



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PEDRO MATHIAS LOYOLA

TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATO DE *CANNABIS* (THC e CBD) SOBRE
ANFÍPODA (*PARHYALE HAWAIENSIS*) E SUAS IMPLICAÇÕES
ECOTOXICOLÓGICAS

São Vicente

2024

PEDRO MATHIAS LOYOLA

**TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATO DE *CANNABIS* (THC e CBD) SOBRE
ANFÍPODA (*PARHYALE HAWAIIENSIS*) E SUAS IMPLICAÇÕES
ECOTOXICOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha na
Universidade Estadual Paulista, do Campus Litoral
Paulista.

Orientador: Prof Dr Marcos Hikari Toyama

Coorientação: Prof Dr Lucas Buruaem Moreira

São Vicente

202

L923t	Loyola, Pedro Toxicidade Aguda de Extrato de Cannabis (THC e CBD) Sobre Anfípoda (<i>Parhyale Hawaiiensis</i>) e Suas Implicações Ecotoxicológicas / Pedro Loyola. -- São Vicente, 2024 34 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Marcos Hikari Toyama Coorientador: Lucas Buruaem Moreira 1. Biologia. 2. Ecologia. 3. Ecotoxicologia. I. Título.
-------	--

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e à minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional e constante incentivo ao longo de toda esta jornada. Expresso minha profunda gratidão a todos os professores que me guiaram e contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico, em especial ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, cujas orientações foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos membros do BIOMOLPEP pelo companheirismo e troca de conhecimentos e à minha namorada, cuja presença, paciência e companheirismo foram indispensáveis, ouvindo e apoiando todas as etapas de preparação e apresentação deste estudo.

À UNESP - Câmpus do Litoral Paulista pelos cinco anos de graduação, que, mesmo iniciados em circunstâncias adversas, foram enriquecidos pela dedicação e comprometimento de todos os envolvidos. De modo especial, agradeço ao Prof. Dr. Lucas Buruaem, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) –Campus baixada santista, cuja coorientação, paciência e ensinamentos valiosos foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Não poderia deixar de mencionar o colega Igor, cuja colaboração e disposição em ajudar, neste e em outros projetos, foram fundamentais para o sucesso de várias etapas do trabalho.

A todos os colegas que compartilharam essa trajetória acadêmica comigo no campus, tornando estes cinco anos de graduação uma experiência verdadeiramente enriquecedora e prazerosa.

RESUMO

A crescente utilização de compostos derivados da *Cannabis*, como o *Tetrahydrocannabinol* (THC) e o *Canabidiol* (CBD), para fins medicinais e recreativos, aliada a mudanças na legislação em diversos países, têm levantado preocupações sobre a presença desses compostos como poluentes emergentes em ecossistemas aquáticos. Resíduos de THC e CBD têm sido detectados em efluentes de estações de tratamento de esgoto, especialmente em regiões onde o uso da *Cannabis* foi legalizado, devido à sua remoção incompleta nos tratamentos convencionais. Este estudo visa avaliar a toxicidade aguda do THC e do CBD sobre o crustáceo marinho *Parhyale hawaiiensis*, um organismo modelo devido à sua ampla distribuição geográfica, tolerância ambiental, importância ecológica e adequação a testes ecotoxicológicos em laboratório.

Juvenis de *P. Hawaiiensis* foram expostos a diluições seriadas de dois extratos de *Cannabis* contendo como ingredientes principais o THC e CBD em experimentos de toxicidade aguda com duração de 48 horas. No primeiro extrato, as concentrações letais médias (CL_{50} e CL_{20}) foram de 24,49 µg/ml e 6,13 µg/ml, respectivamente. Para o segundo extrato, apenas a CL_{20} foi determinada, sendo de 19,17 µg/ml. Esses resultados preliminares são fundamentais para compreender os possíveis impactos ecológicos da presença de THC e CBD em ecossistemas marinhos e estuarinos, especialmente em áreas costeiras. O estudo fornece subsídios para a gestão ambiental e a formulação de políticas voltadas ao controle de substâncias derivadas da *Cannabis* em ambientes aquáticos.

