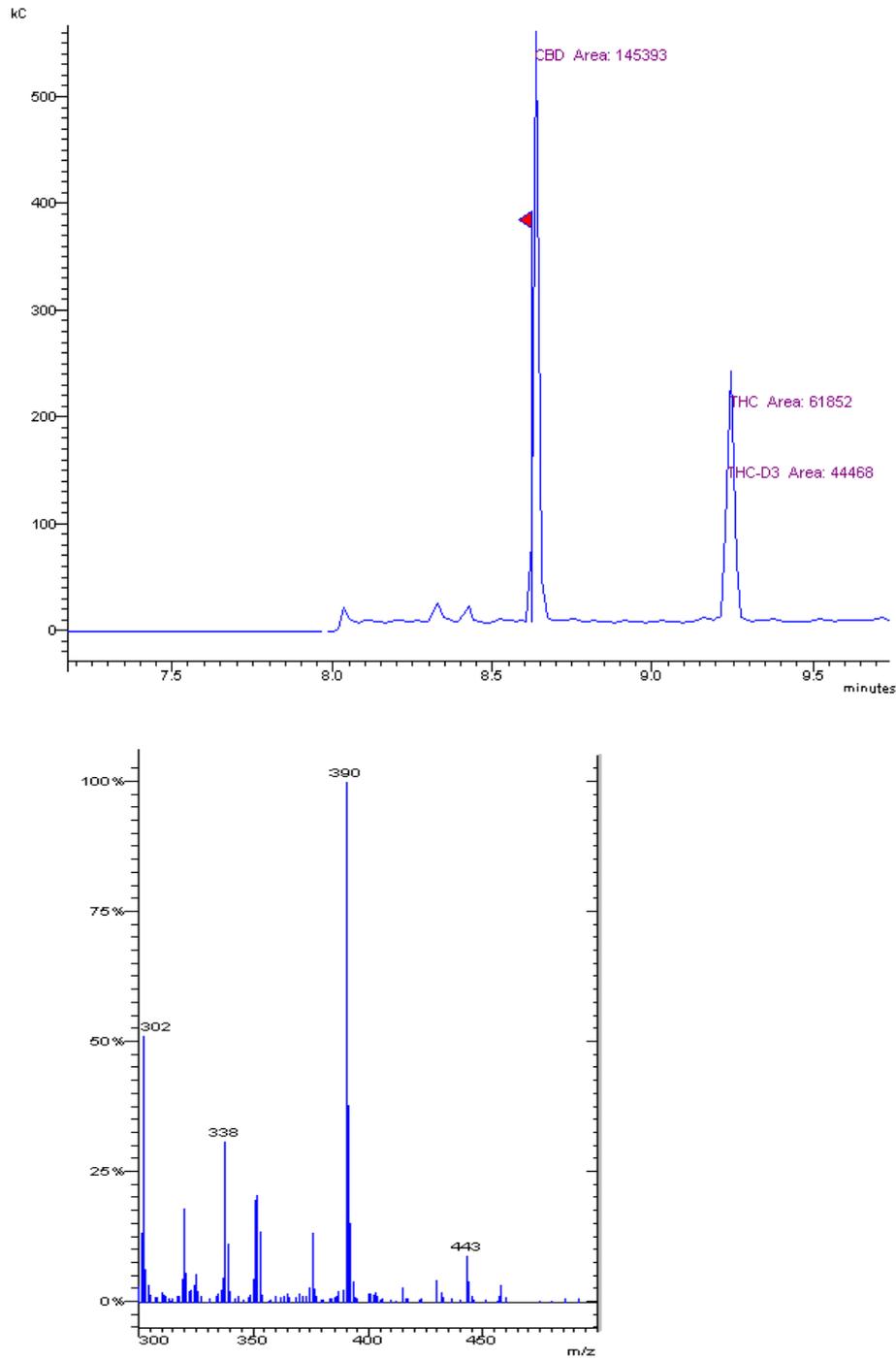


Figura 10 - Cromatograma do padrão e espectro de massas do CBD (100 ng) no modo *Full Scan* de detecção.

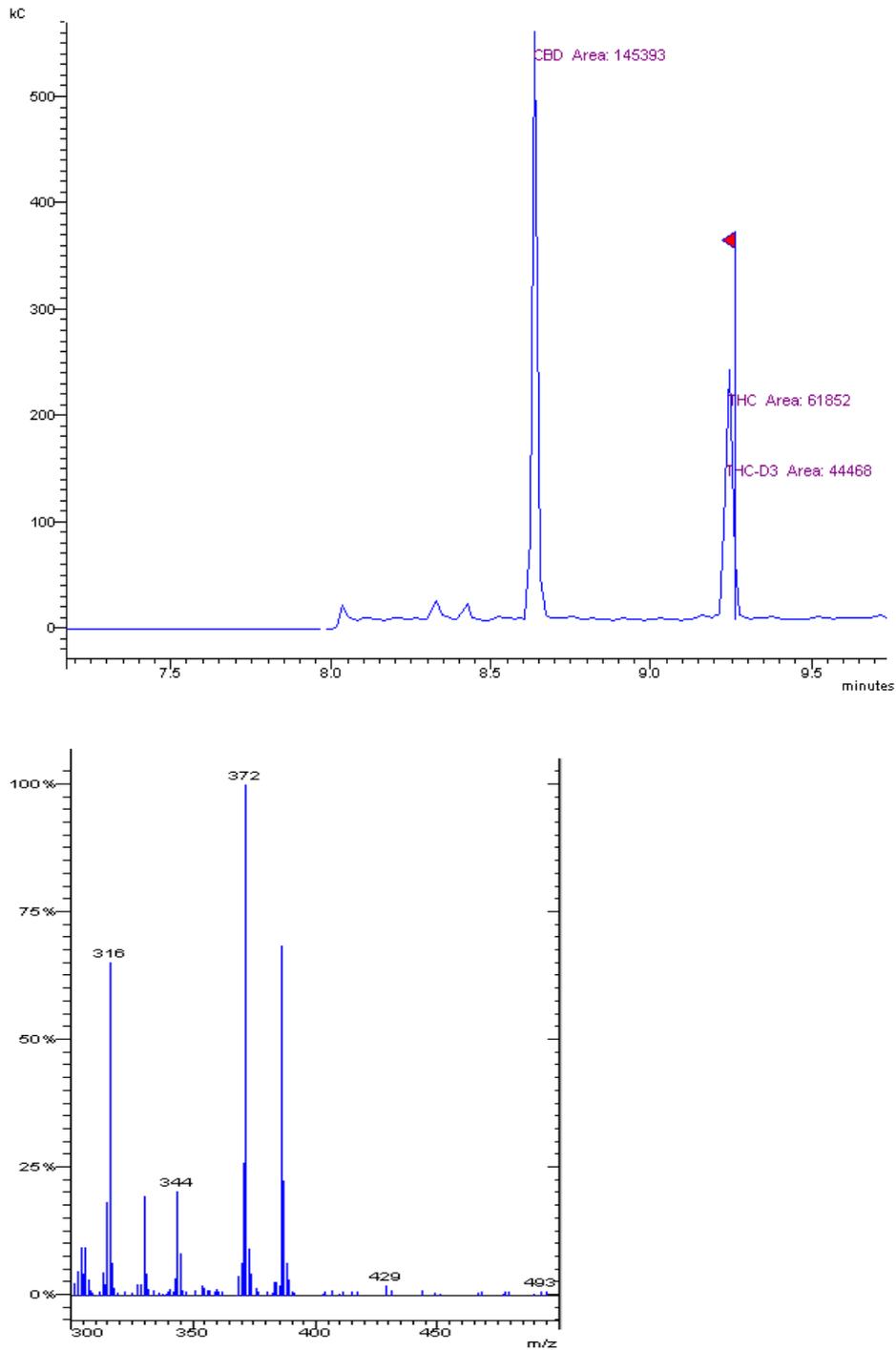


Figura 11 - Cromatograma do padrão e espectro de massas do Δ^9 THC (100 ng) no modo *Full Scan* de detecção.

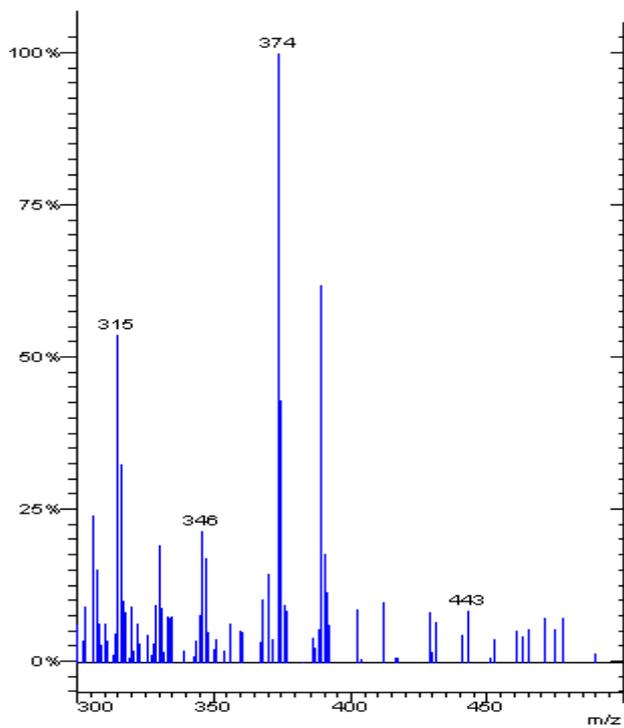
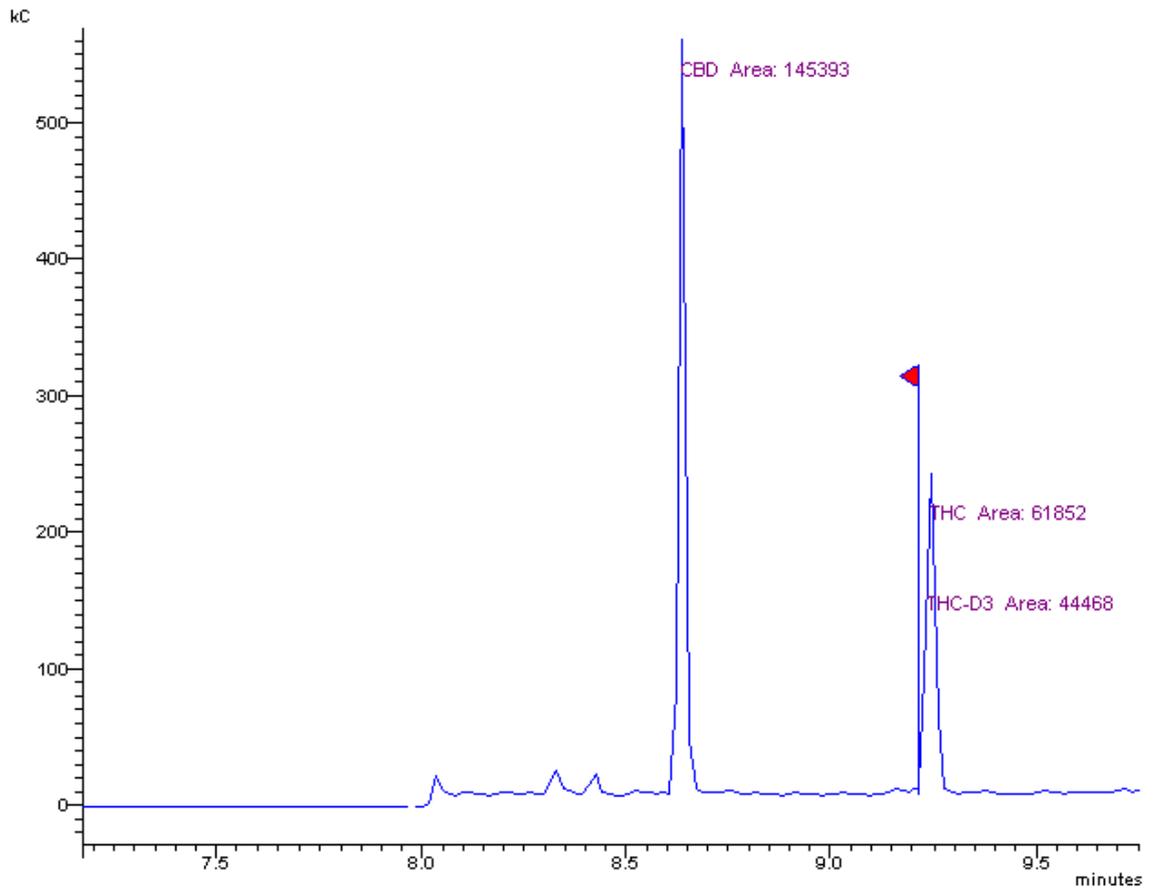


Figura 12 – Cromatograma dos padrões e espectro de massas do Δ^9 THC-d3 (50 ng) no modo Full Scan de detecção.

