UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

ABORDAGEM METABOLÔMICA NO ESTUDO DE EXPOSIÇÃO GESTACIONAL À FUMAÇA DE *Cannabis sativa* EM COBAIAS

Ana Rosa Lins de Souza

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

ABORDAGEM METABOLÔMICA NO ESTUDO DE EXPOSIÇÃO GESTACIONAL À FUMAÇA DE *Cannabis sativa* EM COBAIAS

Ana Rosa Lins de Souza

VERSÃO ORIGINAL

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2018

À minha mãe, ***Claudia Lins*** *(sempre presente), a pessoa que sempre se preocupou para que eu tivesse sólida formação moral e intelectual. Minha grande incentivadora, que tantas vezes abriu mão de seus próprios interesses para que eu tivesse as melhores oportunidades. Serei eternamente grata pelos ensinamentos*

À ***Dora Alice****, que para mim, sempre significou muito mais do que uma irmã. Minha melhor amiga, conselheira, porto seguro nos momentos mais difíceis de minha vida. Agradeço pelo amor verdadeiro, dedicação, por compartilhar comigo todos os momentos importantes de minha vida e por se orgulhar imensamente de todas as minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares**, minha enorme gratidão pela paciência, carinho, apoio, ensinamentos tanto científicos quanto de vida. Por quem tenho uma grande admiração tanto como pessoa, quanto cientista. Sinto me privilegiada por tê-la como orientadora e modelo a ser seguido. Espero que meu maior reconhecimento seja o de honrar a riqueza recebida com seu convívio, procurando guiar-me pelos seus ensinamentos.

Aos meus pais (Claudia e Antonio), meus queridos e companheiros irmãos e agregados (Dora Alice – Robert, Antonio Celso – Eliane, Claudia Maria e Mariangela) e meus pequenos amores (Lucas, Felipe e Rosa Luiza), obrigada pela paciência e compreensão pelas ausências devido aos estudos, prometo recompensar.

Aos meus tantos e queridos amigos que tinha e que fiz ao longo dessa jornada no Doutorado:

Aos amigos do laboratório, Gisele, Andréa, Carol, Fabio, Ana Paula, Nadine e Daniel que me incentivaram, me apoiaram nos momentos que mais precisava, me ajudaram e tiveram paciência em me ensinar, que me escutaram e que dividimos boas risadas. Um obrigado especial à Gisele e Andréa pelos ensinamentos em metabolômica.

Ao Prof. Dr. João Farah, pelos ensinamentos de vida, pelas provocações científicas e políticas, por quem tenho enorme carinho, mesmo me chamando de “boticária”.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto Junior, pela colaboração e pelas conversas de apoio e incentivo.

Ao Adelson Neto, obrigada pelo apoio, incentivo, pelas conversas, por sempre acreditar no meu trabalho e pela imensa ajuda na formatação da tese.

Às Profas que tanto me ensinaram e tive a alegria de aprender, Elizabeth Nascimento e Ana Paula Loureiro.

À Fabiane Dörr e Beatriz Paranhos pela ajuda nos equipamentos.

Aos Profs Mauricio Yonamine, Ana Valéria Cantu e Tiago Franco pela contribuição ao meu trabalho no exame de qualificação.

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Já em 1908, o eminente matemático alemão Felix Klein, denunciava que os cientistas nas universidades se preocupavam muito pouco, ou nada, com o fato de que muitos de seus alunos seriam futuros professores de escola. Dizia ele que, ao entrar na universidade, os alunos se deparavam com coisas que nada tinham a ver com o que haviam aprendido na escola - de modo que logo esqueciam estas coisas -, e que ao saírem da universidade e começarem a ensinar, se viam incapazes de relacionar o que haviam aprendido com o que tinham que ensinar, de modo que logo esqueciam o que haviam aprendido na universidade e se voltavam para sua experiência anterior, que reproduziam em suas classes...

Eu gosto da matemática do matemático, gosto mesmo. Não preciso explicar o por quê, mas devo esclarecer o que isso quer dizer. *Eu* gosto, mas isto não implica que *você* goste, esta é a essência. E isto quer menos ainda dizer que eu ache que você *deva* gostar. Vai daí que eu aprendi que a diferença não deve ser eliminada, e sim *percebida e aceita*, para que possa estar presente a proposta de que você, eventualmente, seja capaz de pensar como eu *quando quiser*, assim como eu, enquanto professor, vou tentar o melhor que posso para entender como você pensa. Não quero *corrigir* você, e sim lhe ajudar a crescer, sem que você tenha que abandonar outras maneiras de produzir significado para o que lhe aparece. Não é a isso que a educação se propõe?...”

Prof. Dr. Romulo Campos Lins

RESUMO

Souza, A. R. L. **Abordagem metabolômica no estudo de exposição gestacional à fumaça de *Cannabis sativa* em cobaias**. 2018. 93f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os estudos de metabolômica ganham importância a cada dia, por ajudarem a explicar processos biológicos em situações normais (fisiológicas) ou patológicas. Oferecem uma nova visão sobre o impacto funcional da expressão gênica, complementando os estudos de sequenciamento gênico, que negligenciam o impacto da exposição ao meio ambiente na etiologia de doenças. A metabolômica tem sido aplicada na toxicologia, mostrando que o perfil metabólico comparativo de duas situações, controle e teste, pode desempenhar um papel importante na descoberta e validação de biomarcadores, além de contribuir para o entendimento e consequente interpretação dos mecanismos de ação tóxica de xenobióticos. Este projeto de pesquisa tem por objetivo utilizar uma abordagem metabolômica para avaliar o impacto de alterações metabólicas no cérebro da prole de camundongos, ocorridas após exposição (via inalação) à fumaça decorrente da queima de maconha (*Cannabis sativa*). Fêmeas gestantes foram expostas a doses diárias de *Cannabis sativa* ou ar filtrado durante todo o período gestacional. Após o nascimento, os filhotes machos ao atingirem a idade para o desmame, considerado como fase adolescente, foram separados de suas respectivas mães e expostos à *Cannabis sativa* ou ar filtrado por mais 60 dias. As amostras de cérebro da prole foram submetidas a análises por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) numa abordagem metabolômica global (*untargeted metabolomics*). Os perfis metabólicos dos cérebros dos animais expostos (grupo teste) foram comparados com os obtidos na análise do grupo controle (não expostos), sendo identificados os metabólitos discriminadores candidatos. Estavam alterados os metabólitos: isoleucina, uréia, leucina, GABA, ácido succínico, ácido fumárico, serina, treonina, creatinina, ácido glutâmico, ácido acetilaspártico, glicerol -1 -fosfato, ácido ascórbico, tirosina, ácido cítrico, adenina, hipoxantina, inosina e uracila. A partir dos resultados apresentados, pode-se observar, que tanto a exposição gestacional à *Cannabis sativa*, quanto a exposição da prole na fase adolescente, provocam alterações metabólicas importantes. Os metabólitos significativamente alterados estão envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico, responsável pela respiração mitocondrial, na produção de energia, atuam na biossíntese de aminoácidos, glicólise, estresse oxidativo, podendo alterar o desenvolvimento e maturação do cérebro. Os resultados são preliminares, mas contribuem para o melhor entendimento dos

mecanismos toxicológicos envolvidos na exposição crônica causada por essa droga, contribuindo para a prevenção e diagnóstico de danos no desenvolvimento fetal e adolescente.

Palavras-chave: Metabolômica. *Cannabis sativa*. Exposição gestacional.

ABSTRACT

Souza, A. R. L. **A metabolomics study of gestational exposure to smoke of *Cannabis sativa* in mice**. 2018. 93f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Metabolomics studies gain importance each day because they help explain biological processes in normal (physiological) or pathological situations. They provide a new insight into the functional impact of environmental gene expression, complementing gene sequencing studies that neglect the impact of environmental exposure on the etiology of diseases. Metabolomics has been applied in toxicology, showing that the comparative metabolic profile of two situations, control and test, can play an important role in the discovery and validation of biomarkers, in addition to contributing to the understanding and interpretation of the toxic action mechanisms of xenobiotics. This research project aims to use a metabolomic approach to evaluate the impact of metabolic changes in the brain of the offspring of mice, which occurred after exposure (via inhalation) to the smoke from the burning *Cannabis sativa*. Pregnant females were exposed to daily doses of *Cannabis sativa* or filtered air throughout the gestational period. After birth, male offspring were reached adolescents weaning age were separated from their respective mothers and exposed to *Cannabis sativa* or to the filtrate for another 60 days. Offspring brain samples were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in a global metabolomic approach (non-target metabolomics). Metabolic profiles of the exposed animals brains (test group) were compared with those obtained in the control group (non-exposed), and the candidate discriminant metabolites were identified. The metabolites were altered: isoleucine, urea, leucine, GABA, succinic acid, fumaric acid, serine, threonine, creatine, glutamic acid, acetyl aspartic acid, glycerol-1-phosphate, ascorbic acid, tyrosine, citric acid, adenine, hypoxanthine, inosine and uracil were altered. From the results presented, it can be observed that both the gestational exposure in *Cannabis sativa* and the exposure of the adolescent phase exposure, induced important metabolic alterations. Significantly altered metabolites are involved in the tricarboxylic acid, which are responsible for mitochondrial respiration, in energy production, act at the amino acid biosynthesis, glycolysis, oxidative stress, which may alter the development and maturation of the brain. The results are preliminary but contribute to a better understanding of the mechanisms of toxicity and of fetal and adolescent infection.

Keywords: Metabolomics. *Cannabis sativa*. Gestational exposure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos principais canabinóides. 20

Figura 2. Principais vias de biotransformação do Δ^9-THC e seus metabólitos (Adaptado de DINIS-OLIVEIRA, 2016). 22

Figura 3. Estruturas químicas dos endocanabinóides. 23

Figura 4. Representação do fluxo de trabalho para análise metabolômica (Adaptado de KLASSEN et al., 2017). 31

Figura 5. Estruturas químicas dos agentes derivatizantes N-o-bis-(trimetilsilil)-trifluoracetamida com Trimetilclorosilano. 37

Figura 6. Reação de sililação do THC-COOH utilizando BSTFA e TMCS. 38

Figura 7. Reação de oximação (A) seguida de sililação (B) de um composto esteroide. 38

Figura 8. Representação esquemática do sistema de exposição à fumaça da *Cannabis sativa*. 46

Figura 9. Esquema ilustrativo do plano de trabalho de exposição dos animais experimentais. 46

Figura 10. Cromatograma dos íons extraídos de THC-COOH, analisado por GC-MS, no modo SIM, registrando a intensidade dos m/z (371, 372, 473, 488), no tempo de retenção de 11,088 minutos. 54

Figura 11. Cromatograma dos íons extraídos de Δ^9-THC-D_3, analisados por GC-MS no modo SIM, registrando a intensidade dos m/z (306, 315, 389 e 374), no tempo de retenção de 8,630 min. 54

Figura 12. Curva analítica construída com THC-COOH e Δ^9 THC-D_3, onde a equação da reta e o coeficiente de determinação obtidos foram: y = 0,015X – 0,0406 e R^2 = 0,997 (faixa de concentração 7,5 a 150 ng/mL). 56

Figura 13. Gráfico da análise de resíduos (**A**), variando entre 0.80 a -1.70 e gráfico da barra de erro (**B**) com desvio padrão de 0.90, obtidos a partir da curva analítica construída com THC-COOH e Δ^9 THC-D_3. 56

Figura 14. Desenho de mistura de solventes para avaliação da extração de metabólitos do cérebro de camundongo. (A) 100% MetOH, (B) 100% H_2O, (C) MetOH:H_2O (1:1), (D) MetOH:$CHCl_3$ (1:1), (E) H_2O:$CHCl_3$ (1:1), (F) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3,3:3,3:3,3), (G) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (1:6:3), (H) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3:6:1), (I) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (4:2:4), (J) 100% $CHCl_3$. As proporções estão em volume. . 60

Figura 15. Cromatogramas das diversas condições de extração das misturas de solventes do cérebro de camundongo. Intensidade de 1.10^5 61

Figura 16. Esquema ilustrativo dos grupos teste e controle. 64

Figura 17. Gráfico de escore do modelo de PCA com amostras dos grupos **QC** (amostras controle de qualidade) e prole dos grupos **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação), **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação), **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação) **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.834$ e $Q^2 = 0.753$..... 65

Figura 18. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com todos os grupos. **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação), **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação), **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação) **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo com 4 componentes: $R^2 = 0.935$ e $Q^2 = 0.881$, ANOVA: F = 6.26 e p-valor = $2{,}6 \times 10^{-7}$. 66

Figura 19. Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (100 permutações)..... 67

Figura 20. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com amostras dos grupos **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação) e **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.996$ e $Q^2 = 0.989$, ANOVA: F = 42.04 e p-valor = 0.000435. 67

Figura 21. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com os grupos. **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação) e **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis*). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.983$ e $Q^2 = 0.877$, ANOVA: F = 7.76 e p-valor = 0.021..... 68

Figura 22. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com os grupos. **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação) e **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.993$ e $Q^2 = 0.971$, ANOVA: F = 23.29 e p-valor = 0.0178..... 68

Figura 23. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com os grupos. **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação) **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.998$ e $Q^2 = 0.994$, ANOVA: F = 26.51 e p-valor = 0.00364. 69

Figura 24. Esquema de comparações entre os grupos analisados. 70

Figura 25. Representação esquemática dos metabólitos significativos envolvidos na via do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), metabolismo do glutamato e síntese de aminoácidos. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biomarcadores relacionados com doenças, toxicidade e alterações fisiológicas. ...41
Tabela 2. Condições instrumentais do método CG-MS para análise de THC-COOH em urina. 49
Tabela 3. Condições instrumentais do método CG-MS para análise do cérebro. 51
Tabela 4. Principais íons utilizados para confirmação da exposição ao Δ^9-THC.....54
Tabela 5. Médias das concentrações do THC-COOH encontrados em amostras de urina da camundonga gestante (MÃE) e da prole. 58
Tabela 6. Score dado de acordo com as intensidades dos molecular features encontrados nas amostras de cérebro de camundongo.....62
Tabela 7. Número de compostos identificados e o score atribuído por cada proporção de solventes empregados no desenho de misturas de cérebro de camundongos.....62
Tabela 8. Metabólitos significantes e características dos compostos identificados pelo AMDIS no desenho de misturas de solventes MetOH:H_2O (1:1) aplicado ao cérebro de camundongo. 63
Tabela 9. Metabólitos significativos identificados no cérebro de camundongo, *p*-valor, fator NET e o fold change obtido pela análise metabolômica, após exposição à *Cannabis sativa*. .71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-OH-THC	11-Hidroxi-Tetraidrocanabinol
Δ^9-THC	Delta-9-Tetrahidrocanabinol
Δ^9-THCV	Delta-9-Tetrahidrocanabivarina
AA	Ácido Ascórbico
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSTFA	*N*,*o*-bis-(trimetilsilil)-trifluoracetaminda
BW	Largura De Banda
CB1	Receptores Canabinóides Tipo 1
CB2	Receptores Canabinóides Tipo 2
CBD	Canabidiol
CE	Eletroforese Capilar
QC	Controle de Qualidade
CYP 450	Citocromo P 450
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EI	Ionização por Elétrons
FWHM	Largura de Pico
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GC	Cromatografia Gasosa
GRUPO AF-AF	Grupo exposto ao ar filtrado durante e após a gestação
GRUPO AF-CS	Grupo exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação
GRUPO CS-AF	Grupo exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação
GRUPO CS-CS	Grupo exposto à *Cannabis* durante e após a gestação
HILIC	Cromatografia por Interação Hidrofílica
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

MAX	Número Máximo de Picos por Cromatograma de Íon Extraído
MINFRAC	Fração Mínima de Amostras
MS	Espectrometria de Massas
MZWID	Largura de Sobreposição de Faixas de *m/z*
NAA	Ácido Acetil Aspártico
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
PCA	Análise Multivariada Não Supervisionada
PLS-DA	Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais
RNA	Ácido Ribonucleico
SIM	Monitoramento de Íon Selecionado
SNC	Sistema Nervoso Central
SNTRESH	Relação Sinal/Ruído
TCA	Ciclo do Ácido Carboxílico
THC-COOH	11-Nor-Carboxi-Tetraidrocanabinol
TMCS	Trimetilclorosilano
VIP	Importância da Variável na Projeção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 *Cannabis sativa* 19

1.1.1 Toxicocinética 20

1.1.2 Toxicodinâmica 23

1.1.3 Efeitos Tóxicos e Clínicos 25

1.1.4 Efeitos da *Cannabis sativa* na Gestação 25

1.2 Metabolômica 28

1.2.1 Definições 28

1.2.2 Fluxo de Trabalho 30

1.2.3 Técnicas de Análise 32

1.2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear 32

1.2.3.2 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas 33

1.2.3.3 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas 34

1.2.3.4 Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria de Massas 35

1.2.4 Preparo de Amostra 36

1.2.5 Processamento e Análise dos Dados 39

1.2.6 Estudos de Metabolômica em Toxicologia 40

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO 43

3 OBJETIVOS 44

3.1 Objetivos Gerais 44

3.2 Objetivos Específicos 44

4 PARTE EXPERIMENTAL 45

4.1 Amostragem 45

4.2 Materiais e Reagentes 46

4.3 Padrões 47

4.4 Equipamentos....47
4.5 Métodos....47
4.5.1 Determinação de 11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol (THC-COOH) em urina 47
4.5.1.1 Método de Extração 47
4.5.1.2 Condições Analíticas....48
4.5.2 Desenho de Misturas na Extração para Cérebro de Camundongos....49
4.5.2.1 Método de Extração 49
4.5.2.2 Condições Analíticas....50
4.5.3 Análise Metabolômica do Cérebro de Camundongo....51
4.5.3.1 Método de Extração 51
4.5.3.2 Condições Analíticas....52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....53
5.1 Determinação de 11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol (THC-COOH) em urina 53
5.1.1 Validação Parcial do Método 55
5.1.2 Linearidade 55
5.1.3 Precisão....56
5.1.4 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) 57
5.1.5 Determinação Quantitativa de THC-COOH nas amostras 58
5.2 Desenho de Misturas na Extração para Cérebro de Camundongos 59
5.3 Análise Metabólica de Cérebro de Camundongo 64
6 CONCLUSÃO....77
6.1 Limitações Do Estudo....78
6.2 Pessoal envolvido na execução do projeto....78
REFERÊNCIAS....79
ANEXOS....94

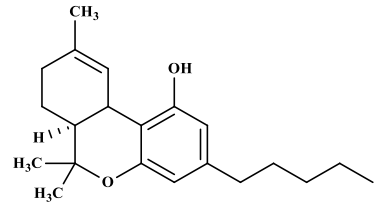
1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cannabis sativa*

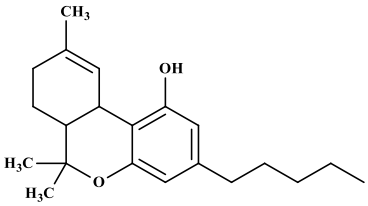
A *Cannabis sativa L.*, popularmente conhecida no Brasil, como maconha, cânhamo, erva ou C*annabis*, tem origem na Ásia Central, e seu uso está relatado há mais de 2.000 anos. É uma das drogas ilícitas mais consumidas no mundo. De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas (WDR, do inglês, World Drug Report), em 2015, o consumo de *Cannabis* s*ativa* entre as idades de 15 a 64 anos foi estimado em 183 milhões de pessoas, ou 3,9% da população mundial. No Brasil, o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD), em 2012, revelou que 7% da população adulta e 4% da população de adolescentes já haviam experimentado maconha na vida. Além disso, os dados mostraram que cerca 1,5 milhões de adolescentes e adultos usam maconha diariamente. Entre as mulheres gestantes, é uma das drogas ilícitas mais consumida (CRIPPA *et al*., 2005; SAMHSA, 2010; BATALLA *et al*., 2013; EMCDDA, 2011).

A *Cannabis sativa L.* contém mais de 421 compostos, sendo mais de 60 canabinóides, dentre eles, o delta-9-tetrahidrocanabinol (Δ^9-THC), principal substância psicoativa, o canabidiol (CBD, substância não psicoativa), o canabinol (CBN, substância psicoativa), o delta-8-tetrahidrocanabinol (Δ^8-THC, composto psicoativo isômero do Δ^9-THC), o delta-9-tetrahidrocanabivarina (Δ^9-THCV, substância psicoativa) e o canabigerol (CBG) (ASHTON, 2001; HUESTIS, 2007; PERTWEE, 2008; MOREAU, 2014). Na **Figura 1** são apresentadas as estruturas químicas de alguns dos canabinóides.

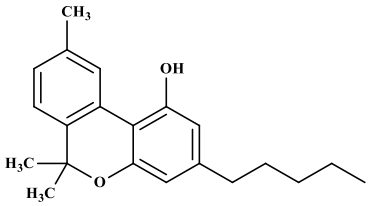
A concentração de Δ^9-THC na *Cannabis* pode variar de 0,3 % a 30% (MCGILVERAY, 2005), e dependendo da parte da planta utilizada, e modo de preparo para consumo, pode ter maior ou menor concentração a ser absorvida.



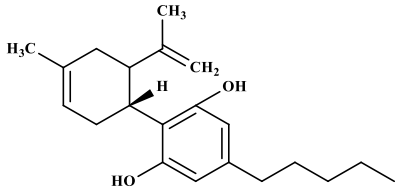
Delta-9-tetrahidrocanabinol (D^9-THC)



Delta-8-tetrahidrocanabinol (D^8-THC)



Canabinol (CBN)



Canabidiol (CBD)

Figura 1. Estrutura química dos principais canabinóides.

1.1.1 Toxicocinética

As vias de administração dos canabinóides no organismo são a oral, a sublingual, e a pulmonar, sendo a última, a principal via. A toxicocinética varia de acordo com a forma de administração. Pela via oral, o Δ^9-THC pode ser ingerido por alimentos que contenham a *Cannabis*, como bolos, biscoitos, ou ainda na forma de extratos, ou soluções alcoólicas em bebidas. Após a administração, a absorção ocorre pelo trato gastrintestinal, de forma irregular e lenta, com início dos efeitos entre 30 a 90 min, e duração dos efeitos entre 4 a 12 h após a exposição. Atinge biodisponibilidade sistêmica entre 4% a 12% da concentração ingerida (GROTENHERMEN, 2003; MOREAU, 2014).

A forma de absorção sublingual, ocorre através da ingestão dos fármacos contendo dronabinol, somente CBD ou misturas contendo Δ^9-THC, CBD e outros canabinóides em menor proporção (HUESTIS, 2007). No Brasil, apenas o medicamento Mevatyl® (Beaufour Ipsen Farmacêutica Ltda), comercializado em outros países com o nome Sativex® (27 mg/mL de Δ^9 THC + 25 mg/mL de CBD) (GW Pharmaceuticals – Canadá) possui o registro para produção e comercialização.

Após absorção pela via pulmonar, tendo sida a *Cannabis sativa* fumada, vaporizada ou administrada por inalação passiva da fumaça, o Δ^9-THC atinge nível plasmático máximo entre

3 a 10 min, com disponibilidade sistêmica entre 8% a 24% da concentração ingerida. Liga-se entre 97% a 99% a proteínas plasmáticas e o início dos efeitos são imediatos, podendo durar de 2 a 3 h após a exposição (GROTENHERMEN, 2003; MOREAU, 2014). McGilveray (2005) observou que com a administração de um cigarro de *Cannabis* com 3,55% de Δ^9-THC, pode ocorrer um pico plasmático aproximado de 152 ± 86 ng/mL, após 10 min da exposição.

Já Lichtman *et al*. (2001), realizaram um estudo expondo camundongos à fumaça da *Cannabis*, numa concentração de 2 mg/Kg, e obtiveram uma concentração sanguínea de 149 ± 43 ng/mL. Após a absorção da *Cannabis*, o Δ^9-THC é amplamente distribuído, sendo encontrado no cérebro e fígado (HUESTIS, 2007). A biotransformação dos compostos canabinóides ocorre principalmente no fígado, pelas enzimas hepáticas, podendo ocorrer processos de oxidação e/ou hidroxilação com enzimas do citocromo P (CYP) 450, 2C9, 2C19 e 3A4, e conjugação com ácido glucurônico, como demonstrado na **Figura 2.** Foram também encontradas enzimas CYP 450 no cérebro e cerebelo (HUESTIS, 2007; DINIS-OLIVEIRA, 2016).

Os principais produtos de biotransformação do Δ^9-THC são o 11-hidroxi-tetraidro-canabinol (11-OH-THC) e o 11-nor-carboxi-tetraidro-canabinol (THC-COOH), que são eliminados principalmente pela urina. A detecção dos canabinóides urinários e seus produtos de biotransformação são, portanto, indicativos da exposição à *Cannabis*, sendo o mais utilizado, o THC-COOH, por ter um tempo de meia vida longo, e porque os outros, Δ^9-THC e 11-OH-THC, são encontrados na urina em concentrações bem menores. O THC-COOH pode ser detectado na urina, entre 8 a 122 h após a exposição, apresentando altas concentrações (HUESTIS, 2007). No estudo realizado por Huestis *et al*. (1996) em humanos, após um período de 7 dias de exposição a um único cigarro de *Cannabis* contendo 18 mg de Δ^9-THC, detectou-se uma concentração urinária de 34,6 a 171,6 µg de THC-COOH.

Gustafson *et al*. (2004), analisaram o tempo de eliminação do THC-COOH na urina de humano após exposição por via oral ao Δ^9-THC. Foram utilizadas doses de 0,39 a 14,8 mg/dia, por 14 dias. Observaram que o tempo de eliminação do THC-COOH foi de 2 a 3 dias após a cessação da exposição, com concentrações maiores que 15 ng/mL na urina.

O Δ^9-THC é altamente lipofílico e, em usuários crônicos de *Cannabis*, existe uma retenção prolongada no cérebro e no tecido adiposo, podendo ser responsável pela detecção prolongada de THC-COOH na urina, mesmo após dias da última exposição (BRUNET *et al*., 2006).