Palavras-chave: Tetrahydrocannabinol; Canabidiol; poluentes de preocupação emergente; Ecossistemas aquáticos; Ecotoxicidade; Poluição marinha; Crustáceos

ABSTRACT

The increasing utilization of Cannabis-derived compounds, such as *Tetrahydrocannabinol* (THC) and *Cannabidiol* (CBD), for medicinal and recreational purposes, coupled with legislative changes in several countries, has raised concerns about the presence of these compounds as emerging pollutants in aquatic ecosystems. Residues of THC and CBD have been detected in wastewater treatment plant effluents, particularly in regions where Cannabis use has been legalized, due to their incomplete removal by conventional treatment methods. This study aims to assess the acute toxicity of THC and CBD on the marine crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model organism due to its wide geographic distribution, environmental tolerance, ecological importance, and suitability for laboratory-based ecotoxicological tests. Juvenile *P. hawaiiensis* were exposed to serial dilutions of two extracts containing THC and CBD in 48-hour acute toxicity experiments. For the first extract, the median lethal concentrations (LC50 and LC20) were determined to be 24.49 µg/mL and 6.13 µg/mL, respectively. For the second extract, only the LC20 was determined, with a value of 19.17 µg/mL. These preliminary results are critical for understanding the potential ecological impacts of THC and CBD in marine and estuarine ecosystems, especially in coastal areas. The study provides valuable insights for environmental management and policy development aimed at controlling Cannabis-derived substances in aquatic environments.

Keywords: Tetrahydrocannabinol; Cannabidiol; Emerging pollutants; Marine crustacean; Ecotoxicity; Aquatic ecosystem; Marine pollution

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mapa com índice de tratamento de esgoto no Brasil por região segundo censo de 2022. Fonte: “Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento”.	10
Figura 2:Distribuição das diferentes drogas em rios ao redor do mundo (CHEN ET AL 2021.)	14
Figura 3 e 4 : Desenho experimental dos testes de toxicidade aguda com P. hawaiiensis. A = extrato 1(placa marcada em verde; B = Extrato 2 (placa marcada em azul).	19
Tabela 1 :Resultados do teste de Dunnett para os Extratos	20
Gráfico 1: Resultados do teste de toxicidade aguda do extrato 1, taxa de sobrevivência de P. hawaiiensis.	21
Gráfico 2: Resultados do teste de toxicidade aguda do extrato 2, taxa de sobrevivência de P. hawaiiensis. 2	21
Figura 5 : diagrama do sistema circulatório do Parhyale hawaiiensis (DIVAKARAN; PILLAI, 1975)	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

THC	Tetrahydrocannabinol
CBD	Canabidiol
CL50%	Concentração Letal de 50%
CL20%	Concentração Letal de 20%
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Canabidiol e Tetrahydrocannabinol	9
1.2 Organismo modelo	11
1.2.1. Receptores canabinoides em anfípodes	13
1.3 Relevância ecológica da presença de drogas ilícitas em ambientes aquáticos	13
2. Objetivos	15
3. Materiais e método	16
3.1 Obtenção dos extratos.	16
3.2 Obtenção e manejo dos organismos-teste.	17
3.3 Desenho experimental e experimentos de ecotoxicidade.	17
3.4 Análise de resultados	19
4. Resultados e Discussão	19
5. Conclusão	26
6. Referências Bibliográficas	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Canabidiol e Tetrahydrocannabinol*

O Canabidiol (CBD) e o Tetrahydrocannabinol (THC), compostos derivados da Cannabis, têm ganhado destaque significativo no cenário terapêutico global. Estudos recentes indicam um crescimento expressivo no uso medicinal e recreativo desses compostos, impulsionado por mudanças na legislação principalmente em países que tem uma legislação mais abrangente (Williams et al., 2014). O mercado global de cannabis medicinal demonstra uma tendência de expansão, com projeções de crescimento de aproximadamente 20% ao ano entre 2023 e 2030 ("Medical Marijuana Market Size & Share Report", 2023)

Paralelamente ao aumento do uso terapêutico, surgem preocupações ambientais significativas relacionadas ao destino destes compostos após seu uso. As estações de tratamento de esgoto, muitas vezes incapazes de filtrar esses compostos, acabam tendo como resultado o lançamento dessas substâncias tanto como descarte inadequado como quanto metabólito em corpos d'água, como rios, lagos e estuários (Chen et al., 2021).