Para a identificação e quantificação dos analitos CBD, Δ^9 THC e Δ^9 THCd3 foram utilizados os seguintes íons: CBD: 375, (390), 391; Δ^9 THC: (371), 372, 386; Δ^9 THCd3: (374), 375, 389, sendo que os íons entre parênteses foram utilizados como íons de quantificação.

Antes do início da análise, uma alíquota do *pool* de plasma “branco” foi analisada para confirmar a ausência de quaisquer componentes endógenos ou exógenos que poderiam interferir nas análises, caso fossem eluídos nos mesmos tempos de retenção dos analitos. A Figura 13 mostra o resultado cromatográfico de uma análise de plasma “branco” realizada no modo *S/S* de detecção.

Pode ser observado que não há a presença de picos na região dos tempos de retenção dos analitos de interesse CBD, Δ^9 THC e Δ^9 THC-d3.

Para melhorar a detecção dos analitos presentes na amostra de plasma em concentrações baixas, as análises passaram então a serem feitas utilizando o modo *S/S* de detecção. Como podem ser observados na Figura 14, os ruídos são diminuídos, aumentando a razão sinal / ruído, sendo que os espectros de massas do CBD, Δ^9 THC e Δ^9 THC-d3 apresentam somente os íons mais abundantes característicos da fragmentação da substância.

No cromatograma (Figura 15) pode ser observada a presença de dois picos referentes ao CBD e ao Δ^9 THC-d3, utilizado como padrão interno para quantificação.

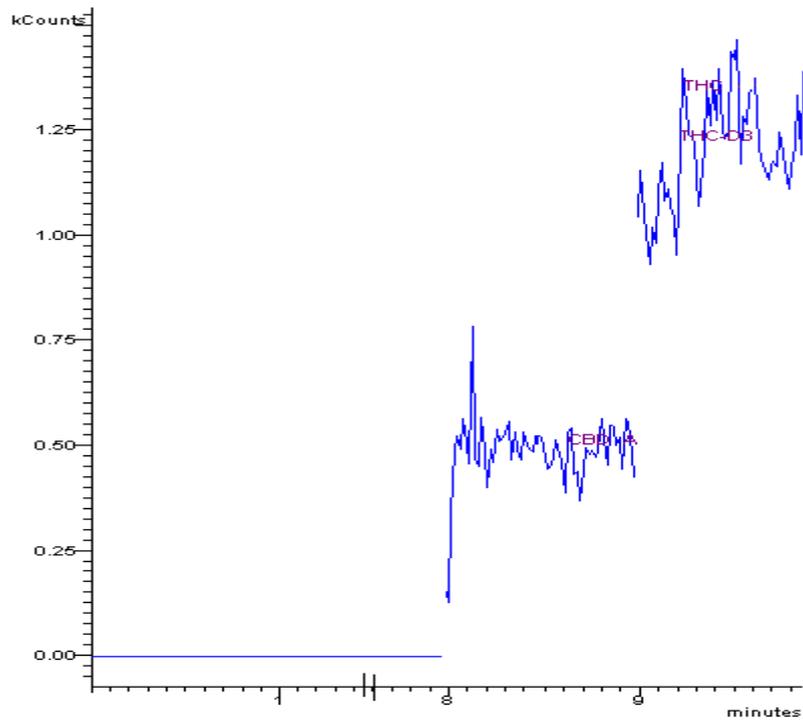


Figura 13 - Resultado cromatográfico da análise de uma amostra de plasma “branco” realizada no modo *S/S* de detecção.

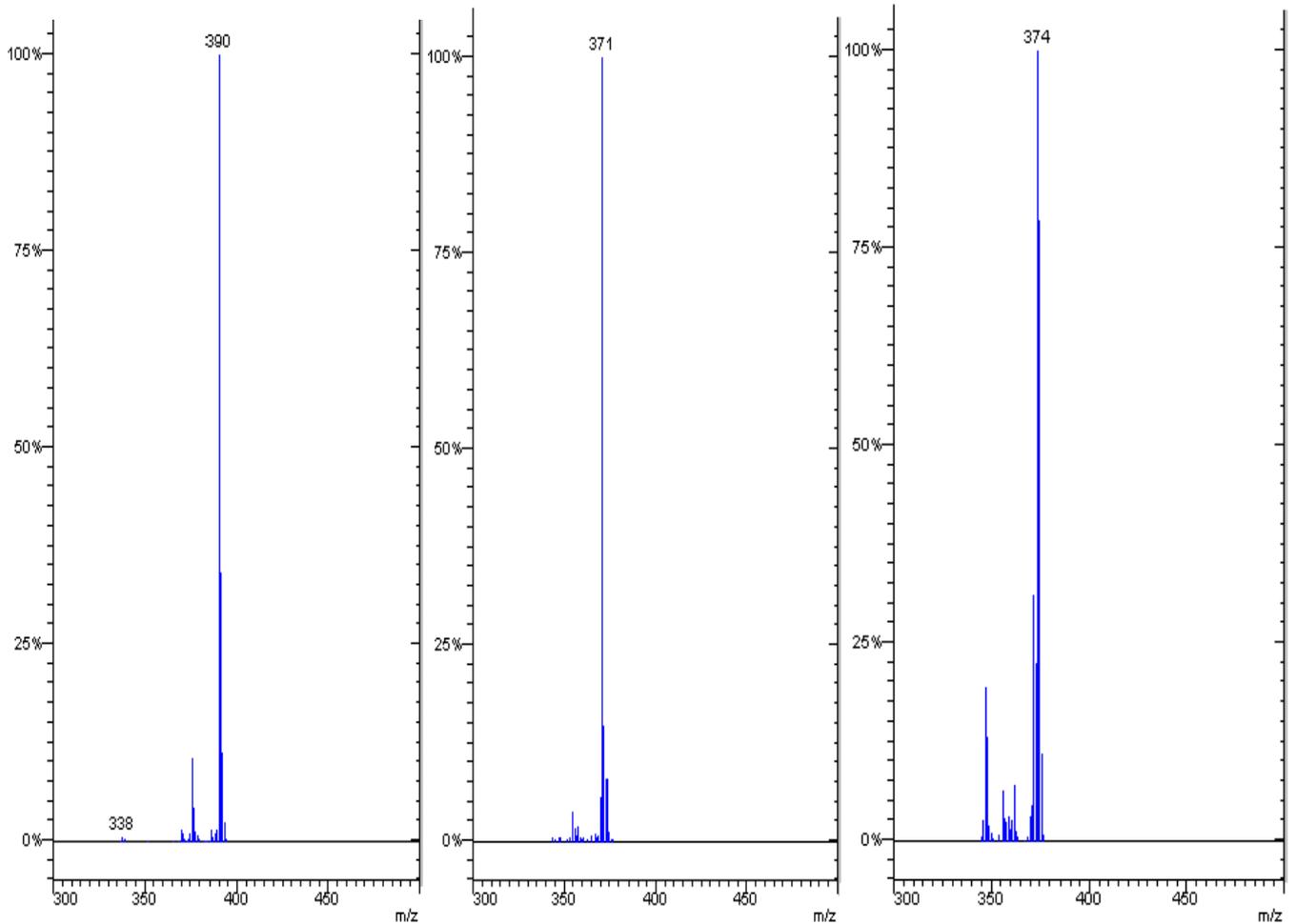
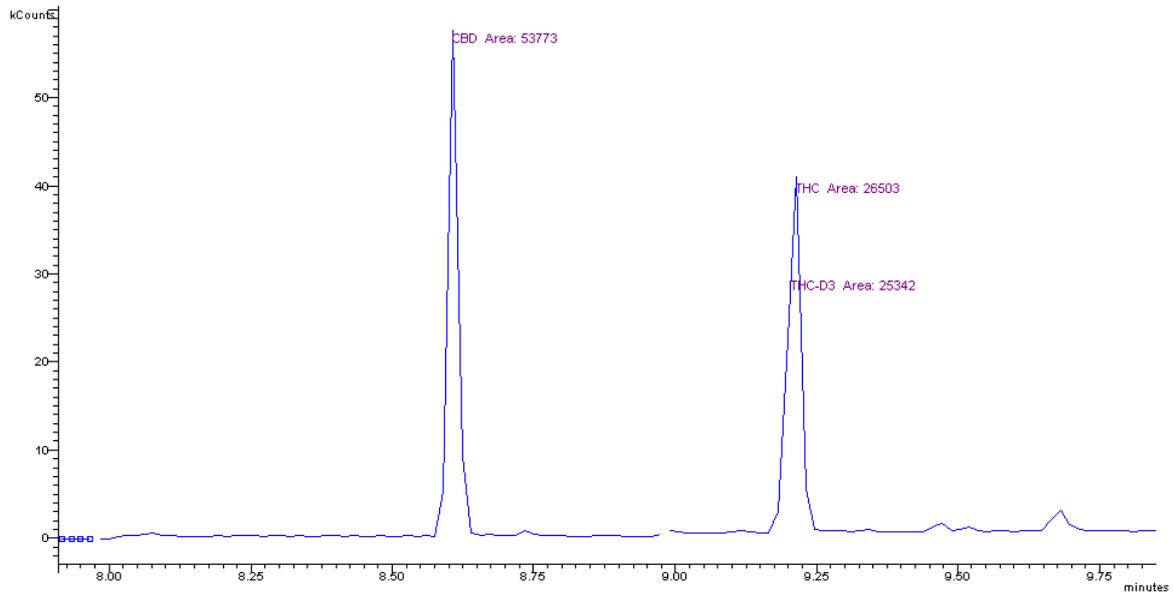


Figura 14 - Cromatogramas e espectros de massas do CBD, Δ^9 THC e Δ^9 THCd3/modo S/S de detecção.