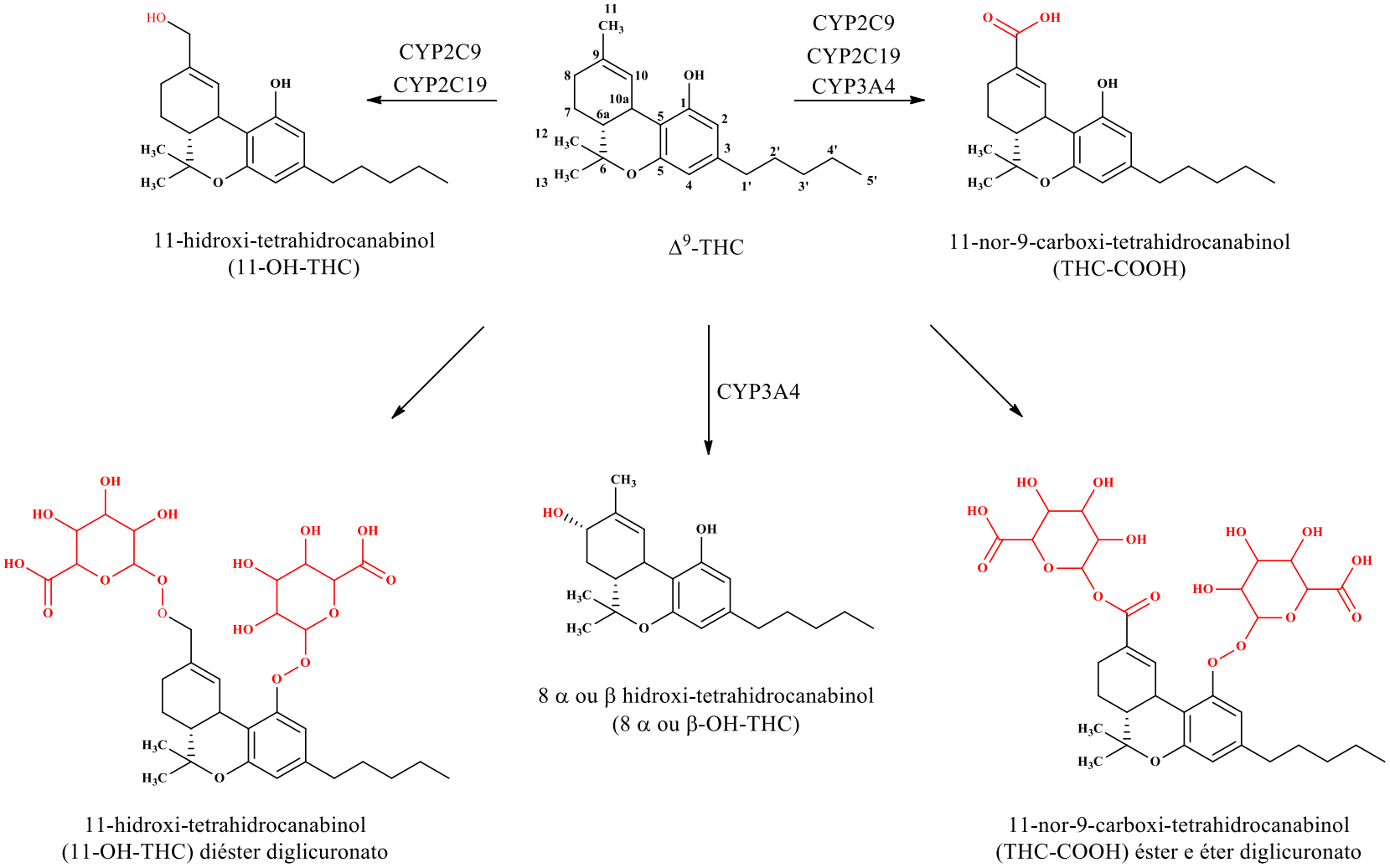


Figura 2. Principais vias de biotransformação do Δ^9-THC e seus metabólitos (Adaptado de DINIS-OLIVEIRA, 2016).

1.1.2 Toxicodinâmica

O sistema endocanabinóide é um sistema presente em vertebrados, composto pelos receptores canabinóides do tipo CB1 e CB2, e pelos neurotransmissores endocanabinóides, *N*-araquidonil-etanolamina (anandamida), 2-araquidonil-glicerol (2-AG), 2- araquidonil – glicerol éter ou noladina éter (2-AGE), o-araquidonoil-etanolamina (virodamina), *N*-araquidonil-dopamina (NADA) e oleamida (AO), que não apresentam semelhança estrutural com o Δ^9-THC, apesar da anandamida ter efeitos similares ao Δ^9-THC nos receptores canabinóides. Todos são agonistas de receptores canabinóides do tipo CB1 e CB2 (IVERSEN, 2003; PERTWEE, 2008; MOREAU, 2014). Na **Figura 3** são apresentados os principais endocanabinóides.

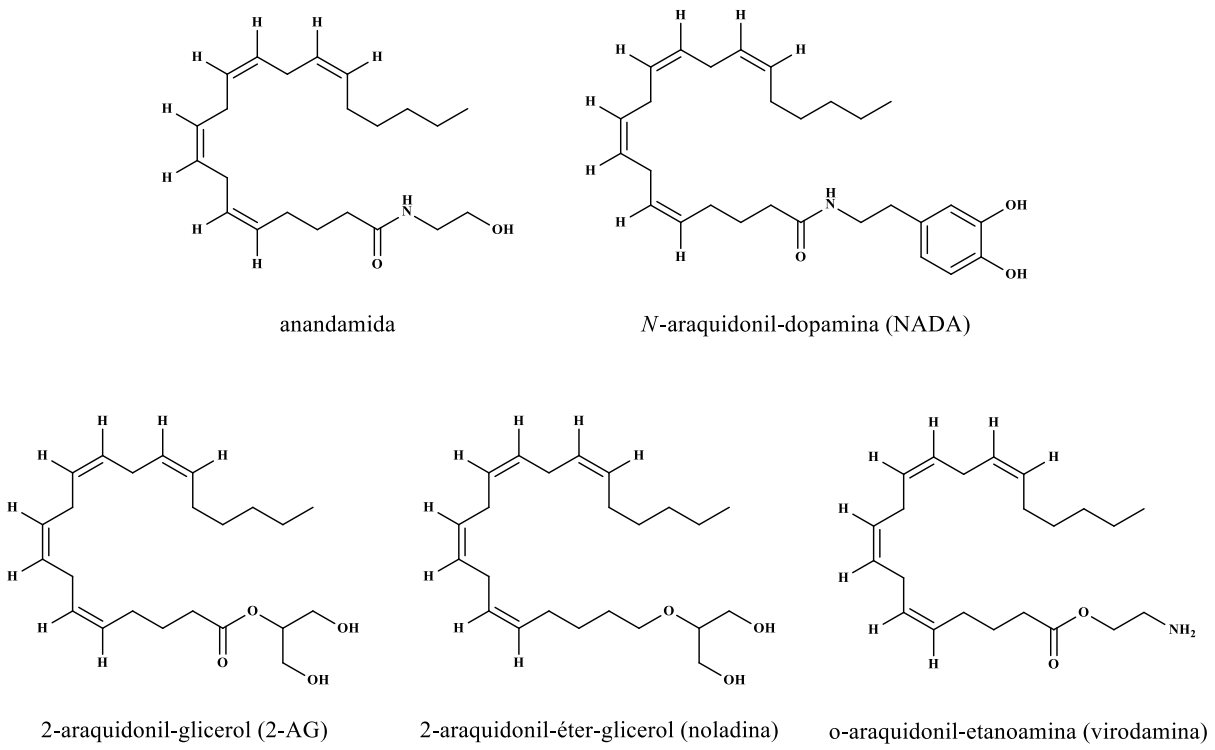


Figura 3. Estruturas químicas dos endocanabinóides.

Existem outros dois receptores putativos endocanabinóides, o potencial receptor transiente tipo vanilóide 1 (TRPV1), conhecido como receptor capsaicina ou receptor vanilóide 1 e receptor acoplado à proteína G 55 (GPR55, do inglês, *G protein-coupled receptor 55*). Os receptores TRPV1 são ativados por capsaicina e análogos, e alguns fitocanabinóides e

endocanabinóides, como a anandamida. Já os receptores GPR55, são considerados receptores canabinóides em potencial, tendo como ligante endógeno, a lisofosfatidilinositol (LPI), podendo ser ativado também pelo Δ^9-THC. A estimulação desses receptores pelo LPI parece promover efeitos opostos da proliferação de células cancerígenas (IANNOTI; DI MARZO; PETROSINO, 2016).

Os receptores do tipo CB1 são encontrados em todas as regiões cerebrais, incluindo gânglios basais (regulam o controle dos movimentos), cerebelo (relacionado com a coordenação motora), hipocampo (relacionado com a aprendizagem e memória), córtex cerebral (relacionado com funções cognitivas), e núcleo *accumbens* (relacionado com sensação de prazer); podem ser encontrados também no tronco cerebral e medula. Já os receptores CB2 são expressos nos sistemas imunes, como baço, tonsilas e timo, incluindo células da micróglia, e em órgãos como, coração, intestino, fígado, rim e músculos, porém há evidencias de limitada expressão no cérebro (AMERI; WILHELM; SIMMET, 1999; KATONA *et al*., 2001; DAVIES PERTWEE; RIEDEL, 2002; FOWLER; ROJO; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, 2010; PACHER & MECHOULAM 2011; MOREAU, 2014; MACCARRONE *et al*., 2015; SOARES *et al*., 2015).

Há evidências que os receptores CB1 funcionem como moduladores da liberação de neurotransmissores, como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato, ácido ϒ -aminobutírico (GABA), desempenhando um papel importante no sistema homeostático, e na atividade neuronal do sistema nervoso central (PERTWEE, 2008; MOREAU, 2014). Bossong *et al*. (2009) demonstraram que ocorre um aumento de níveis de dopamina na região do estriado cerebral, sugerindo que o Δ^9-THC tem potencial de causar dependência, como outras drogas de abuso, contribuindo para pesquisas sobre os efeitos neurológicos do Δ^9-THC em transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia, relacionada principalmente com o sistema dopaminérgico.

Agonistas de receptores CB1 e CB2 parecem desempenhar efeitos contrários quando são estimulados. Na revisão bibliográfica realizada por Maccarrone *et al*. (2015), os efeitos produzidos por agonistas de receptores CB1 no sistema cardiovascular estavam relacionados com efeitos pro-inflamatórios, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), angiotensina, fibrose no miocárdio, vasodilatação entre outros efeitos, enquanto agonistas de receptores CB2 parecem apresentar efeitos protetores no sistema cardiovascular. Mallat e Lotersztajn (2007) mostraram que a estimulação dos receptores CB2 atenua os efeitos inflamatórios da fibrose hepática e diminuem os processos inflamatórios na nefropatia.

1.1.3 Efeitos Tóxicos e Clínicos

Os efeitos produzidos pela exposição aguda à maconha são euforia, relaxamento, alteração da percepção sensorial, aumento do apetite, perda de memória recente, déficits cognitivos, coordenação motora diminuída, taquicardia, alterações na pressão sanguínea, hiperemia das conjuntivas, hipossalivação e boca seca. Com a exposição crônica, os efeitos no sistema respiratório estão relacionados com danos à mucosa e inflamação das vias áreas, como bronquite crônica, pneumonias. Ainda, podem aumentar o risco de um infarto em usuários com doenças coronarianas pré-existentes, e também, estão associados com psicopatologias, como esquizofrenia, com maior risco de transtornos psicóticos (HALL; SOLOWIJ, 1998; MOREAU, 2014). O uso prolongado também pode causar dependência e síndrome de abstinência, que incluem irritabilidade, dificuldades para dormir, disforia e ansiedade.

Os adolescentes apresentam maior vulnerabilidade aos efeitos causados pela exposição prolongada à *Cannabis*. O uso durante esse período está relacionado a um risco maior de dependência, e isso pode ser devido ao desenvolvimento do sistema endocanabinóide, que ainda está em processo (HALL; DEGENHARDT, 2007; MECHOULAM; PARKER, 2013).

O sistema endocanabinóide está envolvido em diversos transtornos neurológicos e doenças neurodegenerativas, como epilepsia, doença de Huntington, doença de Parkinson, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, esquizofrenia, psicoses, entre outras. Na doença de Alzheimer, está associado com diminuição de expressão de receptores CB1, enquanto receptores CB2 estão aumentados. Na doença de Parkinson, parece que o sistema endocanabinóide modula o neurotransmissor dopamina, e que a depleção dessa substância resulta em alterações no sistema endocanabinóide. Na psicose, sistemas dopaminérgicos, glutamatérgicos e gabaérgicos estão envolvidos diretamente ou indiretamente com o sistema endocanabinóide (IANNOTI; DI MARZO; PETROSINO, 2016; SHERIF *et al.*, 2016).

1.1.4 Efeitos da *Cannabis sativa* na Gestação

Os endocanabinóides e seus receptores CB1 e CB2 estão presentes desde os estágios iniciais da gestação, e participam em uma série de funções vitais do organismo, incluindo o processo de implantação embrionária, desenvolvimento neural e neuroproteção. Alterações sutis, porém, permanentes, na expressão e distribuição dos receptores, estão associadas a deficiências cognitivas (RODRÍGUEZ DE FONSECA *et al*., 2005).

A gestação é um período de mudanças fisiológicas para a mãe e o feto, principalmente filhos do sexo masculino. Estudos indicam que taxas mais altas de nascimento prematuro, diabetes gestacional, crescimento de risco, caracterizado por uma taxa mais rápida de crescimento fetal com menor investimento no crescimento placentário, aumentando assim a vulnerabilidade à subnutrição, são evidenciados em fetos masculinos. Evidências sugerem que fetos masculinos possuem respostas estressoras intrauterinas diferentes dos fetos femininos, e isso pode ser ocasionado por fatores mediados pela placenta, como a ação dos hormônios sexuais ainda dentro do útero materno, como expressões de citocina, progesterona, estrógeno e testosterona (BRETT *et al*., 2014). Os efeitos do estresse pré-natal sobre o peso ao nascer e o comportamento neuronal parecem atingir um pico no começo da gestação e diminuir progressivamente entre o meio e o fim da gestação (SCHNEIDER, *et al*., 1999).

Embora a placenta atue como uma barreira para proteger o feto de substâncias tóxicas presentes na mãe, já se sabe que a maioria das drogas de abuso utilizadas durante a gestação é capaz de cruzar a barreira placentária, e chegar ao feto (ELLIS *et al*., 1993; KUCZKOWSKI, 2007; ORTIGOSA *et al*., 2012). Durante o consumo da droga pela mãe, os níveis séricos fetais da droga alcançam praticamente os mesmos níveis séricos maternos, portanto não há níveis seguros de uso durante a gestação (JAKUBOVIC; HATTORI; MCGEER, 1973; HUTCHINGS *et al*., 1989).

Diversos estudos experimentais epidemiológicos, em humanos e animais, mostraram que a exposição a preparados de *Cannabis* durante a gestação e lactação podem provocar efeitos teratogênicos e neuro-comportamentais, respectivamente (NAVARRO; RUBIO; DE FONSECA, 1995; FRIED; SMITH 2001; FRIED, 2002; HUIZINK; MULDER 2006; TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008; CAMPOLONGO *et al*., 2009; SCHNEIDER, 2009).

Apesar dos efeitos adversos que o uso de drogas na gestação pode provocar sobre o desenvolvimento fetal, e suas consequências mais tarde na vida adulta, o número de mulheres que consomem algum tipo de droga durante a gestação aumentou significativamente nos últimos anos (CRIPPA *et al*., 2005; SAMHSA, 2010; EMCDDA, 2011; BATALLA *et al*., 2013; UNODC, 2013). De acordo com o Serviço Administrativo de Saúde Mental e Drogas de Abuso dos Estados Unidos (SAMHSA, 2010), no ano de 2010, 7,1% das mulheres grávidas com idades entre 18-25 anos usaram maconha, em algum período durante a gravidez. Um estudo conduzido por Bessa *et al*. (2010), em São Paulo (SP), mostrou altos índices do uso de drogas entre adolescentes gestantes. A prevalência de uso de maconha na gestação foi de 4%, e de uso concomitante de maconha e cocaína, 6%. Outro estudo realizado por Rocha *et al.*

(2016), em São Luiz (MA), realizado com 1447 gestantes, indicou que o uso de substâncias psicoativas ilícitas na gestação foi de 1,45%. Em um estudo realizado no município de Maringá (PR), com 394 gestantes assistidas em unidades básicas de saúde, foi realizada uma entrevista sobre o uso de drogas de abuso durante a gestação, e foi registrada uma prevalência de 0,51% para o uso de maconha (KASSADA *et al*., 2013). Silva (2004), em estudo realizado em hospital universitário em Porto Alegre (RS), coletou informações de 135 puérperas, e foi constatado que 37,4% dessas mulheres usaram substâncias psicoativas durante a gestação, sendo registrado 2,8% de uso de *Cannabis*.

Estudos demonstram efeitos ocasionados pelo uso da *Cannabis* durante a gestação, como na emotividade, provocando sintomas de ansiedade e depressão em crianças, após exposição entre o 1º e 3º trimestre da gestação. Efeitos sobre a atividade locomotora também foram relatados, onde crianças expostas pré-natalmente à *Cannabis* apresentaram-se hiperativas e impulsivas. São também relatados efeitos na função cognitiva, relacionando alterações na atenção e memória dos filhos, tanto na infância quanto na adolescência, após exposição gestacional à *Cannabis* (DAY *et al*., 1994; FRIED; WATKINSON; GRAY, 1998; FRIED; SMITH, 2001; FRIED, 2002; GOLDSCHMIDT *et al*., 2004; GRAY *et al*., 2005). Estudo realizado em camundongos por Benevenuto *et al*. (2017) mostraram que a exposição à *Cannabis* de forma inalada durante a gestação, desencadeou alterações na prole, como baixo peso do feto ao nascer, baixo peso placentário, principalmente em camundongos machos, sugerindo que a exposição gestacional à maconha pode ser embriotóxica e fetotóxica, comprometendo o desenvolvimento fetal.

Desta forma o uso da *Cannabis*, e a consequente exposição fetal aos canabinóides, pode ter um papel determinante na alteração do desenvolvimento cerebral e outros órgãos, durante o período de vida intrauterino, podendo levar a alterações morfológicas no feto. O desenvolvimento anormal do cérebro e outros órgãos durante a vida fetal contribui para a etiologia de uma série de desordens neurológicas e fisiológicas, que irão se manifestar mais cedo ou mais tarde ao longo da vida, entretanto os resultados ainda são esparsos e fragmentados.

1.2 *Metabolômica*

1.2.1 Definições

O termo "*metaboloma"* refere-se a um conjunto de compostos orgânicos de baixa massa molecular (metabólitos) encontrados num dado sistema biológico. Estruturas polimerizadas de alta massa molecular, como proteínas e ácidos nucleicos, não se enquadram nesta definição (ROUX *et al*., 2011). O conceito de "*metabólito"* inclui todas as substâncias orgânicas, que ocorrem naturalmente a partir do metabolismo de um organismo vivo, e que não são produzidas diretamente a partir da expressão gênica, como DNA e RNA, mas sim como resultado da interação do sistema genótipo com o ambiente, ou para manutenção da integridade do sistema regulatório. Por esta definição, os termos metabólito e metaboloma podem ser aplicados a um microrganismo, ao ser humano ou a uma planta, etc. (ROCHFORT, 2005; ROUX *et al*., 2011). O estudo comparativo dos perfis metabólicos em uma célula, tecido, sistema ou organismo, sob um determinado conjunto de condições, é descrito como "*metabolômica não dirigida"* (do inglês, *untargeted metabolomics*) (ROCHFORT, 2005). Quando o estudo foca em metabólitos pré-definidos, ou conjuntos restritos de metabólitos pertencentes a uma classe química específica, ou relacionados por vias metabólicas, dá-se o nome de "*metabolômica dirigida"* (do inglês, *targeted metabolomics*).

Os estudos de metabolômica ganham importância a cada dia, por ajudarem a explicar processos biológicos em situações normais (fisiológicas) ou patológicas (WILLIAMS *et al*., 2013). Oferecem uma nova visão sobre o impacto funcional da expressão gênica, complementando os estudos de sequenciamento gênico, que negligenciam o impacto da exposição ao meio ambiente na etiologia de doenças ou intoxicações. O objetivo geral da maioria destes estudos é gerar um perfil instantâneo do estado metabólico de uma amostra biológica, e caracterizar as mudanças nas abundâncias dos metabólitos medidos, decorrentes de flutuações naturais, ou perturbações bióticas ou abióticos externas (SCHUHMACHER *et al*., 2013). O maior conhecimento sobre a relação entre genes, proteínas e moléculas endógenas pequenas (metabólitos) contribui para o avanço no diagnóstico, tratamento ou mesmo prevenção de doenças ou intoxicações (WILLIAMS *et al*., 2013).

A origem da metabolômica pode ter sido desenvolvida com a hipótese da "individualidade bioquímica", que associou os padrões metabólicos presentes em biofluidos, e

os traços fenotípicos, com a susceptibilidade às doenças e saúde humana (THOMPSON; MARKEY; FENNESSEY, 1975; KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

Fiehn (2001) foi quem primeiro usou o termo metabolômica, e o definiu como "*a detecção e quantificação de pequenas moléculas, que são transformadas por reações (bio) químicas nas células, com o objetivo de observar mudanças relativas da abundância dos metabólitos"*. Villas Bôas *et al*. (2005) definiram esse termo não como uma abordagem, e sim como uma nova área da ciência, responsável por caracterizar o metaboloma em condições definidas (diferentes condições ambientais, de desenvolvimento, de alterações genotípicas, etc.), e associar o metaboloma ao genótipo.

A metobolômica tem sido rotulada como a nova "ômica", juntamente com a genômica (relacionada ao DNA), transcriptômica (relacionada ao mRNA), e a proteômica (relacionada às proteínas) (ROUX *et al.*, 2011). A metodologia "omica" é responsável por caracterizar um numeroso perfil de analitos, conhecidos ou desconhecidos, e reflete uma condição biológica. A compreensão da natureza desses dados permite a avaliação de uma resposta sistêmica (GARCIA; BARBAS, 2011).

As áreas de aplicação em metabolômica são vastas, incluindo estudos na área ambiental, clínica, esporte, nutrição, microbiologia, plantas, toxicologia forense, na parasitologia, com o estudo em candidatos a fármacos (metididrodieugenol B) para doenças negligenciadas, como a Leishmania infantum (CANUTO *et al*., 2017).

No estudo da metabolômica, diferentes abordagens podem ser utilizadas, dependendo dos objetivos da pesquisa e do autor. A terminologia é ainda controversa, e por vezes, redundante. As possíveis abordagens são descritas a seguir:

- Metabonômica: "Análise quantitativa da medida da resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou à modificação genética" (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; DUNN; ELLIS, 2005).
- Análise alvo ou dirigida (do inglês, *targeted analysis*): análise quantitativa ou qualitativa de um determinado substrato, produto de uma reação metabólica específica, ou um grupo de metabólitos pré-estabelecidos (FIEHN, 2001; DUNN; ELLIS, 2005).
- Análise não dirigida ou global (do inglês, *untargeted analysis*): identificação de todos os metabólitos que compõem o sistema estudado, são estudos não direcionados que abrangem os conceitos de fingerprinting, footprinting e perfil metabólico global.

- Fingerprinting metabólico: análise global de amostras, classificação rápida do metaboloma intracelular (FIEHN, 2001; DUNN; ELLIS, 2005).
- Footprinting metabólico: análise de classificação rápida do metaboloma extracelular (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).
- Perfil metabólico (do inglês, *metabolic profiling*): identificação e análise quantitativa de um grupo pré-estabelecido de metabólitos. Abordagem utilizada para estudos de alteração de uma via metabólica, a preparação da amostra e instrumentação são empregadas para isolar os compostos de interesse. (FIEHN, 2001; DUNN; ELLIS, 2005). Alguns autores consideram esse tipo de análise como metabolômica dirigida ou *targeted analysis*.

No presente estudo serão utilizados os conceitos de análise *dirigida* ou *não dirigida.*

1.2.2 Fluxo de Trabalho

A metabolômica vem sendo muito empregada em diversas áreas, desta forma uma série de etapas são necessárias, como, definição do problema biológico, desenho experimental, preparo de amostra, técnicas de análise, processamento e análise dos dados, identificação dos metabólitos e associação destes a rotas metabólicas, demonstrado pelo fluxograma de trabalho representado na **Figura 4.**

O fluxograma de trabalho fornece uma descrição objetiva das etapas que são realizadas em estudos metabolômicos. A etapa da definição do problema biológico é muito importante, pois, define o tipo de abordagem metabolômica que será empregada (dirigida ou não dirigida), quais plataformas analíticas serão utilizadas. No desenho experimental são definidas quais amostras serão utilizadas, como será executada a coleta destas amostras, o *quenching* metabólico, que seria a interrupção imediata da atividade enzimática, além de cuidados necessários no armazenamento destas. O preparo de amostras envolve procedimentos para extração dos metabólitos de interesse a partir da matriz estudada, como tecidos, fluídos biológicos, células, e cada uma delas tem suas peculiaridades nessa etapa. A otimização da extração, geralmente está atrelada com as técnicas de análise que serão empregadas, e discutidas mais detalhadamente nos próximos tópicos. O processamento de dados, outra etapa muito importante, onde os dados brutos adquiridos através da plataforma analítica empregada, passarão por etapas, como alinhamento dos dados, deconvolução espectral, normalização, etc., para a geração de dados que serão analisados estatisticamente através de análise multivariada.