O tratamento de esgoto desempenha um papel crucial como uma barreira contra a contaminação ambiental por estes compostos. O sistema de lodo Ativado, método amplamente utilizado no tratamento de efluentes, é o que mais demonstra eficiência na remoção de canabinoides sob condições operacionais otimizadas, com sua eficiência sendo de até 98% (Mohan et al., 2021). Contudo, dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (2022) revelam que apenas 56% da

população brasileira tem acesso a esgoto tratado como é demonstrado na Figura 1 que evidencia uma significativa vulnerabilidade ambiental.

Essa deficiência no tratamento de esgoto, aliada ao descarte inadequado de compostos, resulta na presença contínua de CBD, THC, e outros contaminantes nos ambientes aquáticos,(Chen *et al.*,2021.)o que pode ter implicações para os ecossistemas. Dessa forma, é de excepcional importância a realização de estudos para compreender os impactos desses compostos e estabelecer limites de tolerância para sua presença na água.

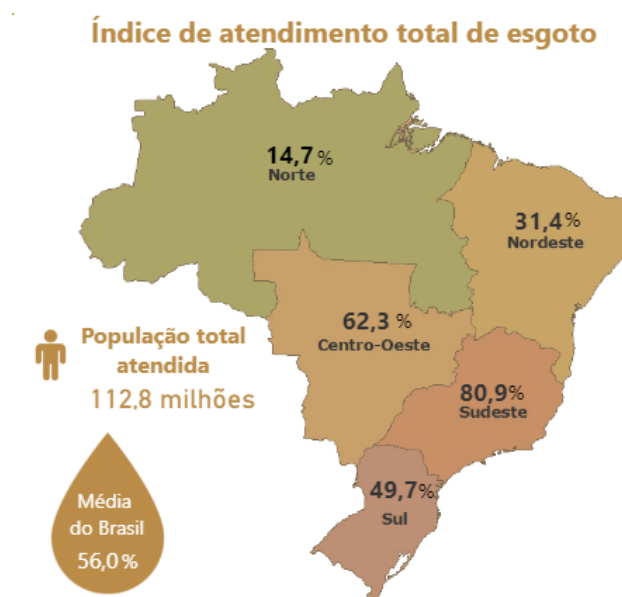


Figura 1: Mapa com índice de tratamento de esgoto no Brasil por região segundo censo de 2022.

Fonte: “Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento”.

A estabilidade química destes compostos representa outro aspecto crucial de seu comportamento ambiental Segundo (Boix *et al.*, 2014,) Os canabinoides demonstram considerável resistência à fotodegradação em condições naturais, com meia-vida variável dependendo das condições ambientais como pH e temperatura. Durante sua degradação, formam-se metabólitos como o THC-COOH dentre outros

que frequentemente apresentam maior persistência que os compostos originais (Apul *et al.*, 2020 e Milan *et al.*, 2022).

Em estações de tratamento, as propriedades físico-químicas dos canabinoides resultam em desafios específicos. A baixa solubilidade limita sua remoção por processos convencionais, havendo uma tendência à adsorção no lodo de esgoto (How *et al.*, 2021). Além disso, durante o processo de cloração, podem formar-se subprodutos potencialmente mais tóxicos que os compostos originais, necessitando de tratamentos avançados como por exemplo os biorreatores com membrana(Luiz, 2008) para remoção efetiva (Boix *et al.*, 2014)

A mobilidade ambiental destes compostos é fortemente influenciada por seu alto potencial de sorção em solos ($K_d > 1000 \text{ L/kg}$) e baixa volatilidade (Pressão de Vapor $< 10^{-6} \text{ mmHg}$ a 25°C). Como resultado, apresentam limitada lixiviação para águas subterrâneas, sendo seu transporte principalmente associado a partículas em suspensão (How *et al.*, 2021; e Garau *et al.*, 2024). Estas características afetam diretamente sua distribuição e persistência nos diferentes compartimentos ambientais.