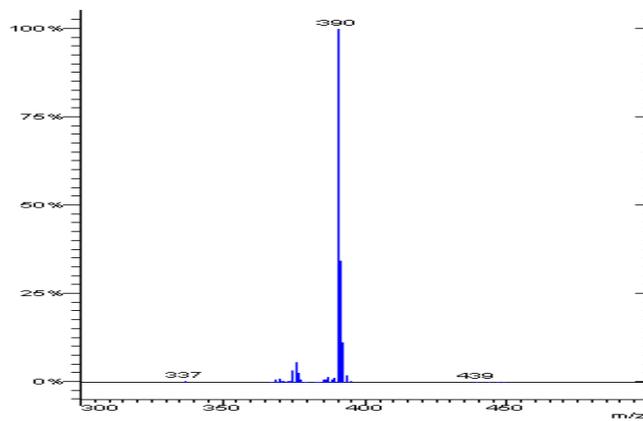
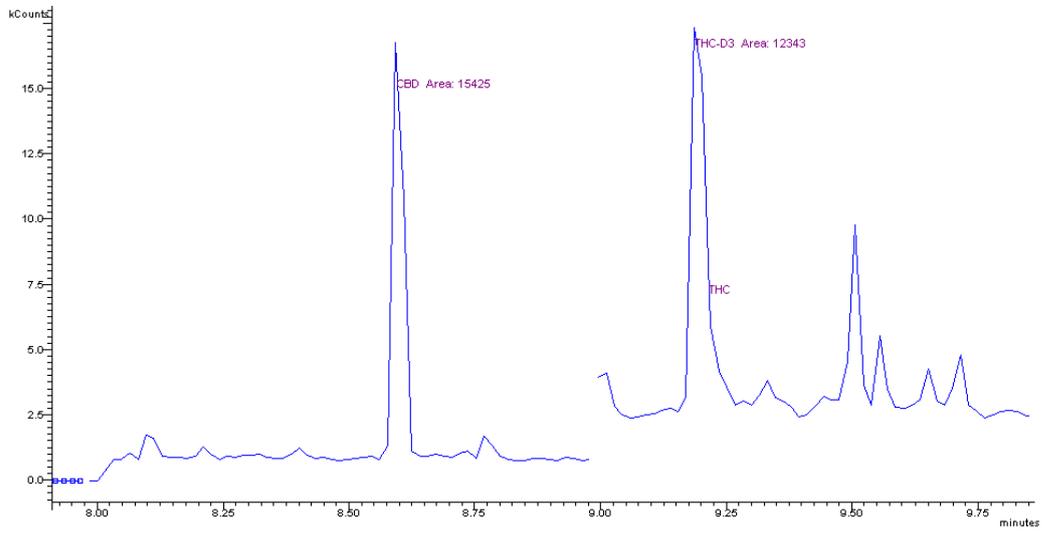


Figura 15 - Cromatograma e espectro de massas do CBD referente à análise de plasma de voluntário exposto ao CBD.

4.2. Curva de Calibração

De acordo com a resolução da ANVISA a curva de calibração foi feita com no mínimo 6 pontos (concentrações) e com um “n” (número de replicatas) igual a 3. Apresentou coeficiente de determinação igual a 0,999 e um coeficiente de variação (CV%) inferior a 15%.

4.3. Farmacocinética e efeitos clínicos

Os resultados de nosso estudo abrangeram dados estatísticos comportamentais de sujeitos saudáveis que se voluntariaram mediante termo de consentimento previamente apresentado. Propôs-se um total de 45 sujeitos, dos quais 39 foram analisados. Além disso, foram coletadas de cada indivíduo, oito amostras de sangue, para posterior análise da concentração plasmática do CBD. A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas estabeleceu o comportamento cinético das duas formulações do CBD, durante o período de quatro horas.

Os gráficos 9 e 10 traduzem o perfil farmacocinético do CBD encapsulado em pó e dissolvido em óleo de milho respectivamente. Os gráficos 1, 2, 3, e 4 referem-se aos resultados obtidos através da aplicação da Escala Analógica de Humor (VAMS) aos sujeitos, enquanto o gráfico 5 demonstra a avaliação da ansiedade mediante aplicação da escala de identificação de ansiedade traço-estado (IDATE). Os gráficos 6, 7, e 8 demonstram a influência do CBD sobre a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) respectivamente. A PAS e PAD foram medidas mediante utilização de um esfigmomanômetro de mercúrio, enquanto a FC foi avaliada através do pulso periférico. Através da análise do plasma de cada sujeito, através de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, foi possível estabelecer o comportamento cinético das duas formulações do CBD, durante o período de quatro horas. Os gráficos 9 e 10 traduzem o perfil farmacocinético do CBD encapsulado em pó e dissolvido em óleo de milho respectivamente.

Na Tarefa de Reconhecimento da Expressão Facial (TREF), verificou-se que o Grupo 1, que ingeriu o pó, apresentou intensidade de 93%, comparativamente ao

Grupo 2, que ingeriu óleo, cuja intensidade foi de 81%. Nesse teste realizado o grau de significância entre o Grupo 1 e 2 foi $p < 0,05$, mais precisamente $p = 0,034$.

A análise cromatográfica foi uma ferramenta determinante para a quantificação da concentração plasmática dos fármacos, demonstrando o comportamento farmacocinético das duas formulações, que revelou um pico plasmático de $20,70 \pm 1,68$ ng/ml (Grupo 1) atingido em 2,5 h e de $82,59 \pm 9,52$ ng/mL (Grupo 2), em 2h.

Devido à variação interindividual na cinética do fármaco, por ser um estudo clínico, em que os indivíduos foram escolhidos de forma aleatória, aplicou-se um estudo estatístico do cálculo das médias das áreas das curvas de concentrações plasmáticas dos 13 indivíduos de cada Grupo, dentro do intervalo de 4 horas após a administração do CBD. A média das áreas dos indivíduos do Grupo 1, que ingeriu CBD em pó foi de $28,21 \pm 2,02$, ao passo que a média das áreas dos indivíduos a que foi administrado CBD em óleo foi $123,18 \pm 8,61$.

O valor obtido para avaliar se a média de CBD em pó absorvida foi igual a zero resultou em 50,42; maior que o valor tabelado de 1,782; relativo ao nível de significância de 5%, levando ao resultado que a média das áreas é significativamente maior que zero. O valor encontrado para avaliar se a média de CBD em óleo foi igual a zero foi de 510,62; maior que o valor tabelado 1,782; também relativo ao nível de significância de 5%. Mais uma vez observa-se que a média das áreas é significativamente maior que zero e realmente ocorre absorção do fármaco em ambas as formas farmacêuticas.

O valor do teste t de Welch para verificar se a média da absorção de CBD em óleo foi maior que a de pó resultou em 38,74; maior que o valor tabelado de 1,77; relativo ao nível de significância de 5%. Sendo assim a absorção de CBD óleo é significativamente maior que a de pó.

Observamos que o Grupo controle (placebo-Grupo 3) apresentou níveis de desconforto maiores, se comparados aos grupos de tratamento (Gráfico 4). Quanto aos grupos que ingeriram CBD, durante o período da fala, referente ao teste de simulação de falar em público, o nível de desconforto foi maior para aqueles a que foi administrado cápsulas com CBD em pó (Grupo 1) do que para o Grupo que ingeriu cápsulas com CBD dissolvido em óleo (Grupo 2). No entanto, a partir da fase Pós Fala1, houve uma queda acentuada dos níveis de desconforto do Grupo 1,

comparativamente ao Grupo 2, para o qual os níveis de desconforto elevaram-se a partir dessa fase. Para o Grupo 3 os níveis de desconforto caíram, mas não foram menores que os dos grupos que receberam o fármaco.

Ao se analisar o Gráfico 3, referente ao prejuízo cognitivo, constatamos claramente, durante o período de fala, maior prejuízo no Grupo 3. A partir do pós-fala1 observamos o decaimento nos níveis de prejuízo cognitivo. Para os sujeitos do Grupo placebo, esse sintoma foi maior que nos dois outros Grupos, que receberam CBD. E comparando-os, o Grupo 1 apresentou, durante o período da fala, maior prejuízo cognitivo que o Grupo 2. Mas, a partir do pós-fala1, houve melhora cognitiva no Grupo 1 enquanto o Grupo 2 apresentou elevação no prejuízo cognitivo. Esses resultados ratificam os dados contidos no estudo de Bergamaschi et al., 2010.

Porém, ao analisarmos o Gráfico 2, a sedação não ocorreu nos Grupos tratados com o CBD; demonstramos desta forma que os Grupos que foram tratados chegaram ao período da fala em um estado de maior alerta comparado ao Grupo que recebeu placebo.

Quanto à ansiedade, Gráfico 1, os três grupos apresentaram comportamento semelhante, ou seja, níveis elevados durante a fala. Esse dado também é contraditório se comparado ao resultado obtido no estudo de Bergamaschi et al., 2010. Mas o nível de ansiedade no Grupo 2 foi ligeiramente menor na Fala e a partir da fase Pós-fala1 houve um decaimento abrupto

A propriedade ansiolítica do CBD também foi avaliada através da aplicação da escala IDATE. Observamos no Gráfico 5 que o nível de ansiedade foi maior nos Grupos de tratamento. Contrariamente ao que se esperava o grupo placebo apresentou escores menores de ansiedade.

Diante do obtido pelas escalas VAMS e IDATE, podemos conjecturar a respeito da metabolização do CBD. Sabe-se que a forma ativa, com propriedade ansiolítica, é o CBD- levógiro. Caso o fármaco sofra a racemização endógena, da administração de cápsulas com apenas 150 mg do fármaco, somente 75mg estariam disponíveis para o controle da ansiedade. Baixas concentrações plasmáticas de CBD podem comprometer a propriedade do fármaco quanto à ação ansiolítica, pois esta é dose-dependente, o que comprometeria a eficácia terapêutica do medicamento.

Além dos resultados das escalas psicológicas, apresentamos ainda as intensidades fornecidas pela TREF, em que verificamos 93% para o Grupo que ingeriu CBD em pó e 81% para os indivíduos tratados com CBD dissolvido em óleo. Comprovamos através dos Gráficos 9 e 10 que a forma farmacêutica em pó foi absorvida após 2,5h enquanto que a dissolvida e em óleo sofreu absorção em 2h.

Desse modo, os resultados encontrados na TREF mostraram maior disponibilidade do fármaco no Grupo 2, Grupo de sujeitos tratados com formulação em óleo. Mediante o teste os sujeitos apresentaram maior domínio da ansiedade e, portanto, levaria menor tempo para o reconhecimento das expressões faciais. A intensidade de 81% refletiu neste comportamento que no outro Grupo foi de 93%.

Além da ansiedade, sedação, prejuízo cognitivo e desconforto, avaliados mediante aplicação da escala VAMS e escala IDATE para detectar ansiedade, foram monitoradas as variáveis fisiológicas: PAS, PAD e FC.

Quanto à pressão arterial Sistólica (PAS), observamos um comportamento semelhante nos três grupos. No entanto, os grupos 1 e 2, que receberam respectivamente CBD em pó e óleo, apresentaram maiores níveis de PAS durante o período de aplicação do TSFP. A terceira variável fisiológica, FC, revelou um comportamento oposto entre os grupos 1 e 2. Do início do experimento à fase antecipatória houve queda da frequência cardíaca no Grupo 2 e elevação no Grupo 1. Da fase antecipatória ao instante do TSFP (fala), a FC do grupo 2 elevou-se, enquanto o grupo 1 apresentou decaimento da FC. Após a fala ocorreu o inverso, elevação da FC do grupo 1 e decaimento da frequência cardíaca do grupo 2.

Após a realização da TREF, a FC de ambos os grupos decaiu. O grupo 3 revelou comportamento semelhante ao grupo 1, porém com níveis menores de FC.