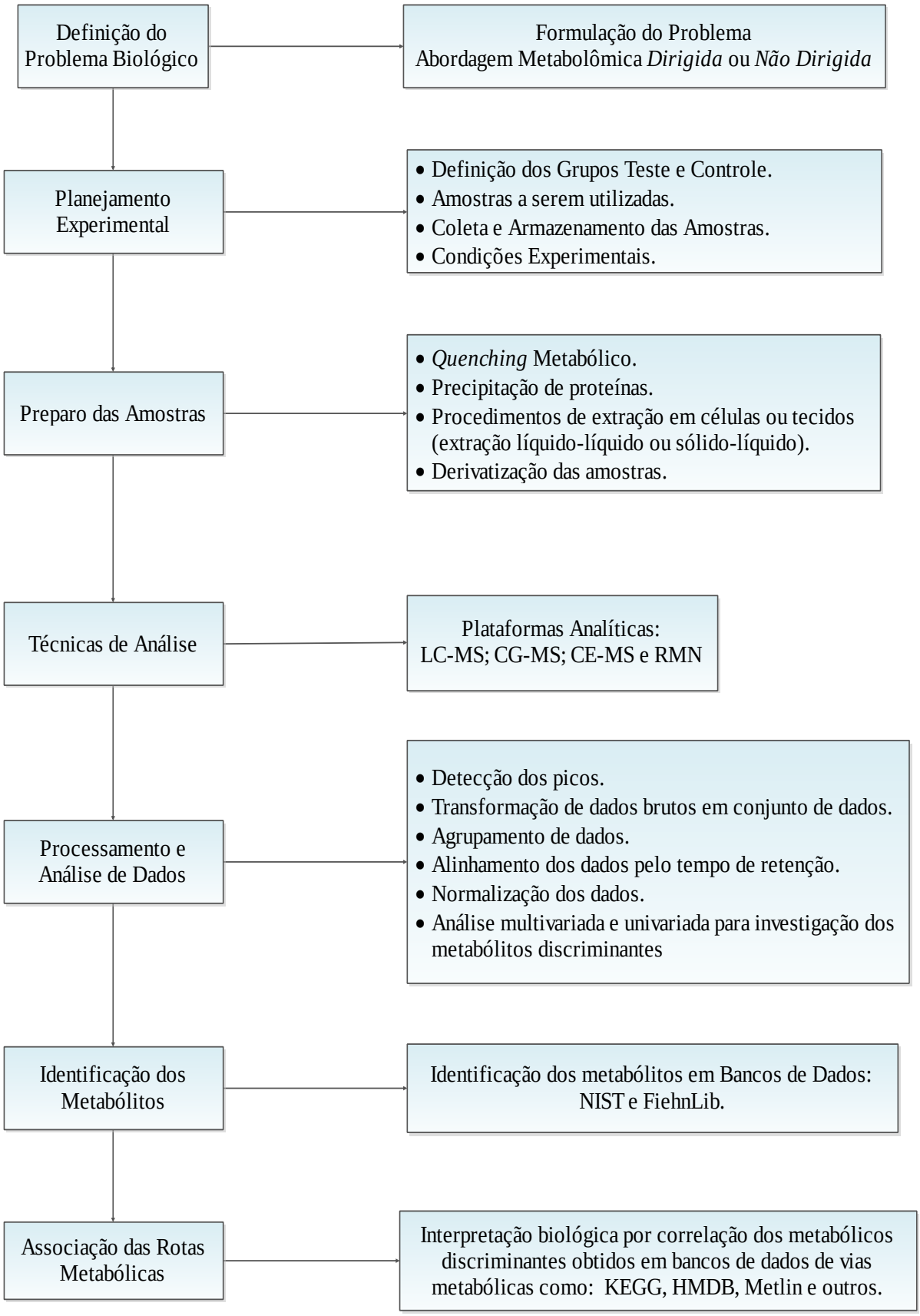


Figura 4. Representação do fluxo de trabalho para análise metabolômica (Adaptado de KLASSEN *et al*., 2017).

1.2.3 Técnicas de Análise

A primeira técnica para investigação metabolômica foi realizada por Williams e colaboradores (1949), que utilizaram cromatografia em papel para analisar perfis metabólicos individuais em fluidos biológicos humanos e modelos animais. Atualmente, é reconhecida a enorme diversidade estrutural dos metabólitos, que podem ser lipídeos, aminoácidos, ácidos graxos, aminas, álcoois, carboidratos e derivados, fosfatos orgânicos, ácidos hidroxilados, aromáticos, purinas ou esteróis (KIND *et al.*, 2009), entre outros. Por esta razão, os estudos de metabolômica requerem o uso de técnicas analíticas para detectar, identificar e quantificar a maior gama possível de metabólitos. A diversidade estrutural dos metabólitos é imensa, assim como os níveis de concentração encontrados podem variar grandemente, e dessa maneira, algumas técnicas têm prevalecido para a análise metabolômica, como, a ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) e a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), sendo por injeção direta, ionização ou dessorção como, a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS, do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) ou imageamento MALDI (MALDI-MSI, do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging*), ou também hifenada a técnicas de separação como a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis)* (THOMPSON; MARKEY; FENNESSEY, 1975; NICHOLSON; BUCKINGHAM; SADLER, 1983; VILLAS-BOAS *et al*., 2005; BARBAS *et al*., 2008; GARCIA-PEREZ *et al*., 2008; KIND *et al*., 2009; SUGIMOTO *et al*., 2010; WEI; SEYMOUR, 2010; BARBAS; MORAES; VILLASEÑOR, 2011; MORAES *et al*., 2011; ROUX *et al*., 2011; GUO *et al*. 2012; ZHANG *et al*., 2012; ROJO; BARBAS; RUPEREZ, 2012; SARIC *et al*., 2012; WANG *et al*., 2012; WHILEY *et al*., 2012; YUAN *et al*., 2012; WANG *et al*., 2013).

1.2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear (NRM, do inglês *nuclear magnetic resonance*) é uma técnica espectroscópica muito utilizada para identificação estrutural de compostos orgânicos. A identificação dos compostos é realizada pela aplicação de fortes campos magnéticos e pulsos de radiofrequência nos núcleos dos átomos, essa absorção permitirá então que os núcleos sejam

promovidos de estados de spin de baixa energia para alta energia, e a emissão subsequente de radiação durante o processo de relaxamento é detectada (DUNN; ELLIS, 2005).

NMR possui robustez, repetibilidade e exige pouca quantidade de amostra e mínimo preparo de amostra quando comparado à MS, além da possibilidade de identificar e quantificar centenas de compostos de maneira não destrutiva, podendo a amostra ser analisada por outras técnicas posteriormente. Em comparação com as técnicas cromatográficas, a ressonância magnética nuclear tem baixa sensibilidade, seletividade, e diante da complexidade de amostras biológicas, pode ocorrer a sobreposição de sinais em algumas regiões do espectro dificultando a identificação das substâncias (PUTRI *et al*., 2013; XU *et al*., 2014).

Na metabolômica, NMR tem sido bastante utilizada por fornecer informações detalhadas sobre transformações estruturais de um composto metabolizado após exposição a fármacos, ou para monitorar a progressão de doenças, sendo importante também para compreensão de processos biológicos, utilizada com matrizes biológicas, como o plasma, bile ou urina (DUNN; ELLIS, 2005; LENZ; WILSON, 2007; BEDAIR; SUMNER, 2008).

1.2.3.2 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação baseada na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária (líquida ou sólida). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas. Tais estudos datam desde a década de 70 (THOMPSON; MARKEY; FENNESSEY, 1975). Em função do alto poder de resolução cromatográfica, que permite separar e quantificar centenas de substâncias voláteis, considerável sensibilidade (que pode chegar a 10^{-12} g) e alta repetibilidade, promove amplo uso do GC-MS em metabolômica (JONSSON *et al*., 2004; BABUSHOK *et al*., 2007; FIEHN, 2008; KOEK *et al*., 2011; HILL; ROESSNER, 2013).

A ionização por elétrons (EI, do inglês, *electron ionization*), umas das fontes de ionização mais utilizada, oferece padrões de fragmentação que podem ser comparados com plataformas como NIST/EPA/NIH, Fiehnlib (KIND *et al*., 2009) e Golm (KOPKA *et al*, 2005) para comparação de espectros e identificação de substâncias.

Em GC-MS, pode-se obter cromatogramas, no modo *Full Scan* ou varredura e modo monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês, *selected ion monitoring*). No primeiro modo, os íons são analisados dentro de uma faixa de razão massa carga (*m/z*) e no segundo

modo, são selecionados os íons de interesse, dessa forma os cromatogramas apresentam um menor ruído, o que aumenta a razão sinal/ruído, melhorando a sensibilidade das análises.

Uma das vantagens do CG-MS é a detecção de espécies baseadas no tempo de retenção e no rico espectro de massas, gerado por padrões de fragmentação específicos dos compostos, quando ionizados por uma voltagem fixa de elétrons, geralmente 70 eV. Devido ao alto poder de resolução, é possível separar e quantificar centenas de compostos voláteis com a ajuda de software para deconvolução de espectros (CLARKE; SEO; CLARKE, 2010; BEHRENDS; TREDWELL; BUNDY, 2011), além de ferramentas estatísticas, o que tem auxiliado a metabolômica na identificação de novos compostos (JONSSON *et al.*, 2004).

Porém, uma das limitações quanto à utilização de GC-MS na metabolômica, é a presença de compostos não voláteis, e de caráter iônico, em fluidos e tecidos biológicos, dessa forma, tais compostos precisam sofrer tratamentos, como a derivatização, que onera o método em termos de tempo de análise, e limita o estudo a um número pequeno de amostras.

1.2.3.3 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

A cromatografia líquida é uma técnica de separação de componentes de uma mistura, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel, tendo como fase móvel um solvente líquido. A LC é capaz de separar uma série de compostos com polaridades variáveis. O acoplamento com o espectrômetro de massas torna os métodos de LC-MS mais sensíveis e com melhor especificidade. As colunas usadas com mais frequência contêm sílica modificada por hidrocarbonetos, como C18, constituindo o modo de fase reversa (RPLC, do inglês, *reverse phase liquid chromatography*). Neste caso, a fase estacionária é apolar, e a fase móvel, um solvente ou misturas de solventes polares, como água, metanol, acetonitrila ou um tampão, utilizada para separação de compostos mais apolares. Outro modo de cromatografia é por interação hidrofílica (HILIC, do inglês, *hydrophilic interaction chromatography*), utilizada para separação de metabólitos mais polares, com a vantagem da utilização de colunas com fase estacionária polar e a fase móvel polar, utilizando solventes que são mais compatíveis com o espectrômetro de massas, como a acetonitrila (NGUYEN; SCHUG, 2008; AIHUA *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida quando aplicada à metabolômica exige um preparo mínimo de amostra, como precipitação de proteínas, quando se utiliza urina ou sangue, além de outras vantagens, como análise de compostos termo lábeis, permitindo a quantificação na ordem de

pg/mL, com alta resolução e robustez (VILLAS - BOAS *et al*., 2005 LENZ; WILSON, 2007). Porém, entre as desvantagens do acoplamento da técnica com MS, ocorre o fenômeno conhecido como "supressão iônica", especialmente para compostos que co-eluem; além disso, grandes volumes de solventes são gastos, e longos tempos de análise são em geral necessários, assim com períodos prolongados de condicionamento da coluna (KUEHNBAUM; BRITZ-McKIBBIN, 2013).

1.2.3.4 Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria de Massas

A eletroforese capilar é uma técnica de alta resolução e eficiência, baseada na migração de íons, ou compostos ionizáveis, em solução, sob um campo elétrico. A separação baseia-se nas diferenças de migração eletroforética dos solutos, acoplada a um fluxo eletrosmótico. Essa técnica necessita de um volume pequeno de amostra para injeção (10 nL), sendo extremamente vantajoso em estudos com amostras biológicas, ou avaliação de uma única célula (MISHUR; REA, 2012). Aplicações bioanalíticas de CE requerem detectores com alta sensibilidade, como fluorescência induzida por laser (LIF, do inglês, *laser-induced fluorescence*), ou MS. O modo mais usado na metabolômica é a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês, *capillary zone electrophoresis*), que utiliza eletrólitos de composição simples, em geral tamponados, com alguns aditivos em pequena proporção (solventes orgânicos, por exemplo) (BEDAIR; SUMNER, 2008). Muitos estudos em metabolômica dirigida tem utilizado CZE -ESI-MS/MS (Ionização por Electrospray, do inglês, Electrospray *Ionization*) (MAYBORODA *et al*., 2007; WILLIAMS *et al*., 2007; LEE; BRITZ-McKIBBIN, 2009; LINDENBURG *et al*., 2012; DAI *et al*., 2018). A técnica em seus vários modos também permite a análise de compostos não polares/neutros, assim como, compostos polares/iônicos, com uso de pequena quantidade de amostra (VILLAS - BOAS *et al*., 2005 KUEHNBAUM; BRITZ-McKIBBIN, 2013).

Entre as desvantagens da CE-MS estão menor repetibilidade, menos sensibilidade e identificação de compostos depende de padrões e de MS/MS, podendo ser empregada como técnica complementar para estudo em metabolômica (THEODORIS *et al*., 2012; KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

1.2.4 Preparo de Amostra

Na metabolômica, a etapa de preparação da amostra é uma das etapas mais importantes, devido a ocorrência de grande parte dos erros operacionais. Dependendo da matriz que se pretende analisar, há diversas maneiras de preparo. No caso de matriz biológica, como sangue, saliva, urina, órgãos, o cuidado com a amostra inicia na interrupção do metabolismo celular, já que a análise metabolômica reflete o perfil instantâneo, no momento da coleta da amostra. Os níveis de metabólitos variam rapidamente com alterações ambientais, no entanto, uma mudança drástica de temperatura, ou pH pode inibir o processo enzimático. Esse método também é conhecido como *quenching*. Existem várias maneiras de inativação enzimática, como precipitação das enzimas com ácido/base ou misturas de solventes orgânicos gelados, como metanol, etanol ou acetonitrila, ou ainda, irradiação por micro-ondas (GRAAF *et al.*, 2009; GONZALEZ-RIANO; GARCIA; BARBAS, 2016). Para amostras biológicas, com o intuito de inibir o metabolismo enzimático, o mais indicado é o uso de nitrogênio líquido (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

A parte da extração dos metabólitos de interesse é uma fase crítica, devido principalmente às características químicas diferentes dos metabólitos. A extração é feita com solventes orgânicos, ou misturas, contendo ou não água (FIEHN, 2001 BEDAIR; SUMMER, 2008; ALLWOOD *et al*., 2009; FIEHN; BARUPAL; KIND, 2011). Combinações de solventes como metanol, água, clorofórmio, acetonitrila, etanol, ácido fórmico são utilizados por diversos autores para avaliar a melhor condição de extração dos metabólitos de interesse (GONZALEZ-DOMINGUEZ *et al*., 2014; WEN *et al*., 2016).

Os requisitos para análise de compostos utilizando GC-MS são a volatilidade e estabilidade térmica. Os principais compostos analisados em metabolômica são, lipídeos, aminoácidos, ácidos graxos, aminas, álcoois, carboidratos e derivados (KIND *et al*., 2009). Substâncias como ácidos orgânicos, aminoácidos, mono e di-sacarídeos e esteróis não são substâncias voláteis (GARCIA; BARBAS, 2011), dessa forma, faz-se necessário um preparo da amostra, como a derivatização, que aumenta volatilidade, diminui polaridade e melhora a estabilidade dos compostos.

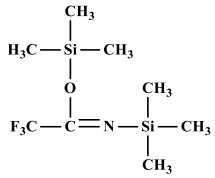
Moléculas contendo grupos funcionais -COOH, -OH, - NH, -SH formam ligações de hidrogênio intermoleculares, levando a uma baixa volatilidade e insuficiente estabilidade térmica, resultando em cromatrogramas de difícil interpretação e baixa detectabilidade dos compostos. Quando as moléculas possuem alta massa molecular ou grupamentos muito polares,

há a necessidade de derivatização. Essa técnica envolve uma reação química que gera produto com melhores propriedades cromatográficas (SCHUMMER *et al*., 2009).

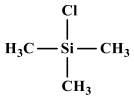
Os tipos de derivatização mais empregados em cromatografia gasosa utilizam cloroformiato, reações de fluoroesterificação, ou sililação. A reação de sililação é simples e rápida, ocorrendo em uma única etapa. Devem ser feitas com controle de temperatura e tempo, pois a diminuição da temperatura, ou tempo de reação pode reduzir significativamente a concentração dos compostos gerados (HALKET; ZAIKIN, 2003; SCHUMMER *et al*., 2009). Porém, a sililação não é suficiente para derivatizar todos os metabólitos presentes, portanto, duas etapas são necessárias, como a metoximação e sililação.

A metoximação faz a proteção dos grupos funcionais cetona, utilizando o-metoxiamina em piridina para estabilizar os radicais carbonílicos de cetonas e álcoois, evitando ciclização. Este procedimento também ajuda a reduzir o número de derivados de açúcares redutores. A piridina funciona como catalisador, facilitando a ligação da o-metoxiamina e promovendo a reação de metoximação (ZHOU; WANG; JIA, 2007).

Para a sililação, geralmente, utiliza-se *N*,*o*-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS). O TMCS funciona como um agente desprotonante, facilitando a sililação promovida pelo BSTFA. A estrutura química dos agentes derivatizantes BSTFA e TMCS pode ser observada na **Figura 5**.



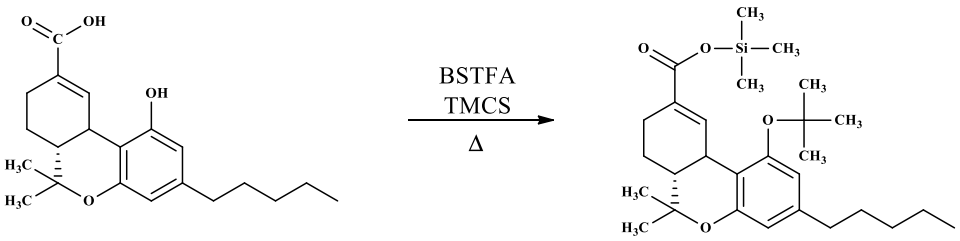
N-*o*-bis-(trimetilsilil)-trifluoracetamida (BSTFA)



Trimetilclorosilano (TMCS)

Figura 5. Estruturas químicas dos agentes derivatizantes N-o-bis-(trimetilsilil)-trifluoracetamida com Trimetilclorosilano.

Na reação de sililação, átomos de hidrogênio ativos são substituídos por grupos alquilsilil (por exemplo, -$SiMe_3$). Na reação de derivatização do THC-COOH (**Figura 6**), somente a etapa de sililação utilizando BSTFA e TMCS é realizada, pois a estrutura química não apresenta grupamento cetona, o que torna a etapa de metoximação necessária (GUIDA; SALVATORE; SALVATORE, 2015). A **Figura 7** apresenta esquemas da reação de oximação seguida por sililação de um esteroide, que possui grupos carbonila e álcool (FANG *et al*., 2010).



THC-COOH THC-COOH (sililado)

Figura 6. Reação de sililação do THC-COOH utilizando BSTFA e TMCS.

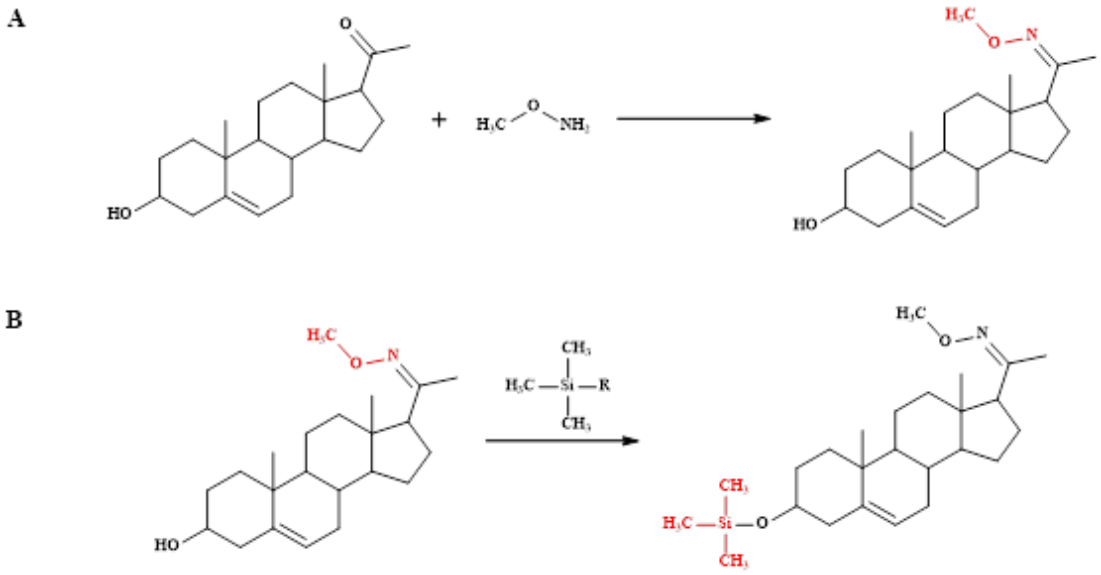


Figura 7. Reação de oximação (A) seguida de sililação (B) de um composto esteroide.

A etapa de secagem da amostra também torna-se muito importante, sendo realizada principalmente por liofilização, ou evaporação a vácuo, pois se a amostra, na etapa de derivatização, estiver em contato com a umidade, o composto formado pode sofrer degradação, ou a reação pode ser incompleta, e parte dos metabólitos pode ser perdido (FIEHN *et al*., 2001; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006; BEDAIR; SUMMER, 2008; ALLWOOD *et al*., 2009 FIEHN; BARUPAL; KIND, 2011).

1.2.5 Processamento e Análise dos Dados

A etapa de tratamento de dados exige ferramentas adequadas para a análise dos dados obtidos. Na metabolômica, existem diversos softwares que auxiliam na etapa de processamento de dados, como XCMS, AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), Sieve (Thermofisher), Mzmine, MetAlign, Mass Profiler Professional (Agilent Technologies), Profiling Solution (Shimadzu Co), entre outros (HONGMEI *et al*., 2008; CHAN; PASIKANTI; NICHOLSON, 2011; SUGIMOTO *et al*., 2012).

O processamento de dados consiste nas seguintes etapas: 1) transformação de dados brutos em um conjunto de dados, 2) agrupamento dos dados, 3) alinhamento dos dados pelo tempo de retenção, e 4) normalização dos dados.

O XCMS é um software de acesso livre executado na plataforma R. Podem ser utilizados parâmetros para melhorar a qualidade da matriz gerada, como, largura de pico (fwhm), relação sinal/ruído (snthresh), número máximo de picos por cromatograma de íon extraído (max), agrupamento com correção de largura de banda (bw), largura de faixas sobrepostas de *m/z* (mzwid) e fração mínima de amostras necessárias em pelo menos um grupo, para o grupo ser considerado válido (minfrac). A normalização das amostras se faz necessária para minimizar as diferenças resultantes da variação entre amostras, realizado no ambiente R, pela mediana das intensidades dos picos encontrados.

Após a obtenção dos dados normalizados, estes são analisados com técnicas quimiométricas multivariadas, como o PCA (*principal components analysis*), um modelo não supervisionado que pode ser aplicado preliminarmente para avaliar o agrupamento da amostra. O PLS-DA (*principal least squares-discriminant analysis*) modelo supervisionado, empregado para discriminar quais possíveis variáveis são responsáveis pela variação, e demonstrar a diferença entre os grupos de amostras. E ainda, o modelo OPLS-DA (*orthogonal projection to latent structure-discriminant analysis*), para identificação dos metabólitos discriminadores candidatos (RUBINGH *et al*., 2006; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDTJ, 2007; WIKLUND *et al*., 2008; WIKLUNDS *et al*., 2008; GONZALEZ-RIANO; GARCIA; BARBAS, 2016).

Os dados de GC-MS também são analisados e processados usando o software AMDIS em conjunto com a biblioteca NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*) ou Fiehn Lib, para identificação dos compostos presentes na amostra.

Íons (*m/z*) considerados estatisticamente significativos são identificados por comparação com bancos de dados espectrais disponíveis (p.ex. NIST, KEGG, FiehnLib,

HMDB e METLIN), que auxiliam na identificação dos metabólitos desconhecidos, e associam os compostos a rotas metabólicas pertinentes.

1.2.6 Estudos de Metabolômica em Toxicologia

A toxicologia é a ciência secular que estuda os efeitos adversos causados por substâncias químicas em organismos vivos. A intoxicação é um fenômeno complexo de alteração da homeostasia de um organismo, induzida por um agente tóxico, e seu grau depende de fatores como a toxicidade da substância química, quantidade, via (oral, dérmica, pulmonar), frequência e duração da exposição, além de características individuais do organismo exposto (espécie, idade, sexo, estado nutricional e de saúde). Ainda que um xenobiótico exerça sua ação tóxica em um órgão ou tecido específico (que geralmente é o foco principal dos estudos toxicológicos), deve-se considerar ainda sua ação secundária no indivíduo intoxicado.

A abordagem metabolômica na toxicologia tem o potencial de revelar alterações bioquímicas na administração de substâncias tóxicas, que podem levar a percepções mecanicistas, e identificação de biomarcadores de exposição ou efeito (CLARKE; HASELDEN, 2008; ROBERTSON; WATKINS; REILY, 2011).

O termo biomarcador é definido como uma característica, que é objetivamente mensurada e avaliada como um indicador do processo biológico normal, patogênico ou resposta farmacológica a alguma intervenção terapêutica (STRIMBU; TAVEL, 2010). Os biomarcadores são parâmetros internos mensuráveis de alterações moleculares ou celulares, que podem aparecer em um organismo durante, ou após a exposição a um agente tóxico (ou doença). São compostos, ou um conjunto de compostos, que preferencialmente, devem ser mensuráveis de forma fácil, quantitativa, específica e sensível. A descoberta de biomarcador é importante para predizer os efeitos tóxicos antes da manifestação clínica da intoxicação e sua gravidade, para avaliar o desenvolvimento da patologia ou lesão em órgãos, gravidade, ou ainda, monitorar pacientes que foram expostos a uma determinada substância tóxica (ROUX *et al*., 2011; MONTEIRO *et al*., 2013). Seu uso potencial advém da possibilidade de fornecer a identificação dos eventos iniciais dentro da história natural da doença, possibilitando uma via de identificação da sua patogênese. Além disso, leva em conta variáveis e o efeito de modificação do risco preditivo, sendo que, por essa capacidade, os biomarcadores são utilizados para o estudo das doenças humanas, de maneira a fornecer o entendimento das causas, maneiras

de diagnósticos, progressão/regressão, e o resultado do tratamento da doença (MAYEUX, 2004).