Desse modo, torna-se notório que os grupos que se submeteram ao tratamento com CBD (em pó e em óleo) apresentaram, embora não estatisticamente significativos, níveis superiores de PAS, PAD e FC. Portanto, uma provável explicação que dê suporte a esses resultados seja a influência do CBD sobre o sistema dopaminérgico. Segundo, Murillo-Rodríguez et al., 2006, através de injeção intracérebroventricular em ratos, analisaram-se os efeitos do CBD sobre os níveis extracelulares de dopamina (DA) no núcleo acumbens. O CBD foi capaz de aumentar a liberação de DA, e o aumento foi verificado por meio de coleta de amostras do fluido cérebro espinhal, que posteriormente foi analisado em HPLC. O

CBD induziu elevação de DA uma hora após injeção e esse efeito perdurou na segunda hora. Foram encontrados altos níveis de DA no núcleo acumbens, quatro horas após a injeção. Propôs-se que o CBD fosse capaz de se ligar ao receptor valinoide, receptor relacionado em modular o influxo de íons cálcio. Esse pode ser um provável mecanismo para induzir a liberação de DA (MURILLO-RODRÍGUEZ et al., 2006). Através da perfusão do CBD no hipotálamo lateral, também em ratos, cujas ramificações atingem o núcleo acumbens, verificou-se aumento de DA no núcleo acumbens em amostras de microdiálise dessa região. Amostras de 10µl foram coletadas a partir de 20 minutos do início de cada hora e isso continuou nas próximas quatro horas após a perfusão do de CBD. Observou-se que o CBD induziu mudanças no conteúdo de DA dentro de um período de quatro horas. Quando o CBD foi injetado no hipotálamo lateral, foi observado um aumento significativo de DA durante uma hora. Notou-se que o efeito da DA é dose dependente. O declínio de DA iniciou-se a partir da terceira hora após infusão do composto. Sendo assim foi encontrado que a perfusão de CBD diretamente no hipotálamo lateral aumentou o nível extracelular de DA no núcleo acumbens (MURILLO-RODRÍGUEZ et al., 2011). Foi verificado também que o estado de sedação nos indivíduos tratados com CBD foi menor que o encontrado nos sujeitos que receberam placebo. O respaldo para esse achado pode ser a interação que o CBD estabelece com o sistema dopaminérgico, ao elevar os níveis de DA. E a maior quantidade de DA ativa o estado de vigília dos neurônios do hipotálamo e núcleo dorsal da rafe (MURILLO-RODRÍGUEZ et al., 2006). Nesse mesmo estudo foi encontrada uma maior expressão do gene c-FOS em áreas cerebrais relacionadas ao estado de vigília (hipotálamo e núcleo dorsal da rafe). Esses dados fornecidos pela literatura corroboram com os resultados obtidos no presente estudo. Como há relação entre o CBD e sistema dopaminérgico, é relevante que se faça uma análise dos efeitos da DA sobre a pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca, uma vez que os grupos que receberam CBD apresentaram níveis maiores. Em concentrações ligeiramente mais altas, a DA exerce efeito inotrópico positivo sobre o miocárdio, atuando sobre os receptores β_1 -adrenérgicos. A DA aumenta habitualmente a pressão arterial sistólica, enquanto produz ligeira elevação na pressão arterial diastólica. Em altas concentrações, ativa receptores α_1 vasculares resultando em vasoconstrição generalizada. Isso demonstrou que o efeito da DA sobre a pressão arterial sistêmica

e frequência cardíaca é dose dependente. Assim a infusão de baixas doses de DA provoca queda da pressão arterial, através do bloqueio da descarga simpática em nível pré-sináptico; doses intermediárias ocasionam elevação da frequência e contratilidade cardíacas; e altas doses levam a vasoconstrição e hipertensão arterial, por ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos (ALESSI A., 2003). Porém ressaltamos que este aumento encontrado na pressão arterial e frequência cardíaca foram em relação ao Grupo placebo, porém em nenhum momento a PAS /PAD e a FC foram maiores que 125/85 mm de Hg e 75 batimentos cardíacos por minuto, respectivamente.

A coleta de sangue basal foi importante, pois assim constatamos que nenhum canabinóide foi encontrado nos indivíduos participantes do estudo.

No instante 1h o CBD em pó já pode ser detectado e o valor médio das concentrações dos sujeitos foi 2,37ng/mL \pm 0,90; 1,5h após ingestão o valor médio foi 4,47ng/mL \pm 1,21; 2h após, a concentração média é de 11,21ng/mL \pm 2,13.

Verificamos que em 2,5h foi atingido o pico plasmático, cujo valor médio foi de 20,70ng/mL \pm 1,68. A partir desse instante, o valor médio das concentrações começa a regredir. No instante 3h tem-se um valor de 9,20ng/mL \pm 1,02, e uma hora após a sétima coleta a concentração média é 3,85ng/mL \pm 0,53.

A formulação em que o CBD se apresenta dissolvido em óleo de milho revelou comportamento cinético semelhante à curva cinética da forma farmacêutica em que o CBD esta encapsulado em pó. Contudo, o pico plasmático foi atingido em um menor intervalo de tempo.

Assim como o grupo de sujeitos submetidos ao tratamento com CBD em pó, a cânula venosa foi implantada quinze minutos antes da ingestão do fármaco, e logo em seguida coletou-se a primeira amostra para dosagem (tomada de medidas basais). No instante zero, administrou-se a cápsula contendo CBD dissolvido em óleo de milho e 0,5h depois se realizou a segunda coleta. Decorrido uma hora após ingestão da cápsula, já foi possível quantificar o CBD no plasma, e o valor médio das concentrações dos sujeitos foi 14,58ng/mL \pm 0,85. No instante 1,5h as concentrações plasmáticas elevaram-se, e o valor médio das concentrações foi 40,25ng/mL \pm 1,60.

Diferentemente do CBD em pó, o pico plasmático da formulação com CBD em óleo de milho é atingido em duas horas, com um valor médio de 82,59ng/mL \pm 9,52.

Logo em seguida inicia-se o decaimento das concentrações, de modo que 2,5h após ingestão da cápsula tem-se um valor médio de 45,04ng/mL \pm 4,30; 3h após ingestão a concentração média é de 34,58ng/mL \pm 9,52. E uma hora após a sétima coleta tem-se uma concentração média de 11,99ng/mL \pm 1,49.

Desse modo, diante das concentrações médias obtidas e principalmente e do valor encontrado no teste t de Welch (38,74), que demonstram uma maior absorção de canabidiol dissolvido em óleo, pode-se atribuir essa maior absorção à lipossolubilidade do fármaco associado ao veículo (óleo de milho) também lipossolúvel.

Sabe-se que a membrana plasmática das células é constituída predominantemente por fosfolipídios, o que corrobora para uma maior permeabilização do fármaco lipofílico associado ao veículo de mesmo caráter físico-químico. Esse veículo pode facilitar a condução do fármaco para o meio intracelular, uma vez que se difunde através da membrana plasmática (ambos de mesmo caráter), o que reduz o tempo de absorção, intensifica a quantidade absorvida e aumenta os níveis plasmáticos.

ESCALA ANALÓGICA DE HUMOR-ANSIEDADE

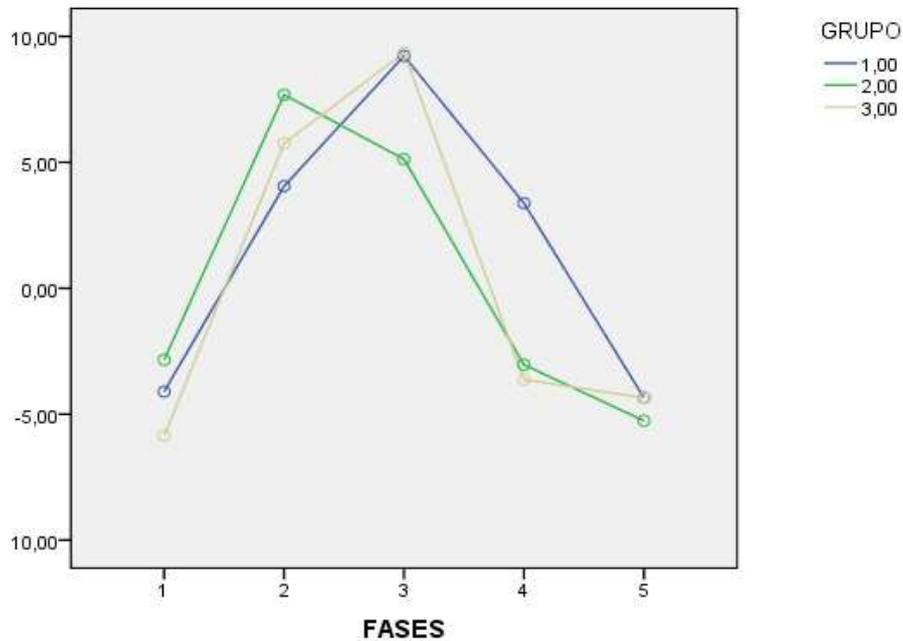


Gráfico1: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na ansiedade subjetiva avaliada pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-fala; 4-Pós fala1; 5-Pós fala2. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{4, 168} = 9,87$; $p < 0,001$); Interação ($f_{8, 168} = 0,58$; $p = 0,79$) e Grupo ($f_{2, 42} = 0,036$; $p = 0,96$).

ESCALA ANALÓGICA DE HUMOR-SEDAÇÃO

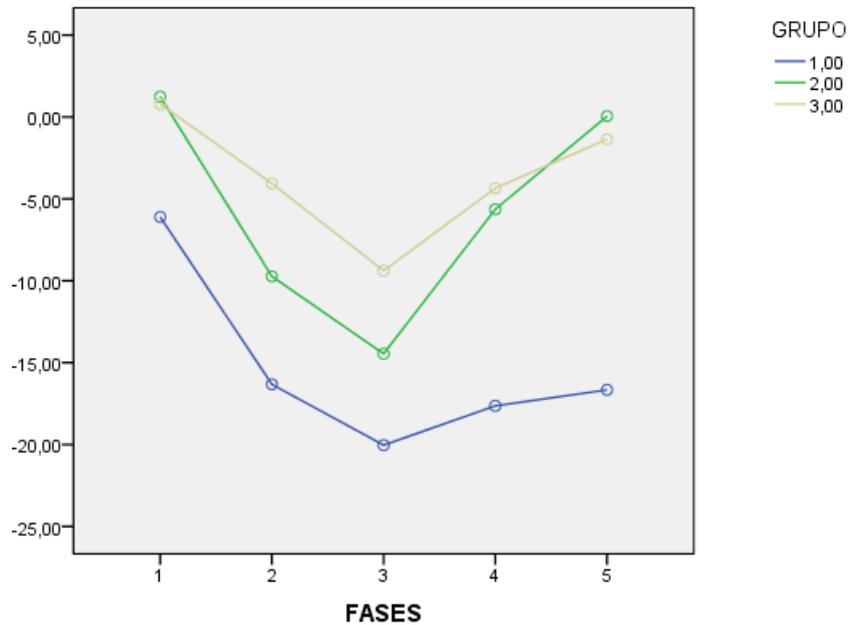


Gráfico2: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na sedação avaliada pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-fala; 4-Pós fala1; 5-Pós fala2. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{4, 168} = 9,34$; $p < 0,001$); Interação ($f_{8, 168} = 0,89$; $p = 0,52$) e Grupo ($f_{2, 42} = 2,34$; $p = 0,109$).