A aplicação dos biomarcadores em diagnósticos e conduta em doenças cardiovasculares, infecções, desordens imunológicas, genéticas e cancerígenas, é bastante conhecida, como, por exemplo a galactosamina, sendo um modelo de hepatotoxicidade (KEPPLER *et al*., 1969; COEN *et al*., 2009). Outros exemplos estão compilados na **Tabela 1.**

Tabela 1. Biomarcadores relacionados com doenças, toxicidade e alterações fisiológicas.

Biomarcadores	Doença/Toxicidade/Alteração Fisiológica	Espécie	Referência
Perfil de ácidos biliares	Mecanismo de toxicidade hepática	Rato	Yang *et al*. (2008)
1 e 3 metilhistidina	Miotoxicidade	Rato	Aranibar *et al*. (2011)
Ácido oftálmico	Estresse oxidativo Depleção de GSH*	Camundongo	Soga *et al*. (2006)
Ácido 3-indol-lático	Doença hepática alcoólica	Camundongo	Manna *et al*. (2010)
Perfil de ácidos graxos	Diabetes Tipo II	Humano	Yi *et al*. (2006)
BCAA**	Resistência à insulina	Humano	Newgard *et al*. (2009)
Sarcosina	Câncer de próstata	Humano	Sreekumar *et al*. (2009)
BCAA/relação com histidina	Osteoartrite de joelho	Humano	Zhai *et al*. (2010)

Nota: *GSH: glutationa reduzida; **BCAA: aminoácido de cadeia ramificada (do inglês, *Branched Chain Amino Acids*).

Os biomarcadores são divididos em biomarcador de exposição e biomarcador de efeito. O primeiro é utilizado na predição do risco, e os biomarcadores de efeito são usados para uma triagem e monitoramento da progressão da doença, causada pela exposição ao agente tóxico (STRIMBU; TAVEL, 2010).

Estudos de metabolômica de *Cannabis sativa* são escassos, no entanto foram encontrados alguns trabalhos sobre o assunto, como Zaitsu *et al*. (2015) que realizaram uma análise metabolômica não dirigida em amostras de cérebro de ratos, após uma única administração intraperitoneal de 5 mg/Kg ou 15 mg/kg do canabinóide sintético MAM-2201, comparado com o grupo controle, exposto à DMSO. Foram identificados 72 metabólitos, desses, 11 foram significativamente alterados, entre eles, creatinina, frutose, ácido glucônico, ácido glutâmico, ácido málico, fenilalanina, sorbitol, sorbose, ácido succínico, tagatose e valina. O estudo concluiu que a administração do canabinóide sintético induz efeitos tóxicos

agudos no cérebro, induzindo desordens no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), e diminui os níveis de ácido glutâmico, resultando em disfunções do metabolismo energético e glutamatérgico cerebral.

Outro estudo envolvendo metabolômica e maconha está relacionado com a composição química dos extratos medicinais da *Cannabis*, comparando extratos extraídos com álcool etílico ou com óleo de oliva. A pesquisa foi realizada com extratos de Bediol ® (Bedrocan BV, Veendam) que consiste em *Cannabis sativa* granulada com concentrações de 7% de Δ^9-THC e 8-9% de CBD, outros canabinóides e terpenos. Os resultados obtidos indicaram que o álcool etílico extraiu mais compostos que o óleo de oliva (CITTI *et al*., 2018).

Pesquisas realizadas com outras substâncias psicoativas relacionadas com metabolômica são mais frequentes, como por exemplo estudos envolvendo cocaína, opioides, metanfetamina e ketamina. Zhang *et al.* (2016) analisaram em várias regiões cerebrais de ratos, a alteração metabólica diante da síndrome de abstinência à cocaína, de 1 dia comparado com 3 semanas. O estudo demonstrou desregulação dos metabólitos creatina, creatinina e glutationa, induzindo alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo. Outro estudo desenvolvido por Wen *et al.* (2016) analisou as alterações metabólicas em ratos, após 14 dias de exposição à ketamina. Os resultados demonstraram níveis de colesterol, uridina e glicerol diminuídos e níveis de uréia aumentados, indicando alterações nas vias da glicólise, síntese dos fosfolipídios, e metabolismo do nitrogênio.

Um estudo envolvendo nicotina e metabolômica foi realizado por Li *et al*. (2014), utilizando amostras de cérebro de rato após injeção subcutânea de nicotina (0.5 mg/kg), administrada por 3 dias. Foram identificados e significativamente alterados os metabólitos: glutamato, acetilcolina, triptamina, glucose, lactato, creatina, 3-hidroxibutirato, nicotinamida-adenina dinucleotídeo, glutationa, taurina e fosfocolina. Os resultados indicaram que houve alterações nos neurotransmissores, aminoácidos e no metabolismo energético, além de estresse oxidativo e desregulação mitocondrial.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Mesmo sendo uma importante área de pesquisa atual, as referências bibliográficas encontradas, relacionando diretamente estudos de metabolômica e intoxicações, ainda são escassas (HEIJNE *et al*., 2005; WANG *et al*., 2009; ROUX *et al*., 2011; SHINTU *et al*., 2012); se considerarmos trabalhos de exposição crônica à fumaça da *Cannabis sativa* sob uma perspectiva metabolômica, as referências na literatura são ainda mais escassas ou inexistentes.

Existem evidências conclusivas de alguns aspectos da exposição placentária por *Cannabis sativa* no período gestacional:

a) O uso de *Cannabis sativa* entre jovens em idade reprodutiva e mulheres gestantes tem aumentado nos últimos anos;

b) As alterações no ambiente intrauterino são capazes de provocar desfechos negativos sobre o desenvolvimento fetal;

c) As alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central podem contribuir para a etiologia de desordens comportamentais (ex: esquizofrenia, depressão, hiperatividade).

No entanto, ainda é incerto se a *Cannabis* contribui ou não para alterações morfológicas e funcionais dos órgãos, em filhos de mulheres que fumaram a droga durante a gravidez.

Levando em consideração todas as questões acima apresentadas, a análise metabolômica da exposição gestacional de cobaias à fumaça da *Cannabis* poderá contribuir para o melhor entendimento dos danos secundários causados pelas substâncias presentes na planta, podendo contribuir ainda para o melhor entendimento dos mecanismos toxicológicos envolvidos na exposição crônica, o que auxiliará na prevenção e diagnóstico de alterações no desenvolvimento da prole, e consequente entendimento das alterações neurológicas e fisiológicas dos órgãos afetados na vida adulta.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivos Gerais*

Este trabalho de Doutorado teve por objetivo avaliar amostras de cérebro de camundongo BalbC, e investigar os efeitos produzidos nesse órgão, decorrentes da exposição gestacional (via inalação) à fumaça da queima da maconha (*Cannabis sativa*), e na exposição da prole, por meio de uma abordagem metabolômica, utilizando GC-MS.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Determinação do 11–nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol (THC-COOH) em urina de camundongos expostos à fumaça da *Cannabis sativa*, para comprovar a exposição à substância.

- Desenvolvimento de um método de extração para amostras de cérebro de camundongos.

- Analisar e comparar o metaboloma dos grupos expostos *versus* grupo controle.

- Tratamento dos dados da análise metabolômica das amostras de cérebro para identificação dos metabólitos discriminadores.

- Interpretação biológica dos resultados.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 *Amostragem*

O projeto foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob supervisão da Profa. Dra. Mariana Matera Veras, tendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), **sob nº 5910070714** (em anexo). O estudo envolve a coleta do cérebro e fígado da prole de camundongo fêmea, exposta durante a gestação, sendo a prole também exposta após o nascimento, à fumaça da *Cannabis sativa.*

Fêmeas gestantes foram expostas a doses diárias de *Cannabis sativa* (200 mg contendo 0,3% de Δ^9-THC) de forma inalada por 5 min, a partir do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia. Uma representação esquemática do sistema de exposição pode ser observada na **Figura 8.** As exposições tiveram seu início no 5,5º dia, pois é neste período que o processo de implantação embrionária já está concluído. Durante o período de exposição foram coletadas amostras de urina das mães, 24 h após a exposição, para dosagem de THC-COOH. Após a conclusão das exposições, as fêmeas foram mantidas individualmente até o nascimento de suas proles. Ao atingirem a idade para o desmame (21 dias), considerado como fase "adolescência" em camundongos, os filhotes foram separados de suas respectivas mães, e grupos de machos e fêmeas foram formados. A prole foi exposta à fumaça da *Cannabis sativa* ou ar filtrado (de acordo com cada grupo formado) por mais 60 dias. Durante o período de exposição, também foram coletadas amostras diárias de urina da prole, 24 h após a exposição, para dosagem de THC-COOH.

A prole de machos foi dividida em 4 grupos: o **Grupo CS-CS** (5 animais), exposto à *Cannabis* durante e após a gestação; o **Grupo AF-AF** (5 animais), exposto ao ar filtrado durante e após a gestação; o **Grupo AF-CS** (6 animais), exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto à *Cannabis* após a gestação e o **Grupo CS-AF** (6 animais), exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação.

Aos 90 dias de vida as cobaias foram eutanasiadas e os cérebros coletados e armazenados em freezer a -80º C, para análises metabolômicas posteriores. Os mesmos procedimentos foram realizados para o grupo controle, que neste caso foram expostos a ar filtrado, sob as mesmas condições. A **Figura 9** representa o plano de trabalho ilustrativo do protocolo de exposição dos animais.

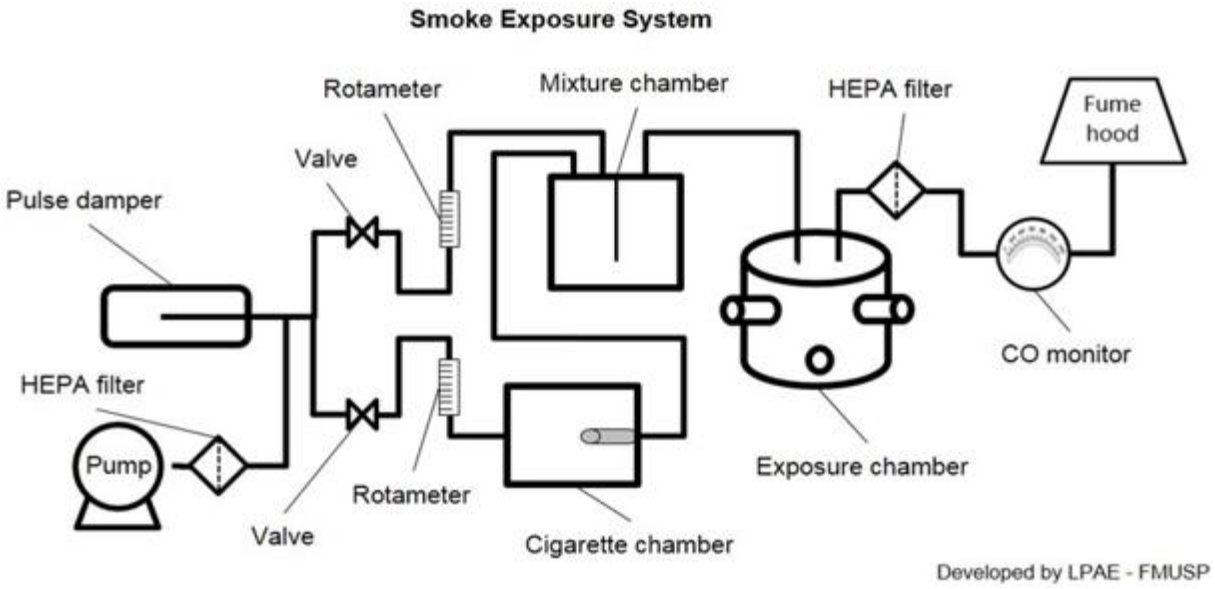


Figura 8. Representação esquemática do sistema de exposição à fumaça da *Cannabis sativa*.

A droga *Cannabis sativa* foi obtida através de solicitação oficial ao Delegado Seccional de Marília com fornecimento autorizado pela 3° Vara Criminal, Execuções Criminais – Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília - SP, sendo a liberação do material para o desenvolvimento exclusivo deste estudo.

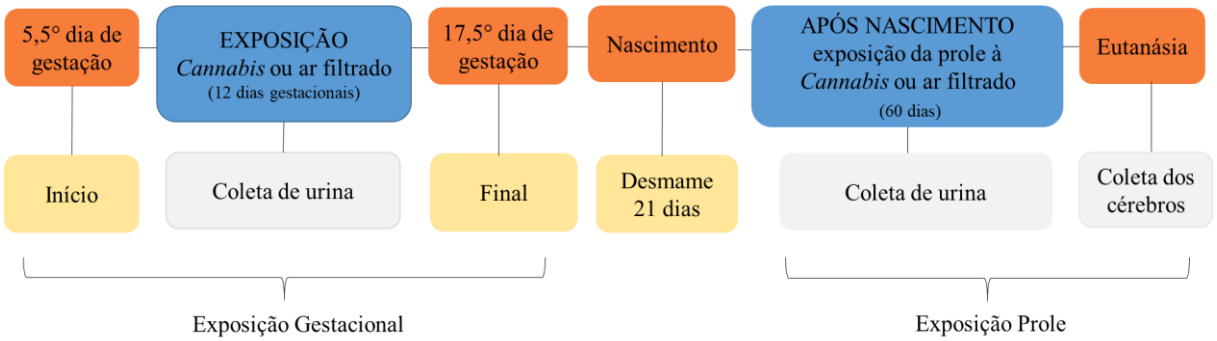


Figura 9. Esquema ilustrativo do plano de trabalho de exposição dos animais experimentais.

4.2 *Materiais e Reagentes*

Os materiais e reagentes utilizados estão descritos a seguir: hidróxido de sódio (Synth, Brasil), ácido acético (Synth, Brasil), hexano (Sigma-Aldrich, Alemanha), acetato de etila (Synth, Brasil), N,O-bis-(trimetillsilil) trifluoroacetamide (BSTFA) com 1% trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich, Alemanha), metanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), heptano (Sigma-

Aldrich, Alemanha), clorofórmio (Tedia, EUA), cloridrato de o-metoxiamina (Sigma-Aldrich, Alemanha), piridina (grau sililação, Sigma-Aldrich, USA) e C13 metil éster (Sigma-Aldrich, Alemanha).

4.3 *Padrões*

Padrões analíticos de delta-9-tetrahidrocanabinol deuterado (Δ^9-THC-D_3), na concentração de 100 μg/mL em metanol (Cerilliant, EUA) e 11–nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol (THC-COOH) (100 μg/mL em metanol e 10 μg/mL em metanol) foram cedidos pelo Laboratório de Análises Toxicológicas - LAT, sob coordenação do Prof. Dr. Maurício Yonanime. As soluções de trabalho foram preparadas utilizando água ultrapura (sistema MilliQ, Millipore, Brasil) e metanol.

4.4 *Equipamentos*

Os equipamentos listados a seguir foram utilizados neste trabalho: Vortex (Quimis, Brasil), banho de ultrasson (Quimis, Brasil), ultrasson com sonda (OMNI Ultrasonic Ruptor 400, USA), banho termostatizado (LAUDA ECO RE 1225, Alemanha), Speedvac (Thermo Cientific SPD1010, USA), e microcentrífuga (Excelsa 3-Fanen Ltda). Um cromatógrafo gasoso (modelo 5975C, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas (quadrupolo, modelo 7890 A, Agilent Technologies) foi cedido pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob supervisão do Prof. Dr. Ernani Pinto Junior, para execução dos estudos metabolômicos. O uso de um cromatógrafo gasoso (modelo 6850, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas (modelo 5975 – series MSD) foi cedido pelo Laboratório de Análises Toxicológicas - LAT, sob coordenação do Prof. Dr. Maurício Yonanime, para a análise de THC–COOH em urina).

4.5 *Métodos*

4.5.1 Determinação de 11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol (THC-COOH) em urina

4.5.1.1 Método de Extração

O preparo de amostras seguiu o procedimento descrito por Meatherall e Garriott, com ações A metodologia consiste numa extração líquido-líquido. Em um tubo eppendorf foram adicionados 200 µL de urina, 10 µL de Δ^9-THC -D_3 a 10 µg/mL, como padrão interno, e 10 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 10 mol. L^{-1}. O tubo foi agitado em vortex e incubado a 60 ºC por 20 min em banho termostatizado, para que ocorresse a hidrólise alcalina e remoção dos grupamentos glucuronídeos. Na sequência, foram adicionados 400 µL de ácido acético (CH_3COOH) 5% (v/v), para que o meio da amostra se mantivesse ácido, e o analito fosse convertido à forma não-ionizada, sendo mais facilmente extraído com solvente orgânico na etapa posterior. Após, o tubo foi agitado em vortex, e 1600 µL de uma mistura de hexano:acetato de etila (9:1 v/v) foram adicionados para a extração. Seguiu-se com agitação em vortex por 30 min, e centrifugação (2.500 g, 5 min). O sobrenadante foi coletado e seco sob fluxo de nitrogênio. O extrato seco foi derivatizado com 20 µL de BSTFA com 1% TMCS e incubação a 80 ºC por 30 min. Ao final, foram adicionados 50 mL de heptano. Nas soluções padrão também foi adicionado o padrão interno, a as soluções foram secas sob fluxo de nitrogênio e derivatizadas com BSTFA com 1% de TMCS, seguindo o mesmo procedimento de derivatização, sendo adicionados 50 mL de heptano ao final.

4.5.1.2 Condições Analíticas

As amostras e soluções padrão foram injetadas no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (modelo 6850, Agilent Technologies), com amostrador automático (modelo G4513A), utilizando-se uma coluna capilar HP5-MS (5% difenilpolisiloxano - 95% dimetil, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,10 µm, Agilent Technologies) e Hélio como gás de arraste, na vazão de 0,6 mL/min. Foi utilizado um volume de injeção de 1 µL (modo splitless). As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram ajustadas para 250°C. A eluição foi realizada com programação linear de temperatura, com temperatura inicial de 150 ºC mantida por 1 min, seguida por aumento linear a 15 ºC/min até 270 ºC, permanecendo por 6 min. O tempo total de análise foi de 15 minutos. O espectrômetro de massas foi programado para aquisição em modo *Full Scan* e SIM, adquirindo espectros de *m/z* (306, 315, 371, 372, 374, 389, 473, 488) selecionados, com fonte de ionização por elétrons (EI) utilizando energia de 70 eV. Os detalhes instrumentais do método estão compilados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Condições instrumentais do método CG-MS para análise de THC-COOH em urina.

INJEÇÃO	Temperatura do injetor	250 °C
	Volume da injeção	2 µL
	Modo de injeção	Splitless
CROMATOGRAFIA	Coluna	HP-MS (5% difenilpolisiloxano – 95% dimetil, 30 m x 0,25 mm, 0,10 µm)
	Gás de arraste	Hélio
	Fluxo de gás de arraste	0,6 mL/min
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	Rampa de aquecimento	150 °C/min. – aumento 15 °C/min. até 270 °C – permanecendo por 6 °C/min
	Temperatura da linha de transferência	250 °C
	Modo de ionização	Ionização por elétrons (70 eV)
	Modo de operação	*Full Scan* e SIM

4.5.2 Desenho de Misturas na Extração para Cérebro de Camundongos

4.5.2.1 Método de Extração

Foram utilizadas três amostras de cérebro de camundongo BalbC, pesando aproximadamente, 200 mg cada amostra. As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido, com ajuda de pistilo e capsula de porcelana. Após pulverização, as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C.

Para a extração foram testadas 10 condições de misturas de solventes. Foram transferidos 30 mg da amostra de cérebro pulverizado para tubos Eppendorf e adicionado 1 mL da proporção de solvente descrita a seguir: (A) 100% MetOH, (B) 100% H_2O, (C) MetOH:H_2O (1:1), (D) MetOH:$CHCl_3$ (1:1), (E) H_2O:$CHCl_3$ (1:1), (F) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3,3:3,3:3,3), (G) H2O:MetOH:$CHCl_3$ (1:6:3), (H) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3:6:1), (I) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (4:2:4) e (J) 100% $CHCl_3$. As proporções estão em volume.

As amostras foram colocadas em vortex por 1 min, homogeneizadas por mais 1 min com Probe Sonicador (homogeneizador ultrassônico) e centrifugadas (18.000 g por 5 min).

Foram coletados 200 µL de cada extrato, transferidos para outro tubo, e secos em Speedvac. Foram realizadas triplicatas de cada proporção dos solventes.

Após a extração, as amostras foram preparadas em 2 etapas:

1. Metoximação: foram adicionados 10 µL de o-metoxiamina em piridina em todas as amostras, seguido de agitação vigorosa em ultrassom e vortex por 1 min e, após, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 90 min.

2. Sililação: foram adicionados 10 µL BSTFA contendo 1% TMCS em todas as amostras que sofreram metoximação, seguido de agitação vigorosa em ultrassom e vortex por 1 min e, após, as amostras permaneceram em banho termostatizado a 40 ºC por 30 min.

Após metoximação e sililação, foram adicionados a cada amostra, 100 µL de metil éster (C13) em heptano, como padrão interno. As amostras foram colocadas em vortex por 1 min e injetadas no equipamento.

4.5.2.2 Condições Analíticas

As análises por GC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso modelo 7890A acoplado a espectrômetro de massas modelo 5975C (Agilent Technologies, EUA), equipado com coluna cromatográfica ultra inerte HP5-MS (5% difenilpolisiloxano - 95% dimetil, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm, Agilent Technologies). A eluição foi realizada com programação linear de temperatura, com temperatura inicial de 60 °C mantida por 1 min, seguido por aumento linear a 10 ºC /min até 300 ºC (mantido nesta condição por 5 min). A temperatura do injetor e da linha de transferência foram ajustadas para 290 °C.

O tempo total de análise foi de 25 min. Hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1,0 mL/min, e as amostras injetadas em modo split, com razão 1:10. O espectrômetro de massas foi programado para aquisição em modo *Full Scan*, adquirindo espectros de 50 a 600 m/z (taxa de aquisição de 5 espectros/s), após ionização por elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV. Todo o sistema foi controlado pelo software ChemStation versão E02021431. Os detalhes instrumentais do método estão compilados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Condições instrumentais do método CG-MS para análise do cérebro.

INJEÇÃO	Temperatura do injetor	250 °C
	Volume da injeção	1 µL
	Modo de injeção	Split 1:10 a 10mL/min
CROMATOGRAFIA	Coluna	HP5-MS (95% dimetil – 5% difenilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,10 µm)
	Gás de arraste	Hélio
	Fluxo de gás de arraste	0,6 mL/min
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	Rampa de aquecimento	60 °C/min – aumento até 300° C – permanecendo por 10 °C/min – tempo total 25 min
	Temperatura da linha de transferência	290 °C
	Modo de ionização	Ionização por elétrons (70 eV)
	Modo de operação	*Full Scan* (espectros de 50 a 600 *m/z*)

Fonte: ROJO *et al*. (2015), adaptado.

4.5.3 Análise Metabolômica do Cérebro de Camundongo

4.5.3.1 Método de Extração

Para a análise metabolômica de cérebro de camundongos, foram utilizados 5 cérebros do grupo AF-AF, 5 cérebros do grupo CS-CS, 6 cérebros do grupo AF-CS e 6 cérebros do grupo CS-AF. Todas as amostras foram pulverizadas individualmente em nitrogênio líquido, com ajuda de pistilo e capsula de porcelana. Após pulverização foram armazenadas em freezer a -80 °C.

Foram transferidos 30 mg da amostra pulverizada (cérebro) para tubos de Eppendorf e adicionado 1 mL da proporção de solvente MetOH:H_2O (1:1).

As amostras foram colocadas em vórtex por 1 min, homogeneizadas com Probe Sonicador (homogeneizador ultrassônico) operado a 30% por 1 min e centrifugadas (18.000 g/5 min). Foram retiradas alíquotas de 200 µL de cada amostra para análise. Foram coletados 200 µL de cada amostra e transferidos para outro tubo. E, para composição das amostras de controle de qualidade (CQ) foram coletados mais 200 µL de cada amostra e feito um pool de todas as

amostras. Todas as amostras foram secas em Speedvac. Após a extração, as amostras foram derivatizadas (metoximação e sililação), conforme descritas no item anterior (4.5.2.1).

4.5.3.2 Condições Analíticas

As condições analíticas para a metabolômica do cérebro de camundongo foram as mesmas descritas no item 4.5.2.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Determinação de 11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol (THC-COOH) em urina*

A urina é a amostra de eleição na análise da exposição aos canabinóides, por ser facilmente obtida, não utiliza métodos invasivos para a coleta, apresenta altas concentrações dos metabólitos após a biotransformação, e dependendo da frequência do uso da droga, o período de detecção vai de 3 a 20 dias ou mais (HUESTIS, 2007). A técnica analítica mais utilizada para a identificação e quantificação dos canabinóides é GC-MS.

Os métodos de extração do THC-COOH descritos na literatura utilizam no mínimo 1 mL de urina, como quantidade de amostra. No trabalho desenvolvido, a quantidade de urina obtida após a exposição de camundongos fêmeas ao Δ^{9}-THC foi de 100 µL a 500 µL, quantidade muito inferior ao recomendado na literatura. Dessa forma, foi necessária a realização de uma validação parcial do método, para garantir que resultados confiáveis sejam obtidos, e que possam ser interpretados de forma satisfatória (RIBANI *et al*., 2004).

De acordo com Departamento de Saúde e Serviços Humanos (DHHS, do inglês, *Department of Health and Human Services*), os valores de *cut off* em amostras de urina em humanos, para confirmação da exposição de Δ^{9}-THC, é de 15 ng/mL de THC-COOH.

Foram analisadas amostras de urina de camundongo fêmea gestante (n = 2) e amostras da prole exposta (n = 10).

As análises foram feitas no modo SIM e no modo *Full Scan* para identificação dos compostos derivatizados. Primeiramente, foi realizada a identificação dos metabólitos, no modo *Full Scan* de detecção, no qual um amplo intervalo de *m/z* é monitorado. Neste modo, o espectro de massas é obtido e o tempo de retenção de cada analito registrado. Após a obtenção do espectro de massas de cada composto, foram selecionados os íons mais abundantes para a utilização no modo SIM de detecção **(Figura 10** e **Figura 11)**, buscando os íons *m/z* 371, 372, 473, 488 para THC-COOH, e 306, 315, 389, 374 para Δ^{9}-THC-D_3. No modo SIM, os cromatogramas apresentam um menor ruído, o que aumenta a razão sinal/ruído, melhorando a detectabilidade do método.