ESCALA ANALÓGICA DE HUMOR-PREJUÍZO COGNITIVO

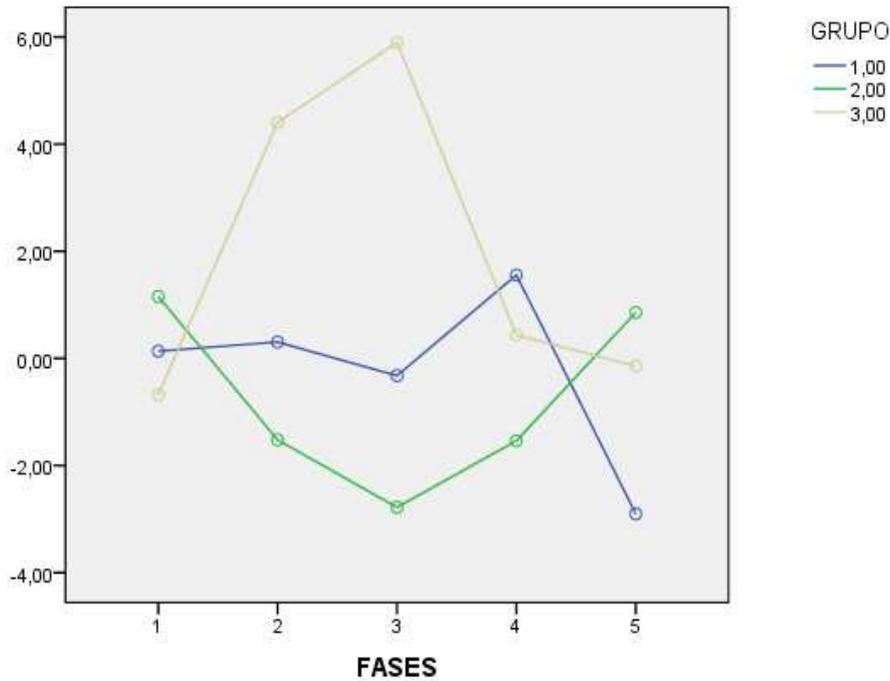


Gráfico3: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo no prejuízo cognitivo avaliado pela escala analógica de humor em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-fala; 4-Pós fala1; 5-Pós fala2. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{4, 168} = 0,367$; $p = 0,832$); interação ($f_{8, 168} = 1,52$; $p = 0,154$) e grupo ($f_{2, 42} = 0,345$; $p = 0,710$).

ESCALA ANALÓGICA DE HUMOR-DESCONFORTO

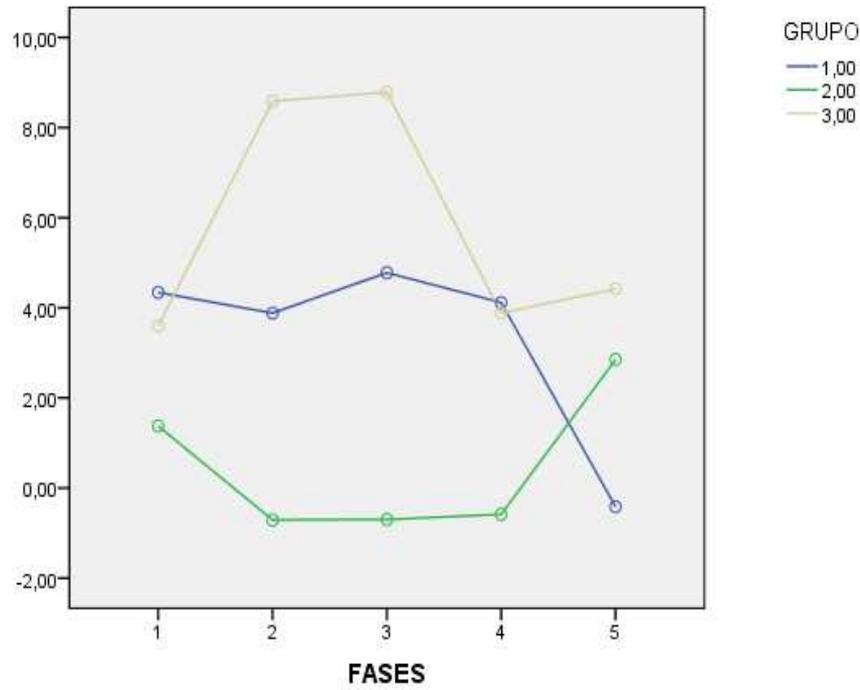


Gráfico4: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo no prejuízo no desconforto avaliado pela escala analógica de humor em voluntários saudáveis submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-fala; 4-Pós fala1; 5-Pós fala2. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{4, 168} = 0,473$; $p = 0,755$); Interação ($f_{8, 168} = 1,19$; $p = 0,310$) e Grupo ($f_{2, 42} = 1,69$; $p = 0,197$)

AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE MEDIANTE APLICAÇÃO DA ESCALA DE IDENTIFICAÇÃO DE ANSIEDADE TRAÇO-ESTADO

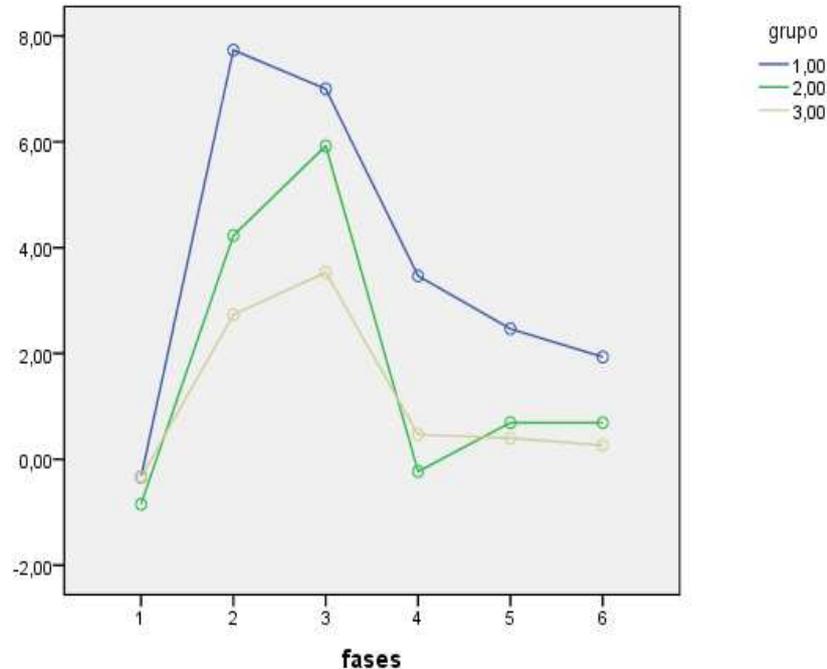


Gráfico5: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na ansiedade avaliada pela escala de identificação de ansiedade traço-estado em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-fala; 4-Pós fala1; 5-Pós fala2; 6-extensão do Pós fala2. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{5, 200} = 13,742$; $p=0,000$); Interação ($f_{10, 200} = 0,824$; $p= 0,606$) e Grupo ($f_{2, 40} = 1,21$; $p= 0,309$).

PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

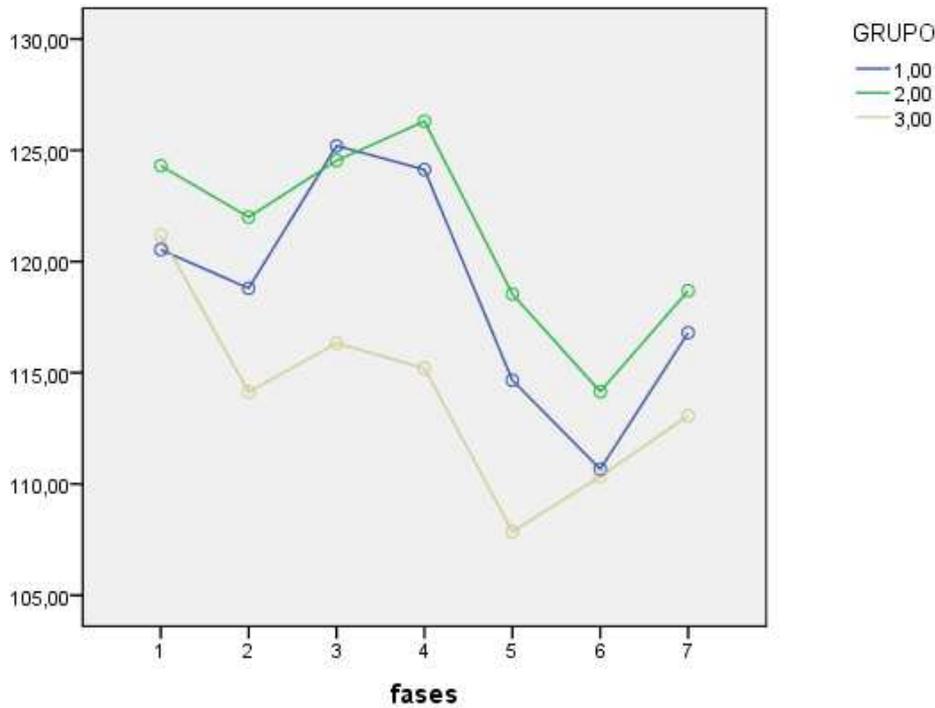


Gráfico6: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na PAS medida com um esfigmomanômetro de mercúrio em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-Antecipatória; 4-Fala; 5-Pós fala1; 6-Pós fala2; 7-Face. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{6, 240} = 8,492$; $p=0,000$); Interação ($f_{12, 240} = 0,732$; $p= 0,720$) e Grupo ($f_{2, 40} = 1,84$; $p= 0,172$).

PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA

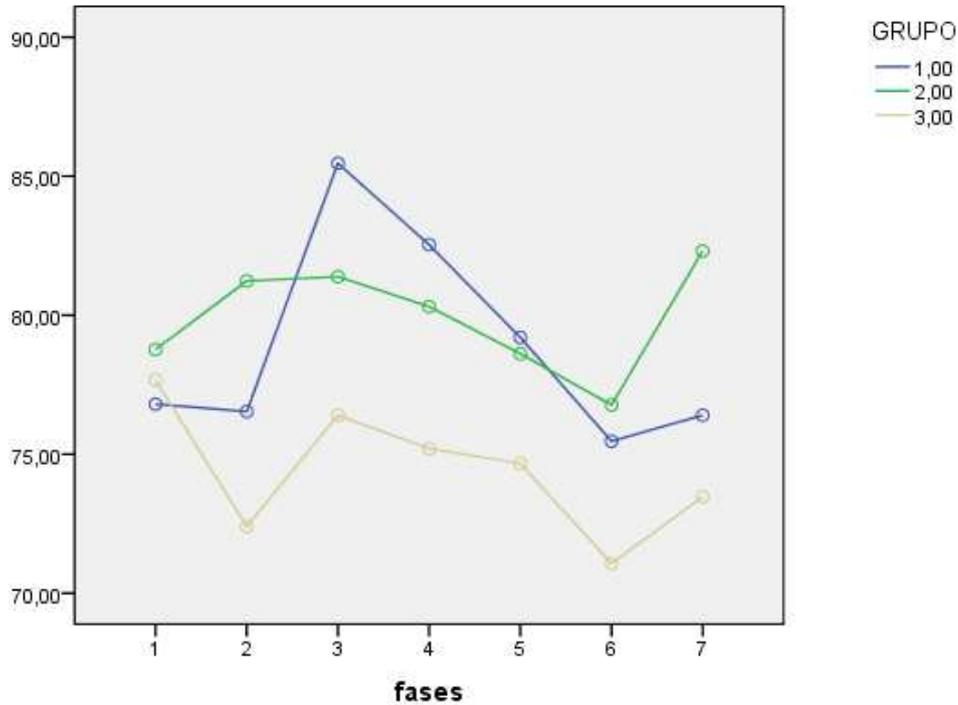


Gráfico7: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na PAD medida com um esfigmomanômetro de mercúrio em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-Antecipatória; 4-Fala; 5-Pós fala1; 6-Pós fala2; 7-Face. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{6, 240} = 2,732$; $p=0,014$); Interação ($f_{12, 240} = 1,070$; $p= 0,387$) e Grupo ($f_{2, 40} = 1,54$; $p= 0,226$)

FREQUÊNCIA CARDÍACA

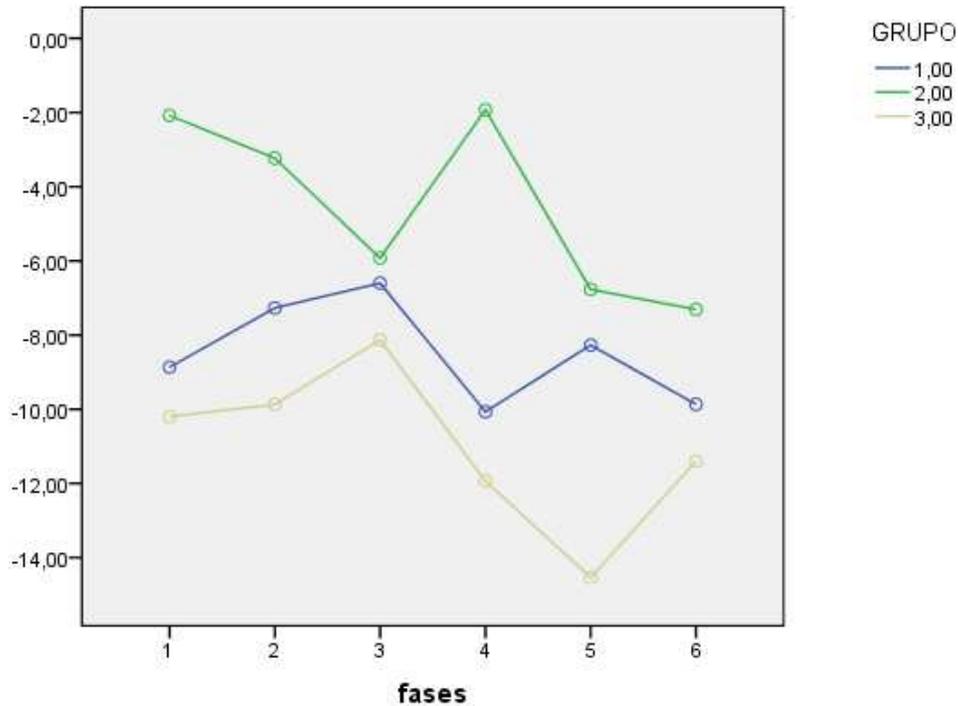


Gráfico8: Efeito do canabidiol (óleo e pó) e do placebo na FC avaliada pelo pulso periférico em voluntários sadios submetidos ao teste de simulação de falar em público. A escala foi aplicada em diferentes fases durante a sessão experimental. Fases: 1-Basal; 2-Pré-teste; 3-Antecipatória; 4-Fala; 5-Pós fala1; 6-Pós fala2. A curva 1 refere-se aos 13 indivíduos que ingeriram canabidiol (CBD) em pó; a curva 2 aos 13 a que foi administrado CBD em óleo e a curva 3 indica o resultado de 13 indivíduos que ingeriram placebo. Os dados estatísticos revelam os seguintes resultados: Fases ($f_{5, 200} = 1,785$; $p = 0,118$); Interação ($f_{10, 200} = 1,064$; $p = 0,392$) e Grupo ($f_{2, 40} = 1,352$; $p = 0,270$).

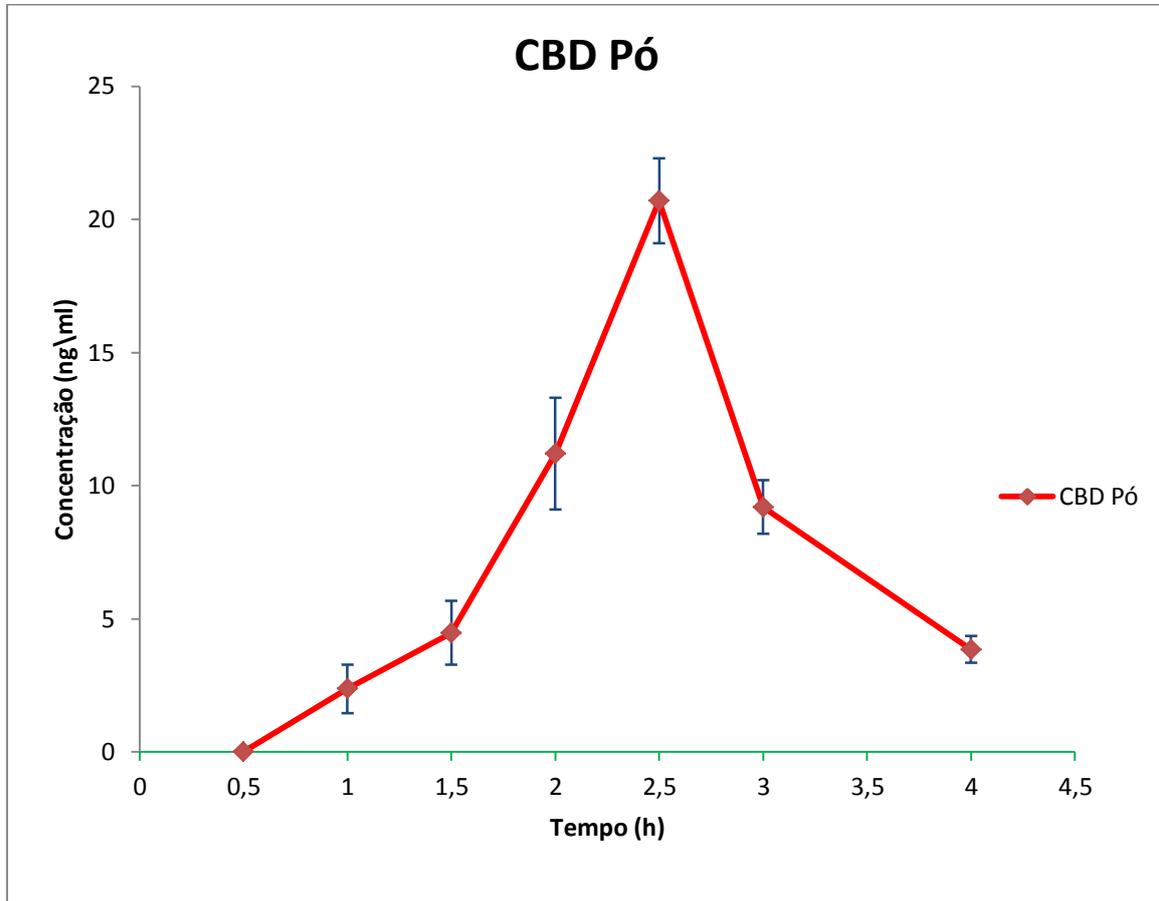
FARMACOCINÉTICA DO CBD ENCAPSULADO EM PÓ

Gráfico9: Comportamento farmacocinético do CBD em pó. O gráfico representa a variação das médias das concentrações de cada sujeito em função do tempo. A cada ponto da média está associado um desvio padrão, representado por uma barra vertical sobre o ponto da média das concentrações. O tamanho de cada barra é proporcional ao maior ou menor desvio das concentrações em torno da média. Cada amostra foi coletada em intervalos de 0,5h. Entre a sétima e a oitava houve um espaçamento de uma hora.

FARMACOCINÉTICA DO CBD ENCAPSULADO DISSOLVIDO EM ÓLEO DE MILHO

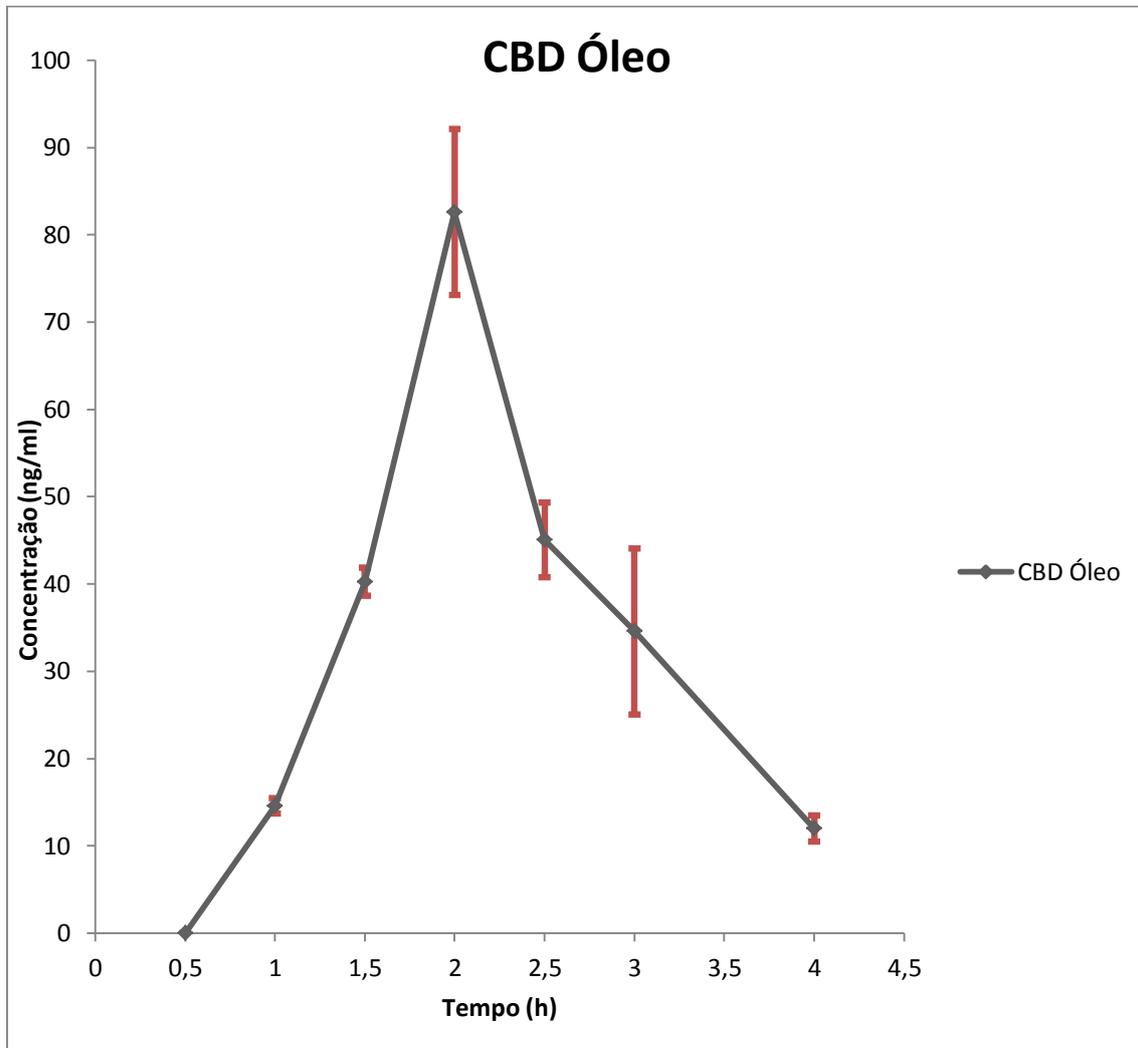


Gráfico10: Comportamento farmacocinético do CBD encapsulado dissolvido em óleo de milho. O gráfico representa a variação das médias das concentrações de cada sujeito em função do tempo. A cada ponto da média está associado um desvio padrão, representado por uma barra vertical sobre o ponto da média das concentrações. O tamanho de cada barra é proporcional ao maior ou menor desvio das concentrações em torno da média. Cada amostra foi coletada em intervalos de 0,5h. Entre a sétima e a oitava houve um espaçamento de uma hora.

5. CONCLUSÃO

Concluimos que o trabalho contribuiu de forma efetiva quanto ao estudo dose/dependência no efeito ansiolítico do Canabidiol e na padronização da formulação farmacêutica para a administração do Canabidiol por via oral.

A formulação farmacêutica do CBD dissolvido em óleo de milho apresentou maior absorção que a formulação na forma de pó, quando administradas através de cápsulas e ingeridas por via oral. Esta absorção foi ratificada através da concentração plasmática do Canabidiol no tempo zero e após a administração do fármaco nos tempos: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 4,0h.

A metodologia utilizada para a avaliação deste parâmetro foi a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O Canabidiol na dose de 150mg, não apresentou efeito ansiolítico, quando se aplicou os testes ansiogênicos: Teste de simulação em falar em público (TSFP); Reconhecimento de Expressões Faciais (REF) e as medidas psicológicas: Escala Analógica de Humor (VAMS); Escalada Identificação da Ansiedade Traço Estado (IDATE).