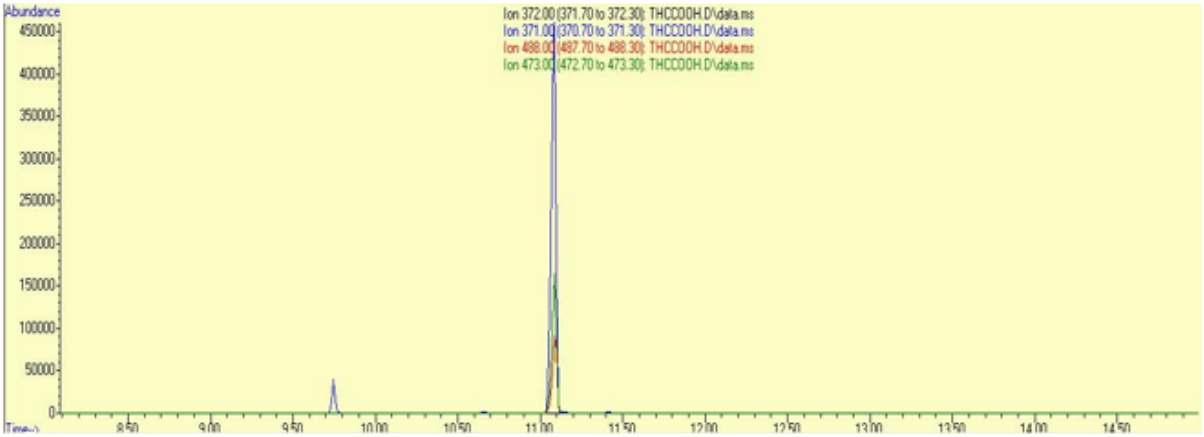


Figura 10. Cromatograma dos íons extraídos de THC-COOH, analisado por GC-MS, no modo SIM, registrando a intensidade dos *m/z* (371, 372, 473, 488), no tempo de retenção de 11,088 minutos.

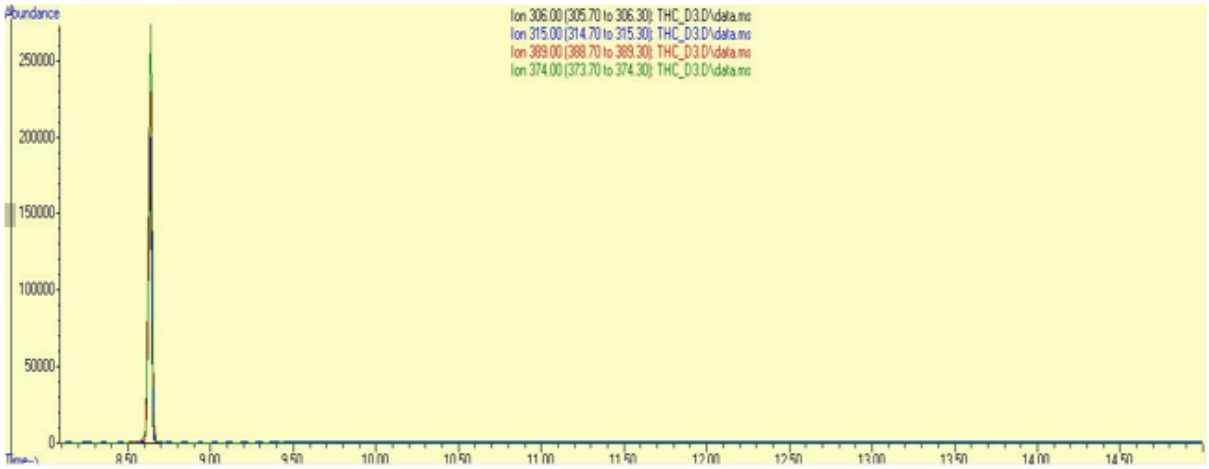


Figura 11. Cromatograma dos íons extraídos de Δ^9-THC-D_3, analisados por GC-MS no modo SIM, registrando a intensidade dos *m/z* (306, 315, 389 e 374), no tempo de retenção de 8,630 min.

Os íons (*m/z*) selecionados para identificação e quantificação da exposição ao Δ^9-THC e seus metabólitos, em usuários de *Cannabis*, estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Principais íons utilizados para confirmação da exposição ao Δ^9-THC.

Substância Psicoativa	Íons de Detecção e Quantificação	Tempo de Retenção (t_R), min
Δ^9 THC-D_3	306, <u>374</u>, 389, 315	8,630
THC-COOH	371, 372, <u>473</u>, 488	11,088

Nota: Os valores sublinhados representam os íons quantificadores pelo CG-MS.

5.1.1 Validação Parcial do Método

A validação de métodos é desenvolvida quando é implementado um novo método analítico, porém uma validação parcial pode ser aplicada quando há modificações em um método já validado. Essas modificações podem ser realizadas quando há mudança de equipamento, mudanças na matriz biológica, etc.

No Brasil, há duas agencias que disponibilizam guia para validação de métodos analíticos, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A Resolução nº 899/2003 da ANVISA, para validação de métodos analíticos em testes quantitativos, exige os seguintes ensaios: Especificidade, Linearidade, Intervalo, Repetibilidade, Exatidão e Robustez.

Alguns parâmetros como Linearidade, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Precisão podem ser usados na validação parcial de um método, como descrito a seguir para o método utilizado neste trabalho.

5.1.2 Linearidade

Avalia a capacidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada. É determinada pela análise de uma série de calibradores, dentro de uma faixa de concentração de interesse do analito (CHASIN *et al*., 1998; RIBANI *et al*., 2004). A linearidade é analisada pelo coeficiente de determinação (R^2), considerando um indicador da qualidade do ajuste da regressão. O valor deve estar entre $0 \leq R^2 \leq 1$. O coeficiente de correlação (R), representa a medida de grau de associação entre duas variáveis e como elas se relacionam, estando o valor entre $-1 \leq R \leq 1$.

O teste de linearidade também gera uma expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

Para avaliar a linearidade, foi realizada análise em triplicata, dopando a urina de camundongo não exposto, utilizando os seguintes níveis de concentração dos padrões analíticos: 7,5 ng/mL, 15 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 150 ng/mL. Diluições apropriadas, em metanol, foram feitas a partir de uma solução estoque de THC-COOH ou THC-D_3, na concentração de 1000 ng/mL.

O método apresentou excelente linearidade, com $R^2 = 0.997$ e $R = 0.998$, apresentando forte correlação entre as variáveis. A **Figura 12** apresenta a curva analítica, o coeficiente de

determinação e a equação da reta. O R^2 explica a relação entre as variáveis concentração e razões das áreas relativas. O R^2 = 0.997 obtido atesta que o modelo linear é válido, porém tem uma parte não explicada pelo modelo, devido a outros fatores que não foram observados e que o modelo linear não pode contemplar, como o indicado pelo gráfico de resíduos e barras de erros. A **Figura 13** demonstra o gráfico de barra de erros, que mede a incerteza das medidas experimentais, apresentando erros de 1,7%.

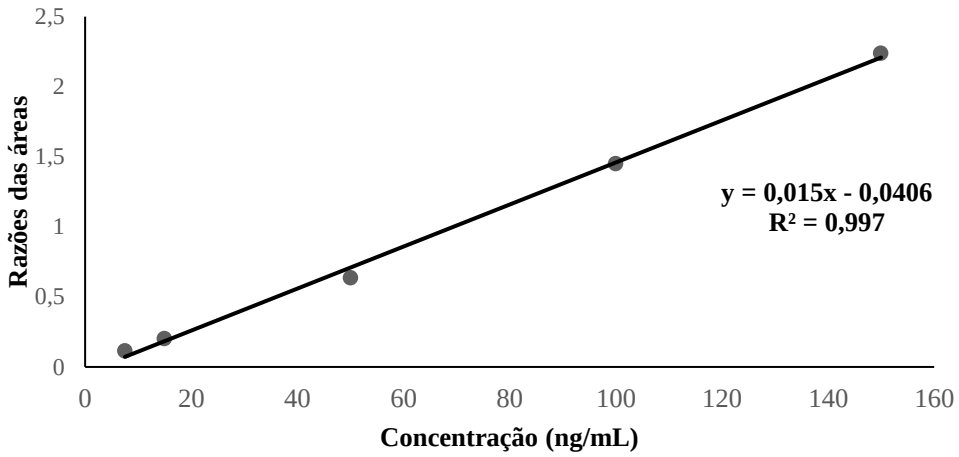
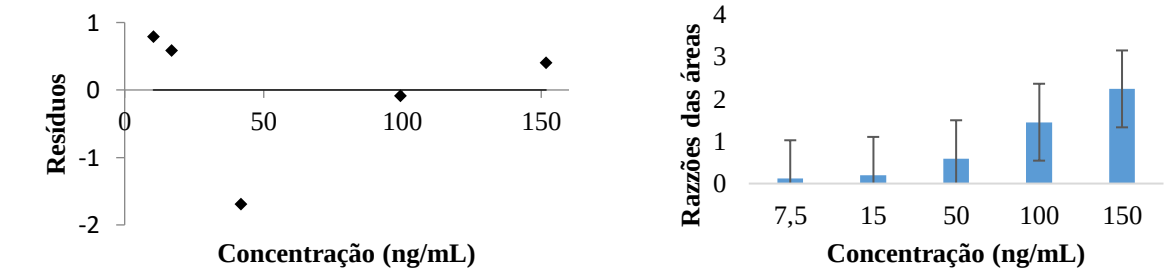


Figura 12. Curva analítica construída com THC-COOH e Δ^9 THC-D_3, onde a equação da reta e o coeficiente de determinação obtidos foram: y = 0,015X – 0,0406 e R^2 = 0,997 (faixa de concentração 7,5 a 150 ng/mL).



A **B**

Figura 13. Gráfico da análise de resíduos (**A**), variando entre 0.80 a -1.70 e gráfico da barra de erro (**B**) com desvio padrão de 0.90, obtidos a partir da curva analítica construída com THC-COOH e Δ^9 THC-D_3.

5.1.3 Precisão

Parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas numa mesma amostra (ANVISA, 2003).

A precisão do método foi avaliada com base na triplicata de amostras intradia, pela razão de áreas THC-COOH/THC-D_3, para os níveis de concentração baixo (7,5 ng/mL), médio (50 ng/mL) e alto (150 ng/mL), com resultados de 1,1% CV, 3,6% CV e 4,6% CV, respectivamente.

5.1.4 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração ou quantidade de uma substância química que pode ser identificada por um procedimento analítico. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação sinal/ruído, onde o sinal deve ser 3 vezes o ruído da linha de base (CHASIN *et al*., 1998; RIBANI *et al*., 2004; ANVISA, 2003), ou ainda, pode ser expresso pela equação:

$$LD = \frac{DPa\ X\ 3}{IC} \qquad \textit{Equação 1}$$

Onde:

DPa: é o desvio padrão do intercepto com o eixo y (ou erro do ajuste da curva, erro padrão) de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas, contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC: é a declividade da curva analítica.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser medida com precisão (CHASIN *et al*., 1998; RIBANI *et al*., 2004; ANVISA, 2003), ou pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{DPa\ X\ 10}{IC} \qquad \textit{Equação 2}$$

Onde:

DPa: é o desvio padrão do intercepto com o eixo y (ou erro do ajuste da curva, erro padrão) de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas, contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC: é a declividade da curva analítica.

O limite de quantificação pode ser determinado também por meio da relação sinal ruído da linha de base do equipamento, considerando a concentração que produza relação sinal - ruído superior a 10 (ANVISA, 2003).

Para a estimativa dos valores de LQ e LD pelo cálculo do erro padrão e declividade da curva, foram obtidos LD: 0,17 ng/mL e LQ: 0,54 ng/mL.

5.1.5 Determinação Quantitativa de THC-COOH nas amostras

Das amostras de urina analisadas, em todas foi possível detectar, identificar e quantificar o THC-COOH, principal metabólito biológico na exposição ao Δ^9-THC. As concentrações variaram entre 4,3 a 30 ng/mL, tendo média de 14 ± 3 ng/mL em mães e 14 ± 9 ng/mL nas proles (**Tabela 5**). Algumas amostras tiveram a concentração abaixo do *cut off* de 15 ng/mL em humanos.

Tabela 5. Médias das concentrações do THC-COOH encontrados em amostras de urina da camundonga gestante (MÃE) e da prole.

Número da amostra	Concentrações de THC-COOH (ng/mL)
1 (MÃE)	11,2
2 (MÃE)	16,1
3 (PROLE)	17,1
4 (PROLE)	12,7
5 (PROLE)	15,1
6 (PROLE)	23,1
7 (PROLE)	30,1
8 (PROLE)	6,30
9 (PROLE)	11,6
10 (PROLE)	4,70
11 (PROLE)	27,2
12 (PROLE)	6,80
13 (PROLE)	3,22

Esses resultados podem ser justificados com base no dia em que a amostra foi coletada, degradação pelo tempo de armazenamento, ou ainda, podem estar relacionados com a quantidade de urina coletada, entre 50 a 100 μL, quantidade insuficiente para uma extração adequada. O volume de urina coletada foi pequeno, pois, ao realizar o procedimento para as camundongas gestantes, é um fator muito estressante podendo ocasionar abortamentos.

A presença de THC-COOH na urina pode ser utilizada como marcador de exposição à *Cannabis*, porém sem correlação com a concentração plasmática.

A detecção e quantificação de canabinóides nos fluidos biológicos de camundongos, apresenta uma maior dificuldade devido à baixa concentração e pouco volume de urina, além da presença de outros compostos extraídos do meio biológico.

5.2 *Desenho de Misturas na Extração para Cérebro de Camundongos*

Existem diversos trabalhos metabolômicos desenvolvidos com amostras de cérebro, utilizando diversas composições de solventes extratores, como água, acetonitrila, clorofórmio e metanol (WU *et al*., 2008; URBAN *et al*., 2010; VUCKOVIC, 2012; SARIC, *et al*., 2012; GRAHAM *et al*., 2013), porém, não há consenso quanto às proporções utilizadas. Como um dos objetivos do projeto foi utilizar essas amostras biológicas, sob uma abordagem metabolômica não dirigida, é necessário desenvolver um protocolo de extração dessas amostras, que forneça o maior número possível de metabólitos.

A literatura mostra que a constituição do cérebro de primatas, como camundongo e humano são semelhantes, compostos por água, lipídios, proteína, carboidratos, substâncias orgânicas solúveis e sais inorgânicos (DAKOVIC *et al*., 2013). O cérebro de camundongo contém a mesma estrutura que o cérebro de outros mamíferos, mas é consideravelmente maior em relação ao tamanho do corpo. Esse aumento de tamanho relaciona-se principalmente com uma grande expansão do córtex, demonstrando não apresentar diferenças estruturais que poderiam alterar os resultados metabólicos (FINLAY; DARLINGTON; NICASTRO, 2001). O cérebro humano é constituído por 80% de água e 40-75% de lipídeos, sendo 41% colesterol, 16% glicolipideos, 14% fosfolipideos e 5-6% mielina (21% de proteína e 79% lipídeos) (GONZALEZ-RIANO; GARCIA; BARBAS, 2016).

Os metabólitos que serão extraídos da matriz dependem de alguns fatores, como polaridade, propriedades físico-químicas da substância, concentrações metabólicas, etc. (URBAN *et al*., 2010). Em geral, a extração somente com clorofórmio não é recomendada para

metabolômica não dirigida por extrair muitos compostos plastificantes, lipídeos e fosfolipídios. Combinações com metanol: água: clorofórmio são mais indicadas, pois, extraem compostos polares e não polares (WU *et al*., 2008).

Para a escolha do melhor sistema solvente para extração dos metabólitos em cérebro de camundongo foi utilizada uma extração baseada em desenho de misturas, utilizando diversas proporções dos solventes clorofórmio: metanol: água.

Para a extração, foram utilizados 30 mg da amostra de cérebro pulverizada adicionada de 1 mL de solvente, puro ou em mistura, nas proporções descritas na **Figura 14.**

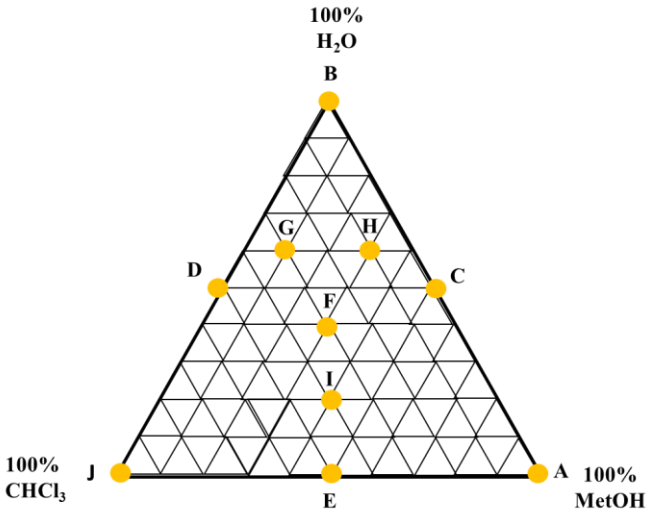


Figura 14. Desenho de mistura de solventes para avaliação da extração de metabólitos do cérebro de camundongo. (A) 100% MetOH, (B) 100% H_2O, (C) MetOH:H_2O (1:1), (D) MetOH:$CHCl_3$ (1:1), (E) H_2O:$CHCl_3$ (1:1), (F) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3,3:3,3:3,3), (G) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (1:6:3), (H) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3:6:1), (I) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (4:2:4), (J) 100% $CHCl_3$. As proporções estão em volume.

Após a extração dos metabólitos e análise por GC-MS das diversas condições de misturas de solventes foram obtidos os cromatogramas do cérebro descritos na **Figura 15**. Pode-se observar pelos cromatogramas que nas 10 condições de misturas de solventes, alguns extratos são mais ricos em informação que outros. No entanto, podem haver centenas a milhares de compostos em menor concentração, que não aparecem no registro do cromatograma. Assim sendo, para se obter de forma mais confiável o número de compostos extraídos em cada condição, é necessário compilar o número total de *molecular features* de cada condição. *Molecular features* são sinais caracterizados por um determinado intervalo de *m/z* relacionado a um intervalo de tempo de retenção definido. Quando extraídos de mais de uma amostra ao

mesmo tempo, um *molecular feature* é caracterizado por se encontrar agrupado e presente na quase totalidade das amostras.

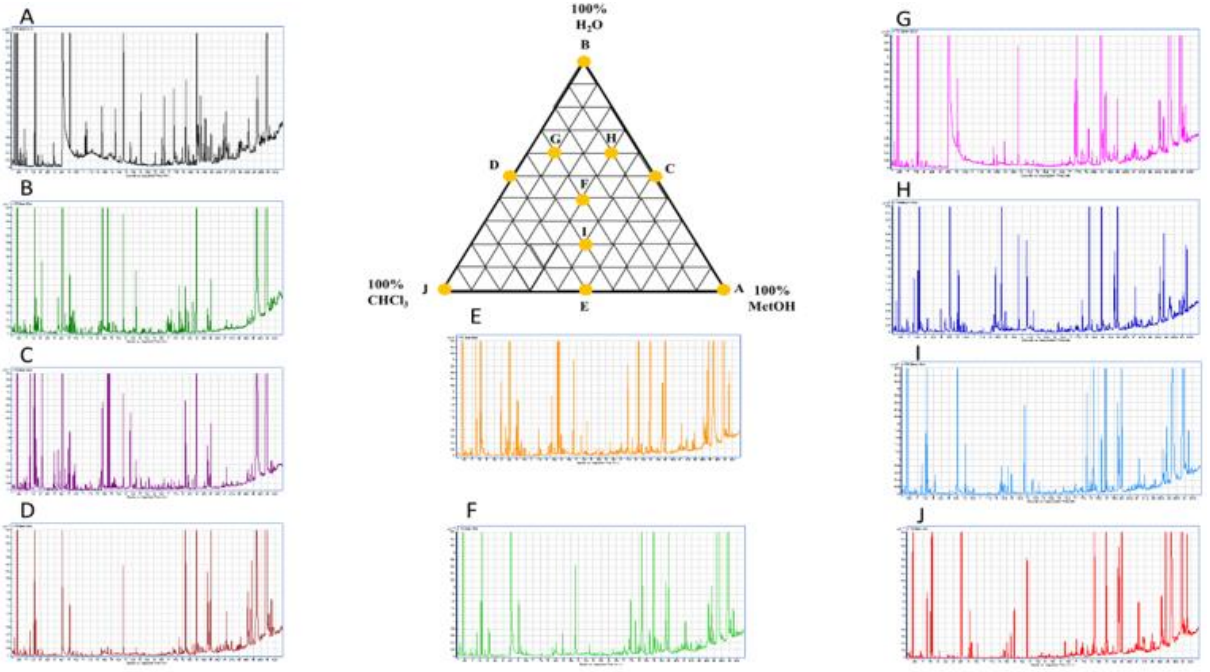


Figura 15. Cromatogramas das diversas condições de extração das misturas de solventes do cérebro de camundongo. Intensidade de 1.10^5

Os dados brutos gerados nas análises por GC-MS foram exportados e processados usando o software *R* e o pacote XCMS. Foram geradas tabelas, que apresentam íons (*m/z*), tempo de retenção e a intensidade desses íons, conhecidos como *molecular features* (intensidade de uma relação *m/z* em determinado tempo de retenção), que são os metabólitos extraídos. Após, os dados obtidos foram normalizados pela mediana e pela biomassa de cada amostra para a análise. Foram encontrados 2417 *molecular features* nas amostras de cérebro.

Para identificação desses metabólitos, utilizou o software AMDIS. Esse software realiza a deconvolução dos picos que co-eluem, e os íons com valores de (*m/z*) e tempo de retenção são comparados com bibliotecas de espectros comerciais, como NIST e FiehnLib, para identificação dos compostos presentes na amostra.

Foram identificados no total, 42 compostos nas amostras de cérebro. Porém, cada proporção de misturas de solventes apresentou composições diferentes desses metabólitos. Para a escolha do melhor sistema solvente que foi utilizado para as extrações do cérebro de camundongo na análise metabolômica, foi avaliado o sistema que extraiu a maior quantidade de metabólitos e também por um *score*. Tal *score* foi estabelecido a partir da somatória das

intensidades dos *molecular features* identificados. Foi atribuído um valor de acordo com a intensidade, conforme registrado na **Tabela 6**.

Tabela 6. *Score* dado de acordo com as intensidades dos *molecular features* encontrados nas amostras de cérebro de camundongo.

INTENSIDADE	***SCORE***
$>10^5$	4
10^4 a 10^5	3
10^3 a 10^4	2
10^1 a 10^2	1
$< 10^1$	0

A **Tabela 7** apresenta o número de metabólitos identificados pelo AMDIS e a somatória do *score* a partir da intensidade de cada *molecular feature* encontrado em cada proporção de misturas de solventes utilizada.

Tabela 7. Número de compostos identificados e o score atribuído por cada proporção de solventes empregados no desenho de misturas de cérebro de camundongos.

Amostra	**Número de compostos identificados/*score* no cérebro de camundongo**
(A) 100% MetOH	8/13
(B) 100% H_2O	25/42
(C) MetOH:H_2O (1:1)	27/46
(D) MetOH:$CHCl_3$ (1:1)	9/25
(E) H_2O:$CHCl_3$ (1:1)	27/42
(F) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3,3:3,3:3,3)	6/9
(G) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (1:6:3)	5/9
(H) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (3:6:1)	21/36
(I) H_2O:MetOH:$CHCl_3$ (4:2:4)	14/27
(J) 100% $CHCl_3$	10/12

De acordo com os resultados apresentados, uma combinação de solventes que promoveu um resultado satisfatório, tanto pelo número de compostos, como pelo *score* de intensidades, para extração dos metabólitos no cérebro de camundongo foi a de H_2O:MetOH (1:1). A identidade dos compostos extraídos e sua pertinência no metabolismo do cérebro (relacionados no banco de dados HMDB) também foi avaliada aqui na escolha do melhor sistema extrator.

A **Tabela 8** apresenta os metabólitos significantes e suas características encontrados no cérebro do camundongo na melhor condição de extração, ou seja, MetOH:H_2O (1:1) e classificados de acordo com o HMDB. A partir da escolha do melhor sistema extrator foi realizada a análise metabolômica do cérebro de camundongos expostos à fumaça de *Cannabis sativa*.

Tabela 8. Metabólitos significantes e características dos compostos identificados pelo AMDIS no desenho de misturas de solventes MetOH:H_2O (1:1) aplicado ao cérebro de camundongo.

Metabólito	Massa Isotópica	Fórmula Molecular
Aminoácidos Peptídeos e Análogos		
Ácido aspártico	160	$C_4H_7NO_4$
Isoleucina	86	$C_6H_{13}NO_2$
Leucina	158	$C_6H_{13}NO_2$
Serina	116	$C_3H_7NO_3$
Treonina	218	$C_4H_9NO_3$
Valina	117	$C_5H_{11}NO_2$
Ácido acetilaspártico	68	$C_6H_9NO_5$
Ácido gama aminobutírico	102	$C_4H_9NO_2$
Alanina	89	$C_3H_7NO_2$
Creatinina	115	$C_4H_7N_3O$
Fenilalanina	165	$C_9H_{11}NO_2$
Ácido glutâmico	246	$C_5H_9NO_4$
Tirosina	280	$C_9H_{11}NO_3$
Ácidos dicarboxílicos/tricarboxílicos e derivados		
Ácido fumárico	245	$C_4H_4O_4$
Ácido succínico	247	$C_4H_6O_4$
Ácido cítrico	273	$C_6H_8O_7$
Carboidratos e Carboidratos conjugados		
Ribitol	152	$C_5H_{12}O_5$
Alfa/beta hidroxiácidos e derivados		
Ácido glicólico	147	$C_2H_4O_3$
Ácido málico	134	$C_4H_6O_5$
Ácidos graxos e conjugados		
Ácido mirístico	117	$C_{14}H_{28}O_2$
Ácido oleico (C18)	282	$C_{18}H_{34}O_2$
Purinas e derivados		
Adenina	264	$C_5H_5N_5$
Hipoxantina	265	$C_5H_4N_4O$
Inosina	245	$C_{10}H_{12}N_4O_5$
Gama butirolactonas		
Ácido ascórbico	332	$C_6H_8O_6$
Glicerofosfatos		
Glicerol-1-fosfato	357	$C_3H_9O_6P$
Ácido piridinocarboxílico e derivados		
Metil nicotinamida	179	$C_7H_9N_2O$
Pirimidinas		
Uracila	241	$C_4H_4N_2O_2$
Uréias		
Uréia	147	CH_4N_2O

5.3 *Análise Metabólica de Cérebro de Camundongo*

Para análise metabolômica não dirigida da exposição gestacional e prole após exposição à *Cannabis sativa*, foram utilizados 5 cérebros da prole do **Grupo AF-AF**, exposto ao ar filtrado durante e após a gestação, 5 cérebros do **Grupo CS-CS**, exposto à *Cannabis* durante e após a gestação, 6 cérebros do **Grupo AF-CS**, exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação e 6 cérebros do **Grupo CS-AF**, exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação. A **Figura 16** apresenta o esquema ilustrativo de formação dos grupos exposto e controle. Os extratos foram preparados com MetOH:H_2O (1:1). Amostras de QCs foram utilizadas para avaliação da performance do sistema analítico. Os QCs são analisados durante toda a sequência analítica, com finalidade de avaliar o desempenho e estabilidade instrumental durante as medidas.

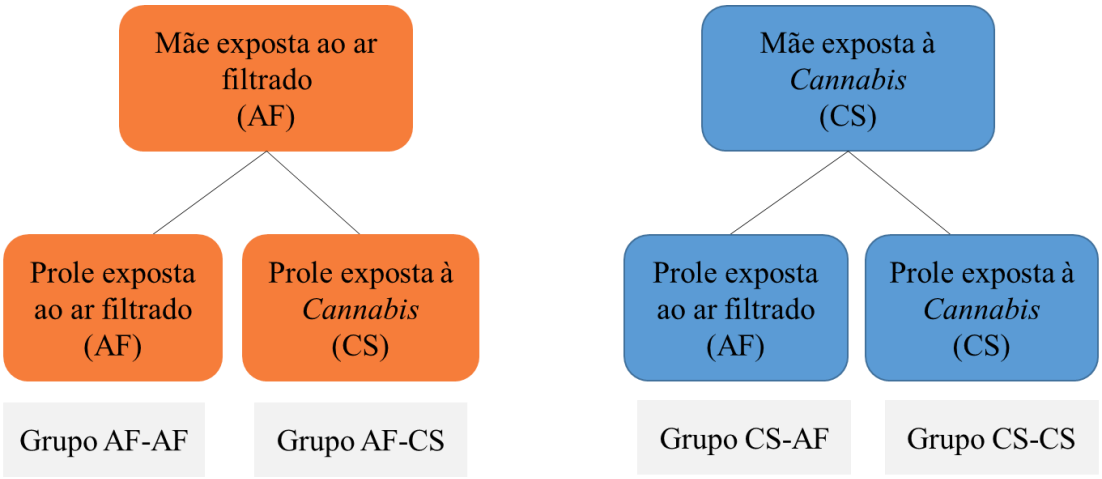


Figura 16. Esquema ilustrativo dos grupos teste e controle.

Os dados de GC-MS gerados foram processados pelo método "*matched filter*" no XCMS para obtenção da matriz de dados, e avaliados por ferramentas uni e multivariada, posteriormente, o processamento de dados realizado pelo XCMS, utiliza ferramentas para a detecção dos picos (parâmetros fwhm, snthresh e max), agrupamento (parâmetros bw, mzwid, minfrac), alinhamento (parâmetro span) e preenchimento dos *missing values* pela função "*fillPeaks*". A normalização pela mediana e biomassa também foi aplicada aos dados. Os parâmetros utilizados para detecção de picos foram, fwhm: 4.0, sntresh: 3.0, max: 30; para agrupamento, bw: 2, mzwid: 0.5, minfrac: 0.75; e para alinhamento, span: 0.2.

Esses dados foram analisados no software SIMCA P+12.0.1 (Umetrics) para análise multivariada, realizando escalonamento por UV (unit variance). Em seguida, foi realizada uma análise multivariada não supervisionada (PCA), das amostras e QCs, para a análise da qualidade dos dados. Observa-se na **Figura 17** que a variabilidade dos QCs é muito menor que a das outras amostras, tanto nos grupos expostos, como no grupo controle, encontrando-se mais próximo do centro do gráfico, indicando que não houve problema instrumental durante a análise.

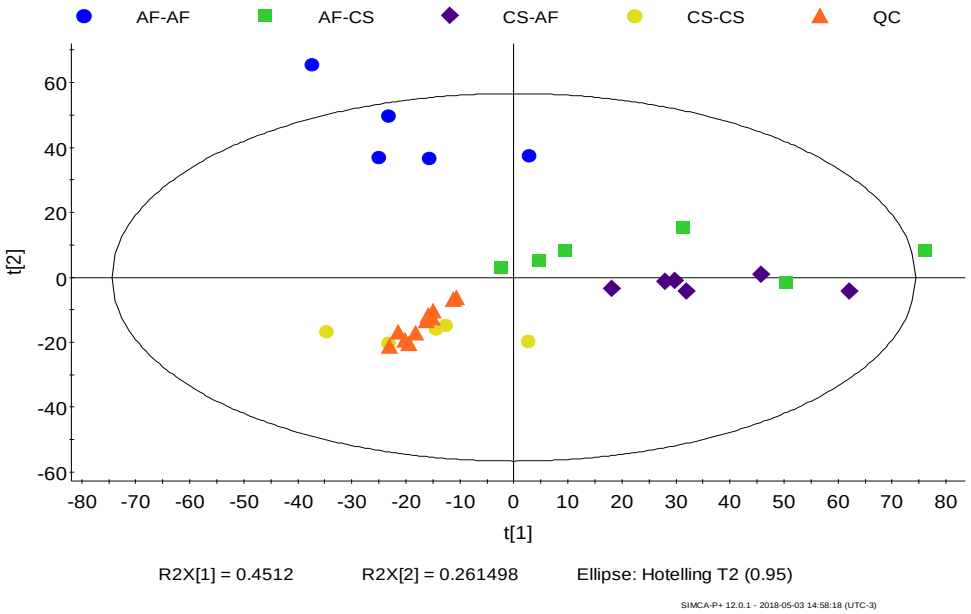


Figura 17. Gráfico de escore do modelo de PCA com amostras dos grupos **QC** (amostras controle de qualidade) e prole dos grupos **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação), **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação), **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação) **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.834$ e $Q^2 = 0.753$.

A distância euclidiana entre os pontos dentro de um mesmo grupo reflete o grau de variação de perfil metabólico das amostras, é esperado que ocorra uma dispersão vertical entre os grupos, devido ser uma matriz biológica e existir muitas variabilidades. Para a análise não supervisionada, os modelos apresentaram parâmetros de qualidade muito bons, com $R^2 = 0.834$ e $Q^2 = 0.753$. O R^2 é o ajuste do modelo e indica a variança explicada pelo modelo e o Q^2 indica a previsibilidade do modelo. Para amostras biológicas são utilizados $Q^2 > 0,4$ e $R^2 > 0,7$ (GONZALEZ-RIANO; GARCIA; BARBAS, 2016).

Verificada a qualidade dos dados obtidos, os QC foram excluídos e as amostras foram reprocessadas no XCMS utilizando os mesmos parâmetros descrito anteriormente.

Após, foi utilizado o modelo multivariado supervisionado de análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), para a busca de metabólitos discriminantes entre as amostras. A **Figura 18** apresenta o gráfico do PLS-DA de todos os grupos, demostrando uma separação entre eles, com Q^2 = 0.881 e R^2 = 0.935, e análise de variância (ANOVA) com significância estatística.

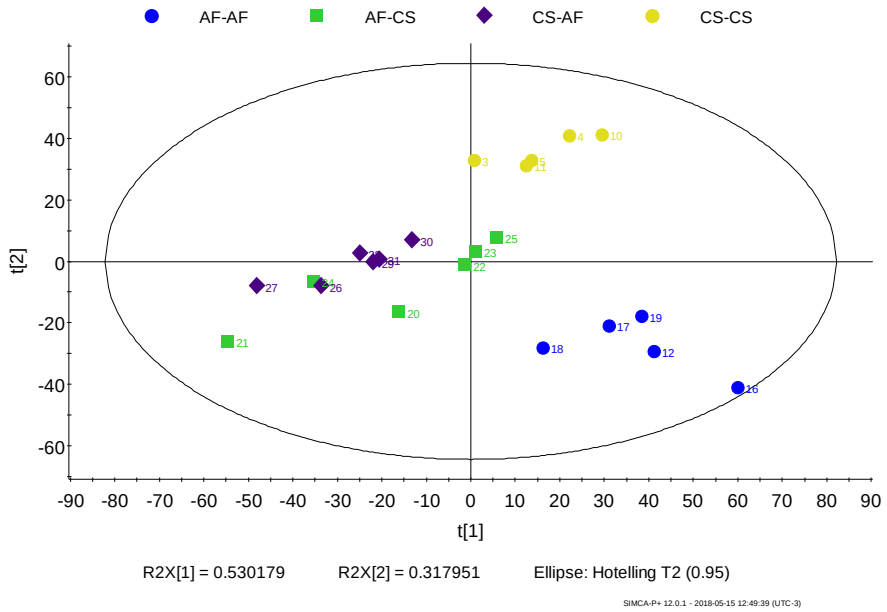


Figura 18. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com todos os grupos. **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação), **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação), **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação) **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo com 4 componentes: R^2 = 0.935 e Q^2 = 0.881, ANOVA: F = 6.26 e *p*-valor = 2,6 x 10^{-7}.

O modelo também foi validado por um teste de permutação, para verificar se as diferenças entre classificação das amostras e modelos são significativas. Nesse teste, as amostras são intencionalmente forçadas ao erro e alteradas em cada modelo permutado. São aceitos modelos com valores de R^2 e Q^2 menores do que o construído originalmente com todos os dados. O teste foi realizado com 100 permutações e pode-se observar que os valores de R^2 e Q^2 são menores que o valor real, validando o modelo **(Figura 19).**

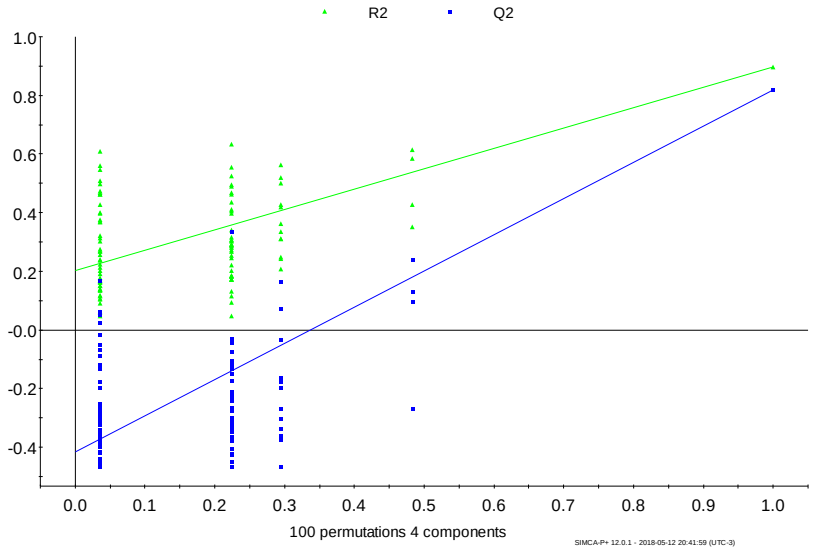


Figura 19. Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (100 permutações).

Para a busca de metabólitos discriminantes, uma análise por PLS-DA foi realizada comparando os grupos dois a dois. As **Figuras 20, 21, 22** e **23**, apresentam os modelos de PLS-DA comparando dois grupos, nos quais são observadas excelentes separações entre as amostras, com valores bons de R^2 e Q^2 e análise de variância (ANOVA) com significância estatística.

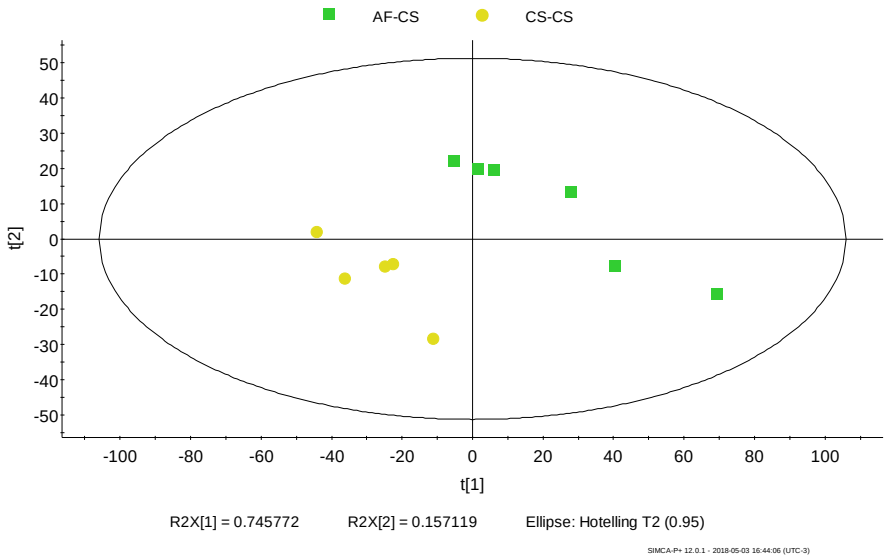


Figura 20. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com amostras dos grupos **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis* após a gestação) e **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.996 e Q^2 = 0.989, ANOVA: F = 42.04 e *p*-valor = 0.000435.

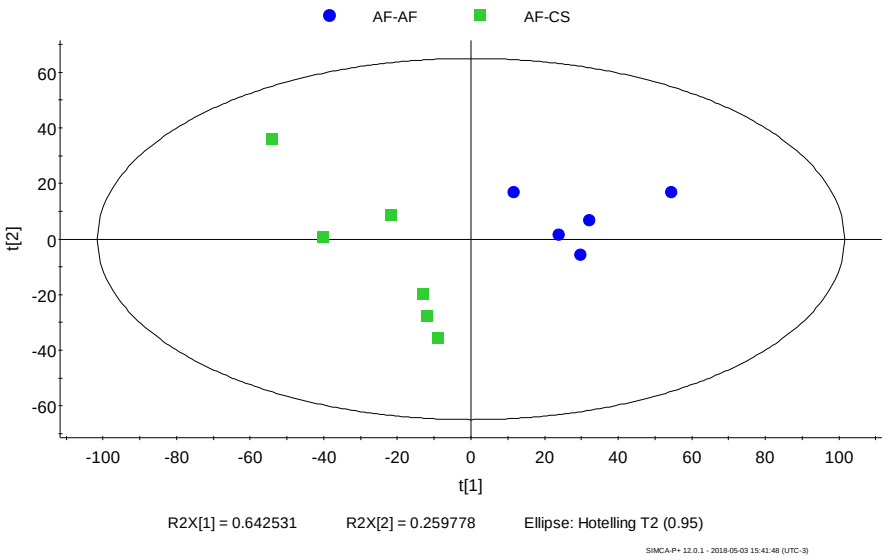


Figura 21. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com os grupos. **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação) e **AF-CS** (exposto ao ar filtrado durante a gestação e exposto a *Cannabis*). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.983$ e $Q^2 = 0.877$, ANOVA: F = 7.76 e *p*-valor = 0.021.

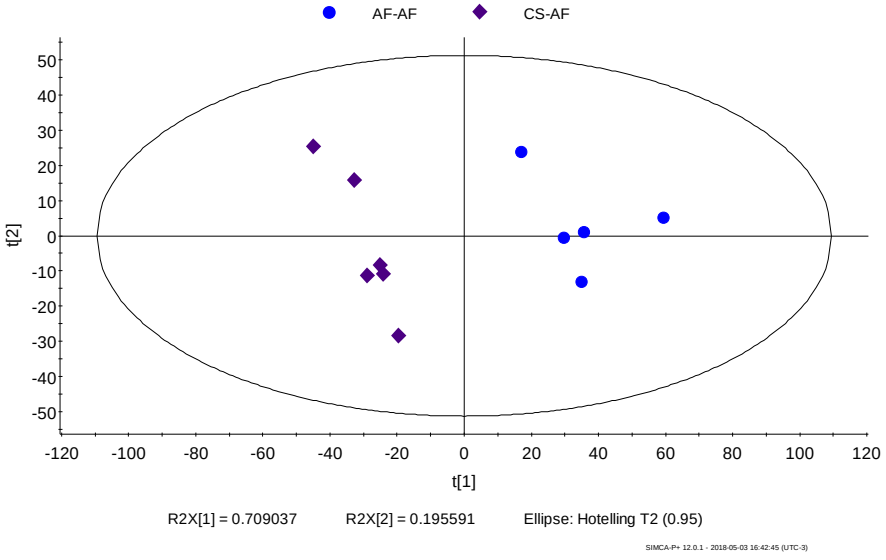


Figura 22. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com os grupos. **AF-AF** (exposto ao ar filtrado durante e após a gestação) e **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.993$ e $Q^2 = 0.971$, ANOVA: F = 23.29 e *p*-valor = 0.0178.

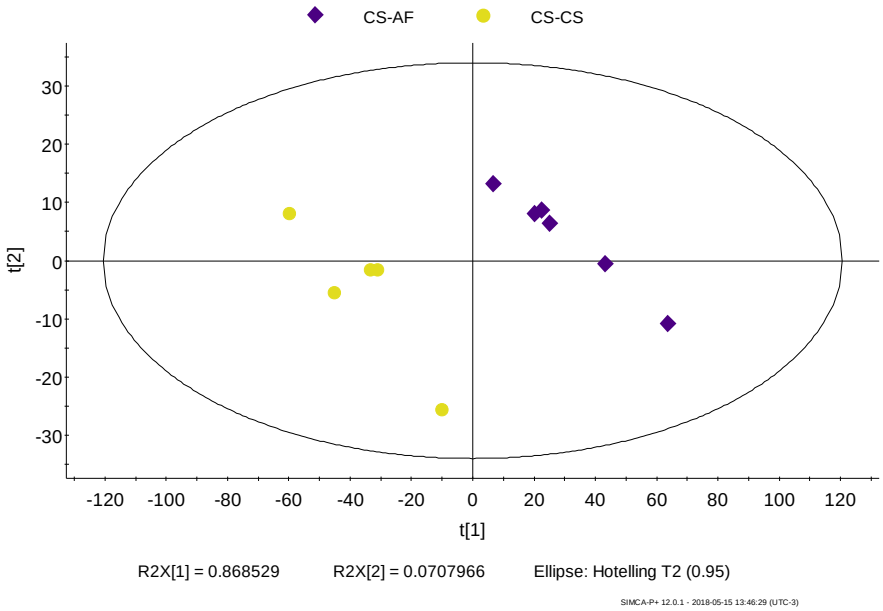


Figura 23. Gráfico de escore do modelo de PLS-DA com os grupos. **CS-AF** (exposto à *Cannabis* durante a gestação e exposto ao ar filtrado após a gestação) **CS-CS** (exposto à *Cannabis* durante e após a gestação). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.998$ e $Q^2 = 0.994$, ANOVA: F = 26.51 e *p*-valor = 0.00364.

Os metabólitos discriminantes foram selecionados através do valor da importância da variável na projeção (VIP), obtidos do modelo PLS-DA e indica a influência da variável (*molecular feature*) na classificação do modelo de separação, apontando os compostos que mais tiveram influência na separação dos grupos. São considerados discriminantes, os valores de VIP> 1,0. Foi realizado também, análise estatística univariada por teste de Kruskal Wallis, realizado no software Matlab (2015), e testes não paramétricos, como o Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

A identificação dos metabólitos discriminantes significativos foi realizada no software AMDIS, utilizando bibliotecas comerciais (FiehnLib e NIST). Utiliza-se valor de NET como indicador da qualidade da correspondência final para a correspondência entre o componente deconvoluído e o espectro da biblioteca, onde um valor máximo de 100 mostra uma combinação perfeita. São utilizados valores NET> 80. Dessa forma, foram identificados 19 metabólitos estatisticamente significativos.

Para melhor compreensão dos resultados apresentados e discussão, a **Figura 24** mostra como as amostras foram divididas em grupos e as possíveis comparações entre os grupos analisados.

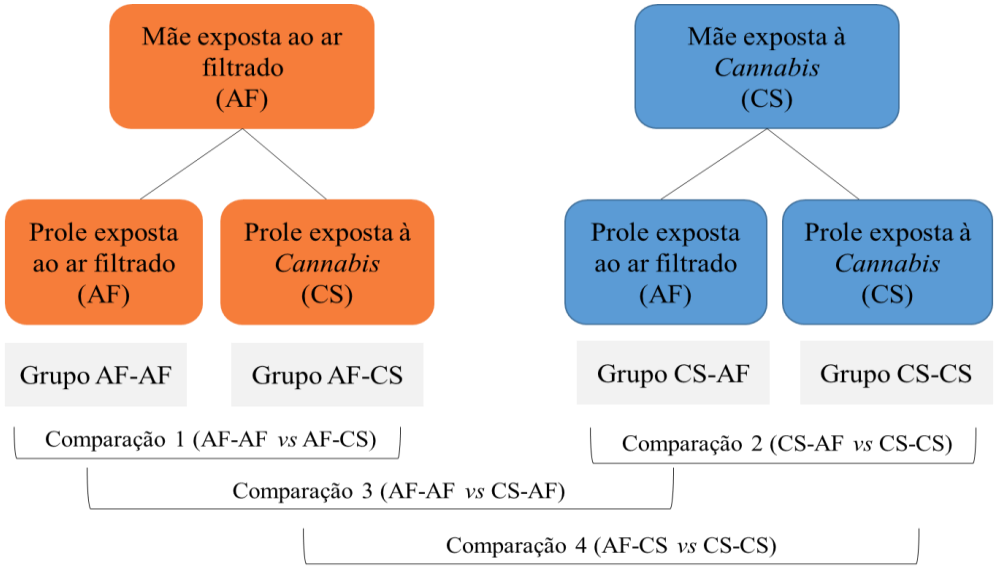


Figura 24. Esquema de comparações entre os grupos analisados.

A **Tabela 9** mostra os metabólitos discriminantes identificados com VIP > 1 obtido pelo modelo multivariada PLS-DA, o *p*-valor obtido pela análise univariada do teste de Kruskal Wallis, valor NET obtido pelo AMDIS e o *fold change* que é calculado pela razão entre a média de intensidade nas amostras do grupo exposto pela média de intensidade nas amostras do grupo não exposto. Valores >1 indicam aumento do metabólito em questão nas amostras teste (camundongos expostos) e valores <1 indicam diminuição.

Após identificação dos metabólitos estatisticamente significativos foram buscados em bancos de dados disponíveis, como, NIST, KEGG, HMDB e METLIN, informações adicionais sobre as vias metabólicas, e quais alterações podem estar relacionadas com as alterações no cérebro, após exposição do camundongo à *Cannabis*.

O consumo de maconha a longo prazo durante a gravidez pode prejudicar a maturação do cérebro e predispor os filhos a desordens de desenvolvimento neurológico, e mesmo após a gestação, a exposição à *Cannabis* também pode desencadear processos danosos ao cérebro. Estudo sugere que o uso dessa substância na adolescência pode ser um período vulnerável de exposição, podendo interferir na maturação fisiológica e anatômica do cérebro, principalmente no córtex cerebral, ocasionando déficits cognitivos de longo prazo, como comprometimento na aprendizagem e memória, além do risco aumentado de transtornos psiquiátricos (GRANT *et al*., 2003; CREAN; CRANE; MASON, 2011; MEIER *et al*., 2012; RAVER; HAUGHWOUT; KELLER, 2013).

Tabela 9. Metabólitos significativos identificados no cérebro de camundongo, *p*-valor, fator NET e o *fold change* obtido pela análise metabolômica, após exposição à *Cannabis sativa*.

		FOLD CHANGE /*p*-valor				**Metabólito**	**Fator NET**
m/z	T_R (min)	Comparação 1 AF-AF *vs* AF-CS	Comparação 2 CS-AF *vs* CS-CS	Comparação 3 AF-AF *vs* CS-AF	Comparação 4 AF-CS *vs* CS-CS		
86	8.3	↓ 0.87/ 0.004				Isoleucina	85
147	9.18	↓ 0.96/ 0.004	↑ 1.13/0.008		↑ 1.80/0.009	Uréia	99
158	9.7				↑ 1.81/0.004	Leucina	86
102	10.0		↑ 1.85/0.004		↑ 1.87/0.004	Ácido gama aminobutírico (GABA)	90
247	10.2	↓ 0.82/ 0.004		↓ 0.80/ 0.004		Ácido succínico	93
245	10.7	↓ 0.83/ 0.004		↓ 0.80/0.004		Ácido fumárico	93
116	9.47	↓ 0.87/0.004	↑ 1.85/0.004	↓ 0.84/0.004	↑ 1.88/0.004	Serina	95
218	11.3	↓ 0.88/0.004		↑ 1.02/ 0.004		Treonina	93
115	13.5		↑ 1.86/0.004		↑ 1.89/0.004	Creatinina	93
246	14.2	↓ 0.84/ 0.004		↓ 0.80/ 0.004		Ácido glutâmico	93
68	14.8	↓ 0.80/ 0.004		↓ 0.78/0.004		Ácido acetilaspártico	90
357	15.9	↓ 0.80/ 0.004		↓ 0.76/0.004		Glicerol -1- fosfato	96
332	17.8	↓ 0.81/ 0.004	↑ 1.80/0.004	↓ 0.77/ 0.004	↑ 1.71/0.004	Ácido ascórbico	88
280	17.7	↓ 0.86/0.004		↓ 0.84/0.004		Tirosina	89
273	16.5	↓ 0.79/0.004	↑ 1.80/0.004	↓ 0.79/0.004	↑ 1.73/0.004	Ácido cítrico	93
264	16.9	↓ 0.81/0.004	↑ 1.39/0.004	↓ 0.79/0.004		Adenina	87
265	16.3	↓ 0.81/0.004		↓ 0.78/0.004	↑ 1.75/0.004	Hipoxantina	93
245	23.3	↓ 0.85/0.004		↓ 0.81/0.004		Inosina	93
241	10.6	↓ 0.81/0.004		↓ 0.85/0.004		Uracila	85

Nota: (↓-) diminui nas amostras teste (exposto), ou está aumentado no controle (não exposto), e (↑) aumenta nas amostras teste (exposto), ou está diminuído no controle (não exposto).