Em relação à influência do CBD na dose de 150 mg sobre medidas fisiológicas: Pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca, os resultados não foram clinicamente significativos, tanto a pressão arterial quanto a frequência cardíaca se mantiveram dentro dos valores de referência.

6. REFERÊNCIAS

AGURELL, S.; CARLSSON, S.; LINDGREN, J.E.; OHLSSON, A.; GILLESPIE, H.; HOLLISTER, L. Interactions of delta-1-tetrahydrocannabinol with cannabinol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinol and cannabidiol by mass fragmentography. **Experientia**, v. 37, nº 10, p. 1090-1092, 1981.

AGURREL, S.; HALLDIN, M.; LINDGREN, J.E.; OHLSSON, A.; WIDMAN, M.; GILLESPIE, H.; HOLLISTER, L. Pharmacokinetics and metabolism of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. **Pharmacological reviews**, v. 38, p. 21-43, 1986.

ALESSI, A. Sistema dopaminérgico e hipertensão arterial sistêmica. **Revista brasileira de Hipertensão**, v. 10, nº 4, p. 280-281, 2003.

BARES, I.F.; PEHOURCQ, F.; JARRY, C. Development of a rapid RP-HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 865-869, 2004.

BENTO, C.A.M.; VIEIRA, M.M.M.; FERREIRA, T.B.; PACHECO, P.A.F.; BARROS, P.O.; ALMEIDA, C.R.M.; LIMA, C.F.A.; FILHO, R.G.S.; HYGINO, J.; ANDRADE, R.M.; LINHARES, U.C.; ANDRADE, A.F.B. Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder. **Jornal of Neuroimmunology**, v. 229, p. 212-218, 2010.

BOYS, A.; MARSDEN, J.; GRIFFITHS, P.; FOUNTAIN, J.; STILLWELL, G.; STRANG, J. Substance use among young people: the relationship between perceived functions and intentions. **Research Report**, v. 94, p. 1043-1050, 1999.

CARLINI, E.A. ; SANTOS, M. ; CLAUSSEN, U. ; BIENIEK, D. ; KORTE, F. Structure activity relationship of four tetrahydrocannabinols and the pharmacological activity of five semipurified extracts of Cannabis sativa. **Psychopharmacology**, v. 18, p. 82-93, 1970.

COMPTON, W.M.; COTTLER, L.B.; BEN ABDALLAH, A.; PHELPS, D.L.; SPITZNAGEL, E.L.; HORTON, J.C.; Substance dependence and other psychiatric disorders among drug dependent subjects: race and gender correlates. **The American Journal on Addictions**, v. 9, p.113-125, 2000.

CONNOR, K.M.; KOBAK, K.A.; CHURCHILL, L.E.; KATZELNICK, D.; DAVIDSON, J.R. Mini-SPIN: A brief screening assessment for generalized social anxiety disorder. **Depress Anxiety**, v. 14, n.2, p. 137-140, 2001.

CONSROE, P.; LAGUNA, J.; ALLENDER, J.; SNIDER, S.; STERN, L.; SANDYK, R.; KENNEDY, K.; SCHRAM, K. Controlled clinical trial of cannabidiol in huntington's disease. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 40, n. 3, p. 701-708, 1991.

CRIPPA, J.A.; ZUARDI, A.W.; GARRIDO, G.E.; WICHERT-ANA, L.; GUARNIERI, R.; FERRARI, L.; AZEVEDO-MARQUES, P.M.; HALLAK, J.E.; MCGUIRE, P.K.; FILHO BUSATTO, G. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 417-426, 2004.

CRYAN, J.F.; SAVIGNAC, H.M.; HYLAND, N.P.; DINAN, T.G. The effects of repeated social interaction stress on behavioural and physiological parameters in a stress-sensitive mouse strain. **Behavioural Brain Research**, v. 216, p. 576-584, 2011.

CUNHA, J.; CARLINI, E.A.; PEREIRA, A.E.; RAMOS, O.L.; PIMENTEL, C.; GAGLIARDI, R.; SANVITO, W.L.; LANDER, N.; MECHOULAM, R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**, v. 21, p. 175-185, 1980.

DAVIDSON, J.R.; POTTS, N.; RICHICHI, E.; KRISHNAN, R.; FORD, S.M.; SMITH, R.; WILSON, W.H. Treatment of social phobia with clonazepam and placebo. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 13, n. 6, p.423-428, 1993.

DAVIDSON, J.R.; POTTS, N.L.; RICHICHI, E.A.; FORD, S.M.; KRISHNAN, K.R.; SMITH, R.D.; WILSON, W. The Brief Social Phobia Scale. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 52, p.48-51, 1991.

DEGENHARDT, L.; HALL, W.; LYNSKEY, M. The relationship between cannabis use, depression and anxiety among Australian adults: findings from the National Survey of Mental Health and Well-Being. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 36, p. 219-227, 2001.

DEL-BEN, C.M.; VILELA, J.A.; HETEM, L.A.; GUIMARAES, F.S.; GRAEFF, F.G.; ZUARDI, A.W. Do panic patients process unconditioned fear vs. conditioned anxiety differently than normal subjects? **Psychiatry Research**, v. 104, n. 3, p. 227-37, 2001.

FABRE, L.F.; MCLENDON, D. The efficacy and safety of nabilone (a synthetic cannabinoid) in the treatment of anxiety. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 377-382, 1981.

FITZGERALD, L. Blunted Affect is Associated With Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (HPA) Hypoactivity an Elevated CSF-Interleukin-I Beta (IL-I β) in Response to Lumbar Puncture. **Biological Research for Nursing**, v. 13, n^o 2, p. 164-174, 2010.

FURMARK, T.; TILLFORS, M.; MARTEINSDOTTIR, I.; FISCHER, H.H.; PISSIOTA, A.; LANGSTROM, B. Common changes in cerebral blood flow in patients with social phobia treated with citalopram or cognitive-behavioral therapy. **Archives General Psychiatry**, v. 59, p. 425-433, 2002.

GILL, J.M.; SALIGAN, L.; WOODS, S.; PAGE, G. PTSD is associated with an excess of inflammatory immune activities. **Perspectives in Psychiatric Care**, v. 45, n.4, p.262-277, 2009.

LIYOU, G.I.; EL-REMESSY, A.B.; IBRAHIN, A.S.; CALDWELL, R.B.; KALIFA, Y.M.; GUNES, A.; NUSSBAUM, J.J. Cannabidiol As a Putative Novel Therapy for Retinopathy: A Postulated Mechanism of Action as an Entry Point for Biomarker-Guided Clinical

Development. **Current Pharmacogenomics Personalized Medicine**, v. 7, n.3, p. 215-222, 2009.

GOISMAN, R.M.; GOLDENBERG, I.; VASILE, R.G.; KELLER, M.B. Comorbidity of anxiety disorders in a multicenter anxiety study. **Comprehensive Psychiatry**, v. 36, n.4, p. 303-311, 1995.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 811-829, 1994.

GRAEFF, F.G.; SILVA, M.; DEL BEM, C.M.; ZUARDI, A.W.; HETEM, L.A.; GUIMARAES, F.S. Comparison between two models of experimental anxiety in healthy volunteers and panic disorder patients. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 753-759, 2001.

GRAY, J.A. Precipit of the neuropsychology of anxiety. An enquiry into the functions of the septohippocampal system. **Behavior Brain Science**, v. 5, p.469-534, 1982.

GRIEL, L.A. Comparative study on some chemical and biological characteristics of various samples of cannabis resin. **Bulletin on Narcotics**, v. 14, p. 37-46, 1976.

GUIMARAES, F.S.; CHIARETTI, T.M.; GRAEFF, F.G.; ZUARDI, A.W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 100, p. 558-559, 1990.

GUIMARÃES, F.S.; ZUARDI, A.W.; GRAEFF, F.G. Effect of chlorimipramine and maprotiline on experimental anxiety in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 1, p. 184-192, 1987.

HALL, W.; SOLOWIJ, N. Adverse effects of cannabis. **Lancet**, v. 352, n. 9140, p. 1611-1616, 1998.

HALLAK, J.E.C.; DE SOUZA, J.P.M.; ARRAIS, K.C.; ALVES, N.T.; CHAGAS, M.H.N.; GAYA, C.M.; CRIPPA, J.A.S. Facial affect processing in social anxiety: Tasks and stimuli. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 193, p. 1-6, 2010.

HAMILTON, M. A rating scale for depression. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 23, p. 56-62, 1960.

HOFMANN, S.G.; DIBARTOLO, P.M. An instrument to assess self-statements during public speaking: scale development and preliminary psychometric properties. **Behavior Therapy**, v. 31, n.3, p. 499-515, 2000.

HOLLISTER, L.E. Health aspects of cannabis. **Pharmacological Reviews**, v. 38, n.1, p. 1-20, 1986.

HONÓRIO, K.M.; ARROIO, A.; SILVA, A.B.F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. **Química nova**, v. 29, n.2, p. 318-325, 2006.

HUESTIS, M.A. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. **Chemistry and Biodiversity**, v. 4, n.8, p. 1770-1804, 2007.

ILARIA, R.L.; THORNBY, J.I.; FANN, W.E. Nabilone, a cannabiniol derivative, in the treatment of anxiety neuroses. **Current Therapeutic Research**, v. 29, p. 943-949, 1981.

JOHNS, A. Psychiatric effects of cannabis. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 178, p. 116-122, 2001.

CRIPPA, J.A.S.; ZUARDI, A.W.; HALLAK, J.E.C. Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 556-566, 2010.

PAUDEL, K.S.; HAMELL, D.C.; AGU, R.U.; VALIVETI, S.; STHINCHCOMB, A.L. Cannabidiol bioavailability after nasal and transdermal application: effect of permeation enhancers. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n.9, p. 1088-1097, 2010.

KARNIOL, I.G.; CARLINI, E.A. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. **Psychopharmacologia**, v. 33, p. 53-70, 1973.

LANGS, G.; FABISH, H.; FABISH, K.; ZAPOTOCZKY, H.G. Can cannabis trigger recurrent panic attacks in susceptible patients? **European Psychiatry**, v. 12, p. 224-231, 1997.

LE GUELLEC, C.; GAUDET, M.L.; BRETEAU, M. Improved selectivity for high-performance liquid chromatographic determination of clonazepam in plasma of epileptic Patients. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences Applications**, v. 719, p. 227-33, 1998.

LIEBOWITZ, M.R.; HEIMBERG, R.G.; FRESCO, D.M.; TRAVERS, J.; STEIN, M.B. Social phobia or social anxiety disorder: what's in a name? **Archives of General Psychiatry**, v. 57, n.2, p. 191, 2000.

MANZANARES, J.; URIGUEN, L.; RUBIO, G.; PALOMO, T. Role of endocannabinoid system in mental diseases. **Neurotox Research**, v. 6, n.3, p. 213-224, 2004.

MATHEW, R.J.; WILSON, W.H.; CHIU, N.Y.; TURKINGTON, T.G.; DEGRADO, T.R.; COLEMAN, R.E. Regional cerebral blood flow and depersonalization after tetrahydrocannabinol administration. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 100, p. 67-75, 1999.

MCGEE, R.; WILLIAMS, S.; POULTON, R.; MOFFITT, T. A longitudinal study of cannabis use and mental health from adolescence to early adulthood. **Addiction**, v. 95, n.4, p. 491-503, 2000.

MCNAIR, D.M.; FRANKENTHALER, L.M.; CZERLINSKY, T.; WHITE, T.W.; SASSON, S.; FISHER, S. Simulated public speaking as a model of clinical anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 77, n.1, p. 7-10, 1982.