A partir dos resultados encontrados (**Tabela 9**), observa-se que houve alteração dos metabólitos na prole após exposição da mãe, demonstrado pela **Comparação 3 (Figura 24)** grupo AF-AF *vs* CS-AF, onde ocorreu somente exposição à *Cannabis* durante a gestação. Os metabólitos diminuídos foram, ácido succínico, ácido fumárico, serina, ácido glutâmico, ácido acetilaspártico, glicerol 1-fosfato, ácido ascórbico, tirosina, ácido cítrico, adenina, hipoxantina, inosina e uracila, e aumentado, a treonina. Quando se analisa a **Comparação 1 (Figura 24)**, o grupo AF-AF *vs* AF-CS, onde só ocorreu exposição após a gestação, ou seja, fase adolescente, os metabólitos diminuídos são isoleucina, uréia, ácido succínico, ácido fumárico, serina, ácido glutâmico, ácido acetilaspártico, glicerol 1-fosfato, ácido ascórbico, tirosina, ácido cítrico, adenina, hipoxantina, inosina, uracila e treonina. Os resultados parecem indicar que tanto a exposição à maconha na gestação, quanto após a gestação altera o metabolismo.

O ácido glutâmico ou glutamato é o aminoácido com maior concentração no cérebro e atua como neurotransmissor excitatório, participando do metabolismo mitocondrial, sendo sintetizado a partir da glutamina. Atua em receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA-R), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e receptores metabotrópicos. O glutamato atua no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), responsável pela respiração celular (HUDSPITH, 1997; MELDRUM, 2000). Uma reação de transaminação na qual o glutamato é o doador de nitrogênio produz a 3-fosfoserina e o alfa-cetoglutarato. A hidrólise do grupo fosfato origina a serina, que por sua vez, é frequente precursora em outras rotas biossintéticas, como a glicina e cisteína (CAMPBELL; FARRELL, 2011). Treonina está conectada ao metabolismo da glicina e serina para a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada, assim a deficiência deste aminoácido pode estar correlacionada com perturbações nos níveis de glicina, serina e valina (GONZÁLEZ-DOMINGUEZ *et al*., 2014), demonstrado na **Figura 25**. Metabólitos como ureia são marcadores da integridade do sistema nervoso central, a redução ou aumento dos níveis de uréia podem indicar uma anormalidade da homeostasia da amônia no cérebro, que pode ter efeitos deletérios para o sistema nervoso central. Dopamina é um neurotransmissor derivado do aminoácido tirosina, comumente ligado à doença de Parkinson (XUAN *et al*., 2011; GONZÁLEZ-DOMINGUEZ *et al*., 2014). A concentração de tirosina diminui proporcionalmente ao dano celular, como em diferentes tipos de tumores cerebrais, esclerose múltipla, fases crônicas de acidente vascular cerebral (AVC), indicando perda ou disfunção neuronal da região afetada (GRAAF, 2007).

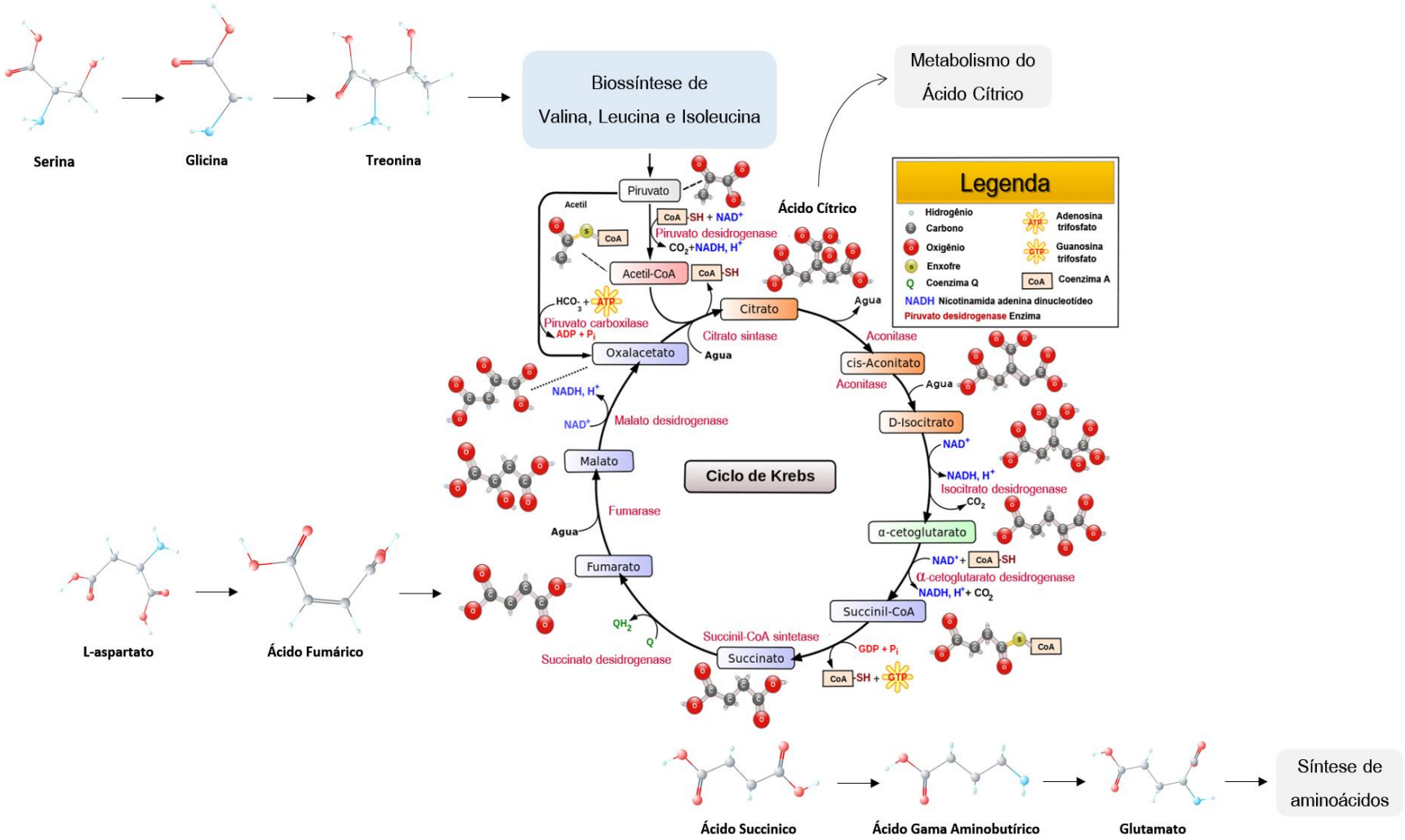


Figura 25. Representação esquemática dos metabólitos significativos envolvidos na via do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), metabolismo do glutamato e síntese de aminoácidos.

O ácido succínico atua tanto no metabolismo do glutamato quanto no TCA (**Figura 25**), além de ser precursor para a produção de ácido fumárico. Nos resultados obtidos, o ácido fumárico está diminuído, sugerindo que a diminuição deste pode estar relacionada com a diminuição de ácido succínico. Pesquisa realizada por Zaitsu *et al*. (2016), após exposição aguda ao canabinóide sintético MAM-2201, revelou diminuição de glutamato cerebral comparado com o grupo controle, resultando na disfunção do metabolismo energético e do sistema nervoso glutamatérgico, houve também diminuição de ácido succínico, corroborando com os achados deste estudo. As alterações do sistema energético induzidos pelos canabinóides sintéticos parecem estar relacionadas com câncer pancreático (DANDO *et al*., 2013).

A interação dos canabinóides endógenos com o receptor CB_1 está criticamente envolvida na maturação do cérebro através do seu papel regulador na liberação de glutamato. Através da sua ação nos receptores CB1, o Δ^9-THC pode interferir com este processo fisiológico normal, resultando na liberação perturbada do glutamato, efeitos neurotóxicos e subsequentes alterações estruturais (BOSSONG; NIESINK, 2010). Também foi relatado que os agonistas de receptores CB1 podem suprimir a liberação de glutamato na fenda sináptica do terminal pré-sináptico (KATONA *et al*., 2001; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006). Hebert-Chatelain *et al.* (2014), mostraram que agonistas de receptores CB1 diminuem a respiração mitocôndrial cerebral.

Ácido acetil aspártico (NAA) é sintetizado a partir do aspartato e acetil-coenzima A nas mitocôndrias, sendo o segundo maior metabólito encontrado no cérebro, desempenhando um papel potencial na produção de energia a partir do aminoácido glutamato nas mitocôndrias neuronais. Durante o desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso central (SNC), a expressão de NAA está aumentada. Uma vez concluída a mielinização pós-natal, o NAA pode continuar a estar envolvido na renovação lipídica da mielina em adultos, mas parece também adotar outros papéis, incluindo um papel bioenergético nas mitocôndrias neuronais. Evidências sugerem que NAA apresenta múltiplos papeis neuronais, como função metabólica neural na mitocôndria, mielinogênese, osmorregulação e sinalização axônio-glial (KREIS *et al*., 2002). Nos resultados apresentados, o NAA está diminuído em relação ao grupo controle. Essa diminuição pode estar associada com neuropatologias e disfunções neuronais ou mitocondriais, como isquemia e danos cerebrais (MOFFETT *et al*., 2007).

Estudo realizado por Prescot *et al*. (2011) por imagem 3D, em cérebros de adolescentes usuários crônicos de *Cannabis*, demonstrou que glutamato e NAA estavam diminuídos em comparação com o grupo controle no córtex anterior do cíngulo, importante região nas funções executivas, que englobam uma série de competências inter-relacionadas e de alto nível de

processamento cognitivo, cujo impacto se reflete em todos os aspectos afetivo-emocionais, motivacionais, comportamentais e sociais (UEHARA; CHARCHAT-FICHMAN; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2013).

O glicerol-3-fosfato é um intermediário químico da via metabólica da glicólise. É um componente de fosfolipídeos, participa da glicólise, que será introduzido na cadeia respiratória. Os resultados indicam que esse metabólito está diminuído, possivelmente contribuindo para a alteração na rota da glicólise e respiração.

Na **Comparação 2** e **Comparação 4** (**Figura 23**), os grupos CS-AF *vs* CS-CS e AF-CS *vs* CS-CS, respectivamente, foram analisados. Observa-se aumento de uréia, GABA, serina, creatinina, ácido ascórbico e ácido cítrico na exposição gestacional e exposição na adolescência.

A creatinina aumentada está relacionada com o aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante do organismo, gerando radicais livres ou espécies reativas não radicais, resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. (BARBOSA *et al*., 2010).

O ácido cítrico aumentado, sugere que o ciclo TCA pode estar alterado, levando à alterações na respiração celular. O ácido ascórbico (AA) é um metabólito encontrado em grandes quantidades no cérebro e está relacionado com o processo antioxidante. No período gestacional, no rato, o teor de AA chega a duplicar, sugerindo sua atuação na diferenciação de células embrionárias, e no aumento da expressão dos genes ligados à neurogênese, à maturação e à neurotransmissão (KRATZING; KRATZING, 1985; JI-YEON *et al*., 2003; LEE *et al*., 2003). Estudos experimentais em ratos descreveram que o AA em altas concentrações pode ser pró-oxidante induzindo a morte celular (GUEDES, 2011). Pelos resultados apresentados, observa-se que o aumento do ácido ascórbico pode estar relacionado com efeitos pró-oxidantes - necessita estudos de quantificação desse metabólito no cérebro, ou com o aumento do estresse oxidativo, sendo este último mais condizente levando em consideração o aumento da creatinina.

O ácido γ-aminobutírico (GABA, do inglês γ-aminobutyric acid) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido na proliferação, migração e promoção da sobrevivência das células. Embora o GABA seja amplamente conhecido por ser o principal neurotransmissor inibitório no cérebro adulto, ele é excitatório na maioria das estruturas cerebrais durante o desenvolvimento inicial (CHERUBINI; GAIARSA; BEN-ARI, 1991), e atua em sinergia com o glutamato no início da vida (McLEAN *et al*.,1996;

LEINEKUGEL *et al*., 2002). GABA está envolvido com estresse oxidativo e desregulação mitocondrial, interferindo no ciclo do TCA.

Uma das limitações do estudo está relacionada com a hipóxia que os animais podem ter sido acometidos com a exposição da *Cannabis*. Tem sido demonstrado que a hipóxia aumenta a concentração de GABA nos tecidos cerebrais, dependendo da gravidade e duração da hipóxia, em geral, considera-se 2 h (WOOD; WATSON; DRUCKER, 1968; IVERSEN; HEDNER; LUNDBERG, 1983). Além disso, a depleção de ATP devido à hipóxia grave causa um aumento nos níveis de GABA no cérebro (MAD; ROYER, 2000; YELMEN, 2004). Neste estudo, a exposição dos animais à *Cannabis* foi por 5 min, dessa forma, provavelmente o aumento de GABA não está relacionado com a hipóxia.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, pode-se observar, que tanto a exposição gestacional à *Cannabis* quanto da prole na fase adolescente, promove alterações metabólicas. Os dados sugerem que o fato de haver somente exposição gestacional ou somente exposição na adolescência, demonstra diminuição dos metabólitos, e quando ocorre exposição tanto na gestação quanto na adolescência, os metabólitos estão aumentados. Isso confirma que a exposição gestacional altera significativamente os metabólitos, e possíveis danos que possam desencadear no cérebro pela exposição à maconha.

Os metabólitos significativamente alterados estão envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico, responsável pela respiração mitocondrial, produção de energia, atuam na biossíntese de aminoácidos, glicólise, estresse oxidativo, podendo alterar o desenvolvimento e maturação do cérebro.

A partir dos dados analisados, os metabólitos que estavam diminuídos na Comparação 1 e 3, podem estar alterados por duas maneiras, a) como eles estão relacionados entre si nas rotas bioquímicas, um metabólito pode ter influenciado na diminuição do outro, por estar em menor quantidade como precursor, ou b) o sistema metabólico realmente está diminuído. Quando analisamos a Comparação 4, os metabólitos estavam aumentados, sugerindo que 1) o sistema metabólico está aumentado, ou c) está ocorrendo alterações metabólicas que podem desencadear um dano cerebral e que por retroalimentação, o sistema está tentando compensar os possíveis danos ou d) a superexposição à *Cannabis* na gestação e após gestação pode estar desencadeando produção aumentada desses metabólitos.

6.1 *Limitações Do Estudo*

- Para melhor compreensão dos dados, seria interessante aplicar os estudos de metabolômica em outras plataformas, como CE-MS e HILIC-MS para obtenção de informações complementares; seria interessante também a análise dirigida dos metabólitos significativos para avaliação da alteração quantitativamente.
- Outra limitação do estudo é que foram realizados experimentos somente em machos, necessitando avaliação da prole fêmea.
- A alteração dos metabólitos pode ter ocorrido devido a hipóxia, dessa forma, seria interessante avaliar essa exposição.

6.2 *Pessoal envolvido na execução do projeto*

Profa. Dra. Mariana Matera Veras, Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Prof. Dr. José Luiz da Costa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Campinas (UNICAMP) – Campinas/SP

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ANVISA**. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AIHUA, Z.; HUI, S.; PING, W.; YING, H.; XIJUN, W. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **The Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293-300, 2011.

ALLWOOD, J. W.; ERBAN, A.; KONING, S.; DUNN, W. B.; LUEDEMANN, A.; LOMMEN, A.; KAY, L.; LÖSCHER, R.; KOPKA, J.; GOODACRE, R. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography-electron impact-time of flight mass spectrometry (GC-EI-TOF/MS). **Metabolomics**, v. 5, n. 4, p. 479-496, 2009.

AMERI, A.; WILHELM, A.; SIMMET, T. Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 8, p. 1831-1839, 1999.

ARANIBAR, N.; VASSALLO, J. D.; RATHMACHER, J.; STRYKER, S.; ZHANG, Y.; DAI, J.; JANOVITZ, E. B.; ROBERTSON, D.; REILY, M.; LEHMAN-MCKEEMAN, L. Identification of 1- and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by NMR-based metabolic profiling. **Analytical Biochemistry**, v. 410, n. 1, p. 84-91, 2011.

ASHTON, C. H. Pharmacology and effects of *Cannabis*: a brief review. The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science, v. 178, n. 2, p. 101-106, 2001.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; REED, J. J.; ZENKEVICH, I. G.; BROWN, R. L.; MALLARD, W. G.; STEIN, S. E. Development of a database of gas chromatography retention properties of organic compounds. **Journal of Chromatography. A.**, v. 1157, v.1-2, p. 414-421, 2007.

BARBAS, C.; MORAES, E. P.; VILLASEÑOR, A. Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 823-831, 2011.

BARBAS, C.; VALLEJO, M.; GARCIA, A.; BARLOW, D.; HANNA-BROWN, A. Capillary electrophoresis as a metabolomic tool in antioxidante therapy studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 2, p. 388-398, 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BATALLA, A.; BHATTACHARYYA, S.; YÜCEL, M.; FUSAR-POLI, P.; CRIPPA, J. A.; NOGUÉ, S.; TORRENS, M.; PUJOL, J.; FARRÉ, M.; MARTIN-SANTOS, R. Structural and functional imaging studies in chronic *Cannabis* users: a systematic review of adolescent and adult finding. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-18, 2013.

BEDAIR, M.; SUMMER, L. W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry,** v. 3, n. 3, p. 238-250, 2008.

BEHRENDS, V.; TREDWELL, G. D.; BUNDY, J. G. A software complements to AMDIS for processing GC-MS metabolomic data. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 206-208, 2011.

BENEVENUTO, S. G.; DOMENICO, M. D.; MARTINS, M. A.; COSTA, N. S.; SOUZA, A. R.; COSTA, J. L.; TAVARES, M. F.; DOLHNIKOFF, M.; VERAS, M. M. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: An experimental study in mice. **Toxicology**, v. 1, n. 376, p. 94-101, 2017.

BESSA, M. A.; MITSUHIRO, S. S.; CHALEM, E.; BARROS, M. M.; GUINSBURG, R.; LARANJEIRA, R. Underreporting fo use of cocaine and marijuana during the third trimester of gestation amog pregnant adolescentes. **Addictive Behaviors**, v. 35, n. 3, p. 266–269, 2010.

BOSSONG, M. G.; NIESINK, R. J. Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of *Cannabis*-induced schizophrenia. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 3, p. 370-85, 2010.

BOSSONG, M. G.; VAN BERCKEL, B. N.; BOELLAARD, R.; ZUURMAN, L.; SCHUIT, R. C.; WINDHORST, A. D.; VAN GERVEN, J. M.; RAMSEY, N. F.; LAMMERTSMA, A. A.; KAHN, R. S. Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 759-766, 2009.

BRETT, K. E.; FERRARO, Z. M.; YOCKELL-LELIEVRE, J.; GRUSLIN, A.; ADAMO, K. B. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 16153-85, 2014.

BRUNET, B.; DOUCET, C.; VENISSE, N.; HAUET, T.; HÉBRARD, W.; PAPET, Y.; MAUCO, G.; MURA, P. Validation of large white pig as animal model for the study of cannabinoids metabolism: application to the study of THC distribution in tissues. **Forensic Science International**, v. 161, n. 2-3, p. 169-174, 2006.

CAMPBELL. M. K.; FARRELL S. O. Em: CAMPBELL. M. K.; FARRELL S. O. **Bioquímica**. 5 Ed., São Paulo: Cengage Learning, 2011. p. 743-776.

CAMPOLONGO, P.; TREZZA, V.; PALMERY, M.; TRABACE, L.; CUOMO, V. Development exposure to cannabinoids causes subtle and enduring neurofunctional alterations. **International Review of Neurobiology**, v. 85, n. 1, p. 117-133, 2009.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CHAN, E. C.; PASIKANTI, K. K.; NICHOLSON, J. K. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography-mass spectrometry. **NatureProtocols**, v. 6, n. 10, p. 1483-1499, 2011.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A G.; GORNI, R. & SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CHERUBINI, E.; GAIARSA, J. L.; BEN-ARI, Y. GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 12, p. 515-519, 1991.

CITTI, C.; BATTISTI, U. M.; BRAGHIROLI, D.; CICCARELLA, G.; SCHMID, M.; VANDELLI, M. A.; CANNAZZA, G. A Metabolomic Approach Applied to a Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Method (HPLC-ESI-HRMS/MS): Towards the Comprehensive Evaluation of the Chemical Composition of *Cannabis* Medicinal Extracts. **Phytochemical Analysis,** v. 29, n. 2, p. 144-155, 2018.

CLARKE, C. J.; HASELDEN, J. N. Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 140-147, 2008.

CLARKE, J.; SEO, P.; CLARKE, B. Statistical expression deconvolution from mixed tissue samples. **Bioinformatics**, v. 26, n. 8, p. 1043–1049, 2010.

COEN, M.; WANT, E. J.; CLAYTON, T. A.; RHODE, C. M.; HONG, Y. S.; KEUN, H. C.; CANTOR, G. H.; METZ, A. L.; ROBERTSON, D. G.; REILY, M. D.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Mechanistic aspects and novel biomarkers of responder and non-responder phenotype in galactosamine-induced hepatitis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 11, p. 5175-5187, 2009.

CREAN, R. D.; CRANE, N. A.; MASON, B. An Evidence-Based Review of Acute and Long-Term Effects of *Cannabis* Use on Executive Cognitive Functions. **Journal of addiction medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2011.

CRIPPA, J. A.; LACERDA, A. L. T.; AMARO, E.; FILHO, G.B.; ZUARDI, A. W.; BRESSAN, R. A. Efeitos cerebrais da maconha – resultados dos estudos de neuroimagem. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, n. 1, p. 70-78, 2005.

DAI, C.; ARCEO, J.; ARNOLD, J.; SREEKUMAR, A.; DOVICHI, N. J.; LI, J.; LITTLEPAGE, L. E. Metabolomics of oncogene-specific metabolic reprogramming during breast cancer. **Cancer & Metabolism**, v. 6, n. 5, 2018.

DAKOVIC, M.; STOJILJKOVIC, A. S.; BAJUK-BOGDANOVIC, D.; STARCEVIC, A.; PUSKAS, L.; FILIPOVIC, B.; USKOKOVIC-MARKOVIC, S.; HOLCLAJTNER-ANTUNOVIC, I. Profiling differences in chemical composition of brain structures using Raman spectroscopy, **Talanta**, v. 117, p. 133-138, 2013.

DANDO, I.; DONADELLI, M.; COSTANZO, C.; DALLA POZZA, E.; D'ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L.; PALMIERI, M. Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 13, n. 4, 2013.

DAVIES, S. N.; PERTWEE, R. G.; RIEDEL, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 8, p. 993-1007, p. 2002.

DAY. N. L.; RICHARDSON, G. A.; GOLDSCHMIDT, L.; ROBLES, N.; TAYLOR, P. M.; STOFFER, D. S.; CORNELIUS, M. D.; GEVA, D. Effect of prenatal marijuana exposure on the cognitive development of offspring at age three. **Neurotoxicoly and Teratology**, v. 16, n. 2, p. 169-175, 1994.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. Metabolomics of Δ9-tetrahydrocannabinol: implications in toxicity. **Drug Metabolism Review**, v. 48, n. 1, p. 80-87, 2016.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 286-294, 2005.

ELLIS, J. E.; BYRD, L. D.; SEXSON, W. R.; PATTERSON-BARNETT, C. A. In utero exposure to cocaine: a review. **Southern Medical Journal**, v. 86, n. 7, p. 725-731, 1993.

UEHARA, E.; CHARCHAT-FICHMAN, H.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Funções executivas: Um retrato integrativo dos principais modelos e teorias desse conceito. **Revista Neuropsicologia Latinoamericana**, v.5, n. 3, p. 25-37, 2013.

EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION (EMCDDA) 2011. Annual report on the state of the drugs problem in Europe. Disponível em: http://www.emcdda.europa.eu/publications/annual-report/2011.

FANG, K.; PAN, X. J.; HUANG, B.; LIU, J. L.; WANG, Y.; GAO, J. P. Progress on keto groups derivatization of steroid hormones in gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 743-751, 2010.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolomic networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Trends in analytical chemistry**, v. 27, n. 3, p. 261–269, 2008.

FIEHN, O.; BARUPAL, D. K.; KIND, T. Extending Biochemical Databases by Metabolomic Surveys.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 23637-23643, 2011.

FINLAY, B. L.; DARLINGTON, R. B.; NICASTRO, N. Development structure in brain evolution. **The Behavioral and Brain Scieces**, v. 24, n. 2, p. 263-278, 2001.

FOWLER, C. J.; ROJO, M. L.; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, A. Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 37-47, 2010.

FRIED PA, WATKINSON B, GRAY R. Differential effects on cognitive functioning in 9- to 12-years olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 20, n.3, p. 293-306, 1998.

FRIED, P. A. Conceptual issues in behavioral teratology and their application in determining long-term sequelae of prenatal marihuana exposure. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines,** v. 43, n. 1, p. 81-102, 2002.

FRIED, P. A.; SMITH, A. M. A literature review of the consequences of prenatal marihuana exposure. An emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2001.

GARCIA, A.; BARBAS, C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 708, n. 1, p. 191-204, 2011.

GARCIA-PEREZ, I.; VALLEJO, M.; GARCÍA, A.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; BARBAS, C. Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography. A.**, v. 1204, n. 2, p. 130-139, 2008.

GOLDSCHMIDT, L.; RICHARDSON, G. A.; CORNELIUS, M. D.; DAY, N. L. Prenatal marijuana and alcohol exposure and academic achievement at age 10. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 4, p. 521-32, 2004.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R.; GARCÍA-BARRERA, T.; VITORICA, J.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 12, p. 2395–2402, 2014.

GONZALEZ-RIANO, C.; GARCIA, A.; BARBAS, C. Metabolomic studies in brain tissue: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, n. 25, p. 141-168, 2016.