BERGAMASCHI, M.M.; QUEIROZ, R.H.; CHAGAS, M.H.; OLIVEIRA, D.C.; DE MARTINIS, B.S.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; ROESLER, R.; SCHRODER, N.; NARDI, A.E.; MARTÍN-SANTOS, R.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A. Canabidiol Reduces the Anxiety Induced by Simulated Public Speaking in Treatment-Naïve Social Phobia Patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n.6, p. 1219-1226, 2011.

MORAN, C. Depersonalization and agoraphobia associated with marijuana use. **The British Journal of Medical Psychology**, v. 59, p. 187-196, 1986.

MUESER, K.T.; DRAKE, R.E.; WALLACH, M.A. Dual diagnosis: a review of etiological theories. **Addictive Behaviors**, v. 23, p. 717-734, 1998.

NADULSKI, T.; SPORKERT, F.; SCHNELLE, M.; STADELMANN, A.M.; ROSER, P.; SCHEFTER, T.; PRAQST, F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. **Journal of analytical toxicology**, v. 29, n.8, p. 782-789, 2005.

NADULSKI, T.; PRAQST, F.; WEINBERG, G.; ROSER, P.; SCHNELLE, M.; FRONK, E.M.; STADELMANN, A.M. Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Study about the effects of Cannabidiol (CBD) on the Pharmacokinetics of Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) After Oral Application of THC Verses Standardized Cannabis Extract. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n.6, p. 799-810, 2005.

NAKAMURA, M.; FUKAWA, K.; SUGIYAMA, T.; KATAGIRI, Y. High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Clonazepam in Human Using a Non-porous Silica Column. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n.6, p. 893-895, 2004.

NORRIS, H. The action of sedatives on brain stem oculomotor systems in man. **Neuropharmacology**, v. 10, n.21, p.181-191, 1971.

ONAIVI, E.S.; GREEN, M.R.; MARTIN, B.R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, p. 1002-1009, 1990.

OTTO, M.W.; POLLACK, M.H.; GOULD, R.A.; WORTHINGTON, J.J.; MCARDLE, E.T.; ROSENBAUM, J.F. A comparison of the efficacy of clonazepam and cognitive-behavioral group therapy for the treatment of social phobia. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 14, n.4, p.345-58, 2000.

PARKER, T.A.; CHENG, H.; WILLEFORD, K.O.; WU, S. Interleukin-6 in response to innate immune regulatory factor stimulation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n.2, p. 90-94, 2010.

POLI, P.F.; BHATTACHARYYA, S.; ALLEN, P.; CRIPPA, J.A.; BORGWARDT, S.; SANTOS, R.M.; SEAL, M.; O'CARROL, C.; ATAKAN, Z.; ZUARDI, A.W.; MCGUIRE, P. Effect of image analysis software on neurofunctional activation during processing of emotional human faces. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 311-314, 2010.

POLI, P.F.; BHATTACHARYYA, S.; ALLEN, P.; CRIPPA, J.A.; BORGWARDT, S.; SANTOS, R.M.; SEAL, M.; O'CARROL, C.; ATAKAN, Z.; ZUARDI, A.W.; MCGUIRE, P.; MECHELLI, A. Modulation of effective connectivity during emotional processing by Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, p. 421-432, 2010.

REILLY, D.; DIDCOTT, P.; SWIFT, W.; HALL, W. Long-term cannabis use: characteristics of users in an Australian rural area. **Addiction**, v. 93, n.6, p. 837-846, 1998.

RODRÍGUEZ, E.M.; ALDACO, D.M.; RIVERO, M.P.; MECHOULAM, R.; COLÍN, R.D. Cannabidiol, a constituent of *Cannabis sativa*, modulates sleep in rats. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 580, p. 4337-4345, 2006.

RODRÍGUEZ, E.M.; RIVERO, M.P.; ALDACO, D.M.; MECHOULAM, R.; COLÍN, R.D. Effects on sleep and dopamine levels of microdialysis perfusion of cannabidiol into the lateral hypothalamus of rats. **Life Sciences**, v. 88, p.504-511, 2011

JIANG, R.; YAMAMORI, S.; TAKEDA, S.; YAMAMOTO, I.; WATANABLE, K. Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. **Life Sciences**, v. 89, p. 165-170, 2011.

SALLUSTIO, B.C.; KASSAPIDIS, C.; MORRIS, R.G. High-performance liquid chromatography determination of clonazepam in plasma using solid-phase extraction. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 16, n.2, p. 174-178, 1994.

WARD, S.J.; RAMIREZ, M.D.; NEELAKANTAN, H.; WALKER, E.A. Cannabidiol Preventes the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57B16 Mice. **Anesthesia and Analgesia**, v. 113, n.4, p. 947-950, 2011.

STEIN, M.B.; WALKER, J.R.; FORDE, D.R. Setting diagnostic thresholds for social phobia: considerations from a community survey of social anxiety. **The American Journal of Psychiatry**, v. 151, n.3, p. 408-412, 1994.

STEWART, S.H.; KARP, J.; PIHL, R.O.; PETERSON, R.A. Anxiety sensitivity and self-reported reasons for drug use. **Journal of Substance Abuse**, v. 9, p. 223-240, 1997.

THOMAS, H. A community survey of adverse effects of cannabis use. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 42, n.3, p. 201-207, 1996.

TOURNIER, M.; SORBARA, F.; GINDRE, C.; SWENDSEN, J.D.; VERDOUX, H. Cannabis use and anxiety in daily life: a naturalistic investigation in a non-clinical population. **Psychiatry Research**, v. 118, n.1, p.1-8, 2003.

TROISI, A.; PASINI, A.; SARACCO, M.; SPALLETTA, G. Psychiatric symptoms in male cannabis users not using other illicit drugs. **Addiction**, v. 93, n.4, p. 487-492, 1998.

TUNVING, K. Psychiatric aspects of Cannabis use in adolescents and young adults. **Pediatrician**, v. 14, p. 83-91, 1987.

VIEIRA, M.M.M.; FERREIRA, T.B.; PACHECO, P.A.F.; BARROS, O.P.; ALMEIDA, C.R.M.; LIMA, C.F.A.; FILHO, R.G.S.; HYGINO, J.; ANDRADE, R.M.; LINHARES, U.C.; ANDRADE, A.F.B.; BENTO, C.A.M. Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder. **Journal of Neuroimmunology**, v. 229, p. 212-218, 2010.

ZUARDI, A.W.; COSME, R.A.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, v. 7, p. 82-88, 1993.

ZUARDI, A.W.; KARNIOL, I.G. Changes in the conditioned emotional response of rats induced by Δ^9 -THC, CBD and mixture of the two cannabinoids. **Achieves of Biology and Tecnology**, v. 26, p. 391-397, 1983.

ZUARDI, A.W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I.G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology (Berl)**, v.76, p. 245-250, 1982.

ZUARDI, A.W.; KARNIOL, I.G. Estudo transcultural de uma escala de auto-avaliação para estados subjetivos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 31, p. 403-406, 1981.

ANEXOS

Anexo A. Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP n.º. 086/2012
 kms

Ribeirão Preto, 20 de dezembro de 2012.

Ao Pós-graduando
Luiz Carlos Pereira Junior
 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena Costa Queiroz
 FCFRP/USP

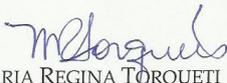
Prezado Pós-graduando,

Informamos que foi aprovado *ad referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 20 de dezembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO CANABIDIOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP n.º. 290.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,


 PROF^ª. DR^ª. MARIA REGINA TORQUETI
 Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B. Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 04 de janeiro de 2013

Projeto de pesquisa: “Avaliação da Administração Oral do Canabidiol em Voluntários Sadios”

Pesquisadora responsável: Luiz Carlos Pereira Junior e Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

“O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa
Coordenador Técnico Científico da Unidade
de Pesquisa Clínica – HCFMRP-USP

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro
SISNEP/CONEP nº 4
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo C. Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar de um estudo clínico conduzido por Luiz Carlos Pereira Junior, Dra. Regina Helena Costa Queiroz e Dr. Antônio Waldo Zuardi intitulado “Avaliação da Administração Oral do Canabidiol em Voluntários Sadios”.

Antes de decidir se quer participar, é importante que você entenda a razão deste estudo, e os possíveis benefícios, riscos e desconforto.

Por favor, leia atentamente as informações deste folheto e, em caso de dúvidas, o médico Dr. Antônio Waldo Zuardi do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, estará pronto a respondê-las.

Os objetivos deste estudo são avaliar as diferenças de absorção entre as duas formulações do canabidiol (cápsulas com o canabidiol em pó e cápsulas com o fármaco dissolvido em óleo de milho). Serão utilizadas cápsulas com amido de milho (placebo). O canabidiol é uma substância extraída da maconha e não apresenta efeitos psicoativos, isto é, ansiedade, sedação, aumento de batimento cardíaco, boca seca e fome, além de não causar tolerância e nem dependência química.

Você deverá comparecer ao laboratório após o jejum, realizado em sua residência, seguindo orientações padrão de alimentação: copo de leite, pão com manteiga e uma fruta. Vinte e quatro horas antes do experimento você não deverá ingerir compostos cafeinados (café, coca-cola, chá mate e bebidas energéticas) nem bebidas alcoólicas.

Ao chegar ao laboratório um profissional treinado e habilitado colocará em seu braço direito uma cânula venosa que lhe causará o mínimo de desconforto físico. Logo em seguida será coletada a primeira amostra de sangue (4 ml) e será pedido para que responda as escalas psicológicas. Depois disso fará ingestão de uma das 3 cápsulas (canabidiol em pó, dissolvido em óleo ou cápsula de amido de milho). Posteriormente, serão feitas sete coletas, de 4 ml cada, e serão aplicadas as escalas psicológicas para avaliação do nível de ansiedade. Na metade do estudo você será submetido ao teste de simulação de falar em público, quando será solicitado que elabore um discurso sobre o sistema de transporte público em sua cidade. Você falará em frente a uma tela de TV, vendo sua própria imagem, e isso será gravado para análise por psicólogos. Ao final do experimento, que durará quatro horas, haverá a tarefa de reconhecimento de expressões faciais, que consiste basicamente no reconhecimento de emoções expressas em faces humanas (alegria, tristeza, medo, nojo, raiva e surpresa), que aparecerão em uma tela de computador.

Sua participação no estudo é voluntária, sem gratificações, e você poderá desistir em qualquer momento, e isso causará prejuízos em sua relação com o pesquisador e nem com a instituição.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e será assegurado o sigilo quanto a sua participação. Os resultados deste estudo serão publicados em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

Os riscos deste estudo estão relacionados apenas com o acesso venoso. Existe o risco de perder o acesso e ter que puncionar outra veia, assim como

também existe o risco do desenvolvimento de flebite (inflamação da veia). O canabidiol já foi testado em animais e em seres humanos, e não foram demonstrados efeitos colaterais.

Eu li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo voluntariamente em participar do presente estudo. Entendo que receberei uma cópia deste “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” assinado.

Autorizo a divulgação dos resultados dos estudos em revistas médicas nacionais ou internacionais. **Entendi que todos os resultados serão analisados de maneira confidencial.**

Eu,

portador do RG nº _____, declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador(a) e ter compreendido o que me foi explicado, concordo em participar da pesquisa, por livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2012

Assinatura do participante

Luiz Carlos Pereira Junior – Pesquisador responsável

OBS: Para outros esclarecimentos ou em caso de desistência, favor entrar em contato com:

→ Dr. Antônio Waldo Zuardi - (16) 3602-2835 ou (16) 9199-2997

→ Luiz Carlos Pereira Junior - (16) 3602-4259

Avenida do Café, s/n, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Número de telefone não comercial do pesquisador responsável-(16) 8171-3282