GRAAF, R. A. Em: GRAAF, R. A. **In vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques**, 2 Ed., Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 1-42.

GRAAF, R. A.; CHOWDHURY, G. M.; BROWN, P. B.; ROTHMAN, D. L.; BEHAR, K. L. In situ 3D magnetic resonance metabolic imaging of microwave-irradiated rodent brain: a new tool for metabolomics research. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 2, p. 494-501, 2009.

GRAHAM, S. F.; CHEVALLIER, O. P.; ROBERTS, D.; HÖLSCHER, C.; ELLIOTT, C. T.; GREEN, B. D. Investigation of the Human Brain Metabolome to Identify Potential Markers for Early Diagnosis and Therapeutic Targets of Alzheimer's Disease. **Analytical biochemistry**, v. 85, n. 3, p. 1803–1811, 2013.

GRANT, I.; GONZALEZ, R.; CAREY, C. L.; NATARAJAN, L.; WOLFSON, T. Non-acute (residual) neurocognitive effects of *Cannabis* use: A meta-analytic study. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 9, p. 679–689, 2003.

GRAY, K. A.; DAY, N. L.; LEECH, S.; RICHARDSON, G. A. Prenatal marijuana exposure: effect on child depressive symptoms at ten years of age. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, n. 3, p. 439-448, 2005.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 327-360, 2003.

GUEDES, C. K. R. M. **Vitamina C e desenvolvimento cerebral: efeitos sobre a Depressão Alastrante Cortical em ratos jovens em distintos estados nutricionais**. 2011. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Biologicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

GUIDA, M.; SALVATORE, M. M.; SALVATORE, F. A strategy for GC/MS quantification of polar compounds via their silylated surrogates: silylation and quantification of biological amino acids. **Journal of Analitical and Bioanalytical Techniques**, v. 6, n. 5, p. 1-16, 2015.

GUO, B.; CHEN, B.; LIU, A.; ZHU, WEITAO, Z.; SHOUZHUO, Y. Liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based strategies for expanding targeted profiling towards quantitative metabolomics. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 9, p. 1226-1243, 2012.

GUSTAFSON, R. A.; KIM, I.; STOUT, P. r.; KLETTE, K. L.; GEORGE, M. P.; MOOLCHAN, E. T.; LEVINE, B.; HUESTIS, M. A. Urinary pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol after controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol administration. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 28, n. 3p. 160-167, 2004.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in mass spectrometry. 1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, n. 1, p. 1-21, 2003.

HALL, W.; DEGENHARDT, L. Prevalence and correlates of *Cannabis* use in developed and developing countries. **Current opinion in psychiatry**, v. 20, p. 393-397, 2007.

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

HEBERT-CHATELAIN, E.; REGUERO, L.; PUENTE, N.; LUTZ, B.; CHAOULOFF, B. F.; ROSSIGNOL, R.; PIAZZA, P. V.; BENARD, G.; GRANDES, P.; MARSICANO, G, Cannabinoid control of brain bioenergetics: exploring the subcellular localization of the CB1 receptor. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 495-504, 2014.

HEIJNE, W. H.; KIENHUIS, A. S.; VAN OMMEN, B.; STIERUM, R. H.; GROTEN, J. P. System toxicology: applications of toxicogenomics transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. **Expert Review Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 767-780, 2005.

HILL, C. B.; ROESSNER, U. Metabolic Profiling of Plants by GC–MS. Em: Weckwerth, W.; Kahl, G. editores. **The Handbook of Plant Metabolomics**. Weinheim: Wiley-VHC Verlag GmbH e Colaboradores, 2013.

HONGMEI LU, H.; DUNN, W. B.; SHEN, H.; KELL, D. B.; LIANG, Y. Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 215-227, 2008.

HUDSPITH, M. J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **British Journal of Anaesthesia**, v. 78, n. 6, p. 731-47, 1997.

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

HUESTIS, M. A.; MITCHELL, J. M.; CONE, E. J. Urinary excretion profiles of 11-nor-carboxy-Δ9-tetrahydrocannabinol in human after single smoked doses of marijuana. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 441, 452, 1996.

HUIZINK, A. C.; MULDER, E. J. Maternal smoking, drinking or *Cannabis* use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n.1, p. 24-41, 2006.

HUTCHINGS, D. E.; MARTIN, B. R.; GAMAGARIS, Z.; MILLER, N.; FICO, T. Plasma concentrations of deta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. **Life Sciences**, v. 44, n. 11, p. 697-701, 1989.

IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. **Progress in lipid research**, v. 62, p. 107-28, 2016.

IVERSEN, K.; HEDNER, T.; LUNDBERG, P. GABA concentrations and turnover in neonatal rat brain during asphyxia and recovery. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 118, n. 1, p. 91-4, 1983.

IVERSEN, L. *Cannabis* and the brain. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 126, n. 6, p. 1252-1270, 2003.

JAKUBOVIC, A.; HATTORI, T.; MCGEER, P. L. Radioactivity in suckled rats after giving carbon-14-labeled tetrahydrocannabinol to the mother. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 221-223, 1973.

JI-YEON, L.; MI-YOON, C.; CHANG-HWAN, P.; HYE-YOUNG, K.; JIN-HYUK, K.; HYEON, S.; YONG-SUNG, L.; SANG-HUN, L. Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 73, n. 2, p. 156-165, 2003.

JONSSON, P.; GULLBERG, J.; NORDSTRÖM, A.; KUSANO, M.; KOWALCZYK, M.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 1738-1745, 2004.

KASSADA, D. S.; MARCON, S. S.; PAGLIARINI, M. A.; ROSSI, R. M. Prevalência do uso de drogas de abuso por gestantes. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 5, p. 467-471, 2013.

KATONA, I.; RANCZ, E. A.; ACSADY, L.; LEDENT, C.; MACKIE, K.; HAJOS, N.; FREUND, T. F. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. **Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 23, p. 9506-9518, 2001.

KEPPLER, D.; FRÖHLICH, J.; REUTTER, W.; WIELAND, O.; DECKER, K. Changes in uridine necleotides during liver perfusion with D-galactosamine. **FEBS Letters**, v. 4, n. 4, p. 278-280, 1969.

KIND, T.; WOHLGEMUTH, G.; LEE, D. Y.; LU, Y.; PALAZOGLU, M.; SHAHBAZ, S.; FIEHN, O. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038-10048, 2009.

KLASSEN, A.; FACCIO, A. T.; CANUTO, G. A. B.; CRUZ, P. L. R.; RIBEIRO, H. C.; TAVARES, M. F. M.; SUSSULINI, A. Em: SUSSULINI, A. **Metabolomics: from fundamentals to clinical applications**. 1. Ed.; Campinas: Springer, 2017. p. 3-17.

KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; VAN DER GREEF, J.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 307-328, 2011.

KOPKA, J.; SCHAUER, N.; KRUEGER, S.; BIRKEMEYER, C.; USADEL, B.; BERGMÜLLER, E.; DÖRMANN, P.; WECKWERTH, W.; GIBON, Y.; STITT, M.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; STEINHAUSER, D. GMD@CSB.DB: the golm metabolome database. Bioinformatics, v. 21, n. 8, p. 1635-1638, 2005.

KRATZING, C. C.; KELLY, J. D.; KRATZING, J. E. Ascorbic acid in fetal rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1623-4, 1985.

KREIS, R.; HOFMANN, L.; KUHLMANN, B.; BOESCH, C.; BOSSI, E.; HÜPPI, P. S. Brain Metabolite Composition During Early Human Brain Development as Measured by Quantitative In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy. **Magnetic Resonance in Medical Sciences,** v. 48, n. 6, p. 949-58, 2002.

KUCZKOWSKI, K. M. The effects of drug abuse on pregnancy. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 19, n. 6, 578-585, 2007.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a postgenomic era. **Chemical. Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013.

LEE, J. Y.; CHANG, M. Y.; PARK, C. H.; KIM, H. Y.; KIM, J. H.; SON, H.; LEE, Y. S.; LEE, S. H. Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 73, n. 2, p. 156-65, 2003.

LEE, R.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Differential rates of glutathione oxidation for assessment of cellular redox status and antioxidant capacity by capillary electrophoresis-mass spectrometry: an elusive biomarker of oxidative stress. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7047-7056, 2009.

LEINEKUGEL X.; KHAZIPOV, R.; CANNON, R.; HIRASE, H.; BEN-ARI, Y.; BUZSAKI, G. Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. **Science**, v. 96, n. 5575, p. 2049-52, 2002.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical strategies in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 443-58, 2007.

LI, H.; CHEN, B.; SHAO, X.; HU, Z.; DENG, Y.; ZHU, R.; LI, Y.; ZHANG, B.; HOU, J.; DU, C.; ZHAO, Q.; FU, D.; BU, Q.; ZHAO, Y.; CEN, X. 1H-Nuclear magnetic resonance-based metabolomic analysis of brain in mice with nicotine treatment. **BMC Neuroscience**, v. 15, n. 32, 2014.

LICHTMAN, A.H.; POKLIS, J. L.; POKLIS, A.; WILSON, D. M.; MARTIN, B. R. The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 63, n. 2, p. 107-116, 2001.

LINDENBURG, P. W.; TJADEN, U. R.; GREEF, JAN VAN DER.; HANKEMEIER, T. Feasibility of electroextraction as versatile sample preconcentration for fast and sensitive analysis of urine metabolites, demonstrated on acylcarnitines. **Electrophoresis**, v. 33, n. 19-20, p. 2987-2995, 2012.

MACCARRONE, M.; BAB, I.; BIRÓ, T.; CABRAL, G. A.; DEY, S. K.; DI MARZO, V.; KONJE, J. C.; KUNOS, G.; MECHOULAM, R.; PACHER, P.; SHARKEY, K. A.; ZIMMER, A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36, n. 5, p. 277-296, 2015.

MAD, J. E.; ROYER, S. M. Glutamate dependence of GABA levels in neurons of hypoxia and hypoglycemic rat in hippocampal slices. **Neuroscience**, v. 96, n. 4, p. 657-64, 2000.

MALLAT, A.; LOTERSZTAJN, S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. **American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology**, v. 294, n. 1, G9-G12, 2007.

MANNA, S. K.; PATTERSON, A. D.; YANG, Q.; KRAUSZ, K. W.; LI, H.; IDLE, J. R.; FORNACE, A. J.; GONZALEZ, F. J. Identification of noninvasive biomarkers for alcohol-induced liver disease using urinary metabolomics and the Ppara-null mouse. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 4176–4188, 2010.

MAYBORODA, O. A.; NEUSÜSS, C.; PELZING, M.; ZUREK, G.; DERKS, R.; MEULENBELT, I.; KLOPPENBURG, M.; SLAGBOOM, E. P.; DEELDER, A. M. Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, n. 1-2, p. 149-153, 2007.

MAYEUX, R. Biomarkers: potencial uses and limitations. **NeuroRX: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics**, v. 1n. 2, p. 182-188, 2004.

MCGILVERAY, I. J. Pharmacokinetics of cannabinoids. Pain Research and Management, v. 10, suppl. A: 15A-22A, 2005.

MCLEAN, H. A.; CAILLARD, O.; KHAZIPOV, R.; BEN-ARI, Y.; GAIARSA, J. L. Spontaneous release of GABA activates GABAB receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus. **Journal of Neurophysiology**, v. 76, n. 2, p. 1036-46, 1996.

MEATHERALL, R. C.; GARRIOTT, J. C. A sensitive thin-layer chromatographic procedure for the detection of urinary 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. **Journal of analytical toxicology**, v. 12, n. 3, p. 136-40, 1988.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 21-47, 2013.

MEIER, M. H.; CASPI, A.; AMBLER, A.; HARRINGTON, H.; HOUTS, R.; KEEFE, R. S.; MCDONALD, K.; WARD, A.; POULTON, R.; MOFFITT, T. E. Persistent *Cannabis* users show neuropsychological decline from childhood to midlife. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 40, p. 2657-2664, 2012.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 1007S-15S, 2000.

MISHUR, R. J.; REA, S. L. Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: detection of biomarkers of aging and of age-related diseases. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 1, p. 70-95, 2012.

MOFFETT, J. R.; ROSS, B.; ARUN, P.; MADHAVARAO, C. N.; NAMBOODIRI, A. N-acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. **Progress in Neurobiology,** v. 81, n. 2, p. 89-131, 2007.

MONTEIRO, M. S.; CARVALHO, M.; BASTOS, M. L.; PINHO, P. G. Metabolomics analysis for biomarkers discovery: advances and challenges. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 257-271, 2013.

MORAES, E. P.; RUPÉREZ, F. J.; PLAZA, M.; HERRERO, M.; BARBAS, C. Metabolomic assessment with CE-MS of the nutraceutical effect of Cystoseira spp extracts in na animal model. **Electrophoresis**, v. 32, n. 15, p. 2055-2062, 2011.

MOREAU, R L M. Em: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTIZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. Ed., São Paulo: Atheneu, 2014. p.435-446.

NAVARRO, M.; RUBIO, P.; DE FONSECA, F. R. Behavioral consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 122, n. 1, p. 1-11, 1995.

NEWGARD, C. B.; AN, J.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; STEVENS, R. D.; LIEN, L. F.; HAQQ, A. M.; SHAH, S. H.; ARLOTTO, M.; SLENTZ, C. A.; ROCHON, J.; GALLUP, D.; ILKAYEVA, O.; WENNER, B. R.; YANCY, W. S.; EISENSON, H. MUSANTE, G.; SURWIT, R. S.; MILLINGTON, D. S.; BUTLER, M. D.; SVETKEY, L. P. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 311-26, 2009.

NGUYEN, H. P.; SCHUG, K. A. The advantages of ESI-MS detection in cojuntion with HILIC mode separations: fundamentals and applications. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 9, p. 1465-1480, 2008.

NICHOLSON, J. K.; BUCKINGHAM, M. J.; SADLER, P. J. High resolution 1H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. **Biochemical Journal**, v. 211, n. 3, p. 605-615, 1983.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabolomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181-1189, 1999.

ORTIGOSA, S.; FRIGULS, B.; JOYA, X.; MARTINEZ, S.; MARIÑOSO, M. L.; ALAMEDA, F.; VALL, O.; GARCIA-ALGAR, O. Feto-placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 73-79, 2012.

PACHER, P.; MECHOULAM, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 2, p. 193-211, 2011.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

PRESCOT, A. P.; LOCATELLI, A. E.; RENSHAW, P. F.; YURGELUN-TODD, D. A. Neurochemical alterations in adolescent chronic marijuana smokers: a proton MRS study. **Neuroimage**, v. 57, n. 1, p. 69-75, 2011.

PUTRI, S. P.; YAMAMOTO, S.; TSUGAWA, H.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: technological advances. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 9-16, 2013.

RAVER, S. M.; HAUGHWOUT, S. P.; KELLER, A. Adolescent Cannabinoid Exposure Permanently Suppresses Cortical Oscillations in Adult Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 12, p. 2338–2347, 2013

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBERTSON, D. G.; WATKINS, P. B.; REILY, M. D. Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 120, suppl. 1, p. 146-170, 2011.

ROCHA, P. C.; ALVES, M. T. S. S. B.; CHAGAS, D. C.; SILVA, A. A. M.; BATISTA, R. F. L.; SILVA, R. A. Prevalência e fatores associados ao uso de drogas ilícitas em gestantes da coorte BRISA. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 1, p. 1-13, 2016.

ROCHFORT, S. J. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for system biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813-1820, 2005.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; DEL ARCO, I.; BERMUDEZ-SILVA, F. J.; BILBAO, A.; CIPPITELLI, A.; NAVARRO, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol and Alcoholism**, v. 40, n. 1, p. 2-14, 2005.

ROJO, D.; BARBAS, C.; RUPÉREZ, F. J. LC-MS metabolomics of polar compounds. **Bioanalysis**, v. 4, n. 10, p. 1235-1243, 2012.

ROJO, D.; CANUTO, G. A; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F.; BARBAS, C.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; RIVAS, L. A. Multiplatform Metabolomic Approach to the Basis of Antimonial Action and Resistance in Leishmania infantum. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.

ROUX, A.; LISON, D.; JUNOT, C.; HEILIER, J. F. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: a review. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 119-135, 2011.

RUBINGH, C. M.; BIJLSMA, S.; DERKS, E. P.; BOBELDIJK, I.; VERHEIJ, E. R.; KOCHHAR, S.; SMILDE, A. K. Assessing the performance of statistical validation tools for megavariate metabolomics data. **Metabolomics**: **Official Journal of the Metabolomic Society**, v. 2, n. 2, p. 53-61, 2006.

SARIC, J.; WANT, E. J.; DUTHALER, U.; LEWIS, M.; KEISER, J.; SHOCKCOR, J. P.; ROSS, G. A.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TAVARES, M. F. M. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p. 6963-6972, 2012.

SCHNEIDER, M. L.; ROUGHTON, E. C.; KOEHLER, A. J.; LUBACH, G. R. Growth and development following prenatal stress exposure in primates: An examination of ontogenetic vulnerability. **Child Development**, v. 70, n. 2, p. 263-274, 1999.

SCHNEIDER, M. *Cannabis* use in pregnancy and early life and its consequences: animal models. **European Archives of Phychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 259, n. 7, p. 383-393, 2009.

SCHUHMACHER, R.; KRSKA, R.; WECKWERTH, W.; GOODACRE, R. Metabolomics and metabolite profiling. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 15, p. 5003-5004, 2013.

SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M.; WENNING, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1473-1482, 2009.

SHERIF, M.; RADHAKRISHNAN, R.; D'SOUZA, D. C.; RANGANATHAN, M. Human Laboratory Studies on Cannabinoids and Psychosis. **Biological psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 526-38, 2016.

SHINTU, L.; BAUDOIN, R.; NAVRATIL, V.; PROT, J. M.; PONTOIZEAU, C.; DEFERNEZ, M.; BLAISE, B. J.; DOMANGE, C.; PÉRY, A. R.; TOULHOAT, P.; LEGALLAIS, C.; BROCHOT, C.; LECLERC, E.; DUMAS, M. E. Metabolomics-on-a-chip and predictive systems toxicology in microfluidic bioartificial organs. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 1840-1848, 2012.

SILVA, C. A. O consumo de drogas licitas e/ou ilícitas na gestação: repercussões sobre a saúde do recém-nascido. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SOARES, R. Z.; VUOLO, F.; DALL'IGNA, D. M.; MICHELS, M.; CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C.; ZUARDI, A. W.; DAL-PIZZOL, F. Avaliação do papel do sistema canabidiol em um modelo de lesão por isquemia/reperfusão em animais. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 4, p. 383-389, 2015.

SOGA, T.; BARAN, R.; SUEMATSU, M.; UENO, Y.; IKEDA, S.; SAKURAKAWA, T.; KAKAZU, Y.; ISHIKAWA, T.; ROBERT, M.; NISHIOKA, T.; TOMITA, M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 24, p. 16768-76, 2006.

SREEKUMAR, A.; POISSON, L. M.; RAJENDIRAN, T. M.; KHAN, A. P.; CAO, Q.; YU, J.; LAXMAN, B.; MEHRA, R.; LONIGRO, R. J.; LI, Y. et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. **Nature**, v. 457, p. 910–914, 2009.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463-466, 2010.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA). Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health Mental Health Findings. Disponível em: www.oas.samhsa.gov/NSDUH/2k9NSDUH/MH/2k9MHResults.htm.

SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T.; TOMITA, M. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current Bioinformatics**, v. 7, n.1, p. 96-108, 2012.

SUGIMOTO, M.; WONG, D. T.; HIRAYAMA, A.; SOGA, T.; TOMITA. M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic câncer-specific profiles. **Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society**, v. 6, n.1, p. 78-95, 2010.

TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P. E. The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 795-802, 2006.

THEODORIDIS, G. A.; GIKA, H. G.; WANT, E. J.; WILSON, I. D. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 7-16, 2012.

THOMPSON, J. A.; MARKEY, S. P.; FENNESSEY, P. V. Gas-chromatography/mass-spectrometric identification and quantitation of tetronic and deoxytetronic acids in urine from normal adults and neonates. **Clinical Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 1892-1898, 1975.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Cannabinoid and opioid modulation of social play behavior in adolescent rats: differential behavorial mechanisms. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 7, p. 519-530, 2008.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabolomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2p. 469-479. 2007.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). Annual Report 2017. Disponível em: https://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2017/World_Drug_Report_2017.pdf.

URBAN, M.; ENOT, D. P.; DALLMANN, G.; KÖRNER, L.; FORCHER, V.; ENOH, P.; KOAL, T., KELLER, M.; DEIGNER, H. P. Complexity and pitfalls of mass spectrometry-based targeted metabolomics in brain research. **Analytical biochemistry**, v. 406, n. 2, p. 124-31, 2010.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, n. 10, 2006.

VILLAS-BOAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.

VUCKOVIC, D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 6, p. 1523-48, 2012.

WANG, J.; REIJMERS, T.; CHEN, L.; VAN DER HEIJDEN, R.; WANG, M.; PENG, S.; HANKEMEIER, T.; XU, G.; VAN DER GREEF, J. System toxicology study of doxorubicin on rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry based metabolomics. **Metabolomics**, v. 5, n. 4, p. 407-418, 2009.

WANG, X. J.; WANG, H.; ZHANG, A.; LU, X.; SUN, H.; DONG, H.; WANG, P. Metabolomics study on the toxicity of aconite root and its processed products using ultraperformance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and ingenuit pathways analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 2, p. 1284-1301, 2012.

WANG, X.; LI, K.; ADAMS, E.; SCHEPDAEL, A. V. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in metabolomics: the potential for driving drug discovery and development. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 7, p. 807-813, 2013.

WEI, R.; LI, G.; SEYMOUR, A. B. High-throughput and multiplexed LC/MS/MRM method for targeted metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 13, p. 5527-5533, 2010.

WEN, C.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; SUN, F.; MA, J.; HU, L; LIN, G.; WANG, X. Brain metabolomics in rats after administration of ketamine. **Biomedical Chromatography: BMC**, v. 30, n. 1, p. 81-84, 2016.

WHILEY, L.; GODZIEN, J.; RUPEREZ, F. J.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; BARBAS, C. In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 14, p. 5992-5999, 2012.

WIKLUNDS, S.; JOHANSSON, E.; SJÖSTRÖM, L.; MELLEROWICZ, E. J.; EDLUND, U.; SHOCKCOR, J. P.; GOTTFRIES, J.; MORITZ, T.; TRYGG, J. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 115-122, 2008.

WILLIAMS, B. J.; CAMERON, C. J.; WORKMAN, R.; BROECKLING, C. D.; SUMNER, L. W.; SMITH, J. T. Amino acid profiling in plant cell cultures: an inter-laboratory comparison of CE-MS and GC-MS. **Electrophoresis**, v. 28, n. 9, p. 1371-9, 2007.

WILLIAMS, M. D.; REEVES, R.; RESAR, L. S.; HILL, H. H. JR. Metabolomics of colorectal cancer: past and current analytical platforms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 15, p. 5013-5030, 2013.

WILLIAMS, R. J.; BERRY, L. J.; BEERSTECHER, E. JR. Biochemical individuality; genototrophic factors in the etiology of alcoholism. **Archives of Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 275-290, 1949.

WOOD, J. D.; WATSON, W. J.; DRUCKER, A. J. The effect of hypoxia on brain γ-aminobutyric acid levels. **Journal of Neurochemistry**, v.15, n. 7, p. 603-608, 1968.

WU, H.; SOUTHAM, A. D.; HINES, A.; VIANT, M. R. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. **Analytical biochemistry**, v. 372, n. 2, p. 204-12, 2008.

XU, YONG-JIANG.; WANG, C.; HO, W. E.; ONG, C. N. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **Trends in analytical chemistry**, v. 56, p. 37-48, 2014.

XUAN, J.; PAN, G.; QIU, Y.; YANG, L.; SU, M.; LIU, Y.; CHEN, J.; FENG, G.; FANG, Y.; JIA, W.; XING, Q.; HE, L. Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 12, p. 5433-43, 2011.

YANG, L.; XIONG, A.; HE, Y.; WANG, Z.; WANG, C.; WANG, Z.; LI, W.; YANG, L.; HU, Z. Bile acids metabonomic study on the CCl4- and alpha-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 12, p. 2280-8, 2008.

YELMEN, N. K. The role of gamma amino butyric acid and glutamate for hypoxia ventilatory response in anesthetized rabbits. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 219-32, 2004.

YI, L. Z.; HE, J.; LIANG, Y. Z.; YUAN, D. L.; CHAU, F. T. Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA. **FEBS Letters**, v. 580, n. 30, p. 6837-45, 2006.

YUAN, M.; BREITKOPF, S. B.; YANG, X.; ASARA, J. M. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. **Nature Protocols**, v. 7, n. 5, p. 872-881, 2012.

ZAITSU, K.; HAYASHI, Y.; KUSANO, M.; TSUCHIHASHI, H.; ISHII, A. Application of metabolomics to toxicology of drugs of abuse: a mini review of metabolomics approach to acute and chronic toxicity studies. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 31, n. 1, p. 21-26, 2016.

ZAITSU, K.; HAYASHI, Y.; SUZUKI, K.; NAKAYAMA, H.; HATTORI, N.; TAKAHARA, R.;3 KUSANO, M.; TSUCHIHASHI, H.; ISHII, A. Metabolome disruption of the rat cerebrum induced by the acute toxic effects of the synthetic cannabinoid MAM-2201. **Life Sciences**, v. 137, p. 49-55, 2015.

ZHAI, G.; WANG-SATTLER, R.; HART, D. J.; ARDEN, N. K.; HAKIM, A. J.; ILLIG, T.; SPECTOR, T. D. Serum branched-chain amino acid to histidine ratio: a novel metabolomic biomarker of knee osteoarthritis**. Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 1227-31, 2010.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Modern analytical techniques metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293-300, 2012.

ZHANG, X; CHIU, V. M.; TODD, R. P.; SORG, B. A.; HILL, H. H. JR. Neuronal metabolomics by ion mobility mass spectrometry in cocaine self-administering rats after early and late withdrawal. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 16, p. 4233-4245, 2016.

ZHOU, Y. Q.; WANG, Z. J.; JIA, N. Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17alpha-ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 7, p. 879-84, 2007.

ANEXOS