1.2 Organismo modelo

O crustáceo *Parhyale hawaiensis* (Dana, 1853) é um anfípode marinho (PERACARIDA, AMPHIPODA, HYALIDAE) comumente conhecidos como "*beach-hoppers*", "*sand-hoppers*" ou "*sand-fleas*". Esses anfípodes possuem uma distribuição cosmopolita, sendo encontrados em diversas regiões costeiras ao redor do mundo (Shoemaker, 1956). Eles habitam regiões intermareais, como baías, estuários e manguezais, preferindo ambientes rochosos e locais com presença de macroalgas (Barnard, 1965).

Esses crustáceos são altamente tolerantes a variações ambientais, podendo suportar salinidades de 5 a 40, e temperaturas que variam entre 18°C e 30°C (Boutet e Schierwater, 2021). Em ecossistemas como manguezais, sua densidade populacional pode chegar a 7.000 indivíduos por metro quadrado, desempenhando

um papel essencial na cadeia trófica e na reciclagem de nutrientes (Poovachiranon; Boto; Duke, 1986).

Nos últimos anos, *P. hawaiiensis* ganhou destaque como modelo em estudos ecotoxicológicos, graças às suas características ecológicas e comportamentais. Sendo um detritívoro e herbívoro, contribui para a regulação da vegetação aquática, como as ervas marinhas (também conhecidas como *Seagrass*) (Ritter; Bourne, 2024). Com seu hábito epibentônico, *P. hawaiiensis* é frequentemente exposto a contaminantes em fases líquidas como microplásticos (Nunes *et al.*, 2023) e metais, tanto na coluna d'água quanto nos sedimentos (Avelar, *et al.*, 2000).

Entre as características que tornam *P. hawaiiensis* particularmente atrativo como modelo experimental, destaca-se seu ciclo de vida relativamente curto, com desenvolvimento direto e reprodução contínua ao longo do ano. Em condições laboratoriais controladas, as fêmeas podem produzir proles a cada duas semanas, gerando aproximadamente 20-25 embriões por ciclo reprodutivo (Vargas-Alúndez *et al.*, 2021 e Murat *et al.*, 2022). Esta alta fecundidade, combinada com a facilidade de manutenção em laboratório, permite a obtenção constante de material biológico para experimentação, similar à eficiência logística observada em biotérios de camundongos (Murat *et al.*, 2022).

Uma característica notável que diferencia *P. hawaiiensis* de outros modelos é a transparência de seus embriões, permitindo a observação detalhada do desenvolvimento embrionário in vivo. Esta propriedade, aliada ao desenvolvimento externo dos embriões, facilita estudos de biologia do desenvolvimento e manipulações experimentais precoces (Rehm *et al.*, 2009). Ademais, avanços significativos em técnicas de manipulação genética foram estabelecidos para esta espécie, incluindo transgênese, RNA de interferência e edição gênica via CRISPR-Cas9 (Martin *et al.*, 2016).

Em termos fisiológicos, *P. hawaiiensis* possui um ciclo de vida relativamente curto, com duração média de 6 a 15 meses, e desenvolvimento direto. As fêmeas carregam os ovos em uma bolsa, permitindo a observação de efeitos embrionários durante a incubação, o que facilita estudos de toxicidade em fases iniciais de

desenvolvimento (Paris *et al.*, 2022). Sua reprodução controlada em laboratório e maturidade sexual em aproximadamente seis semanas tornam possível a realização de testes ecotoxicológicos agudos (exposições de 48 horas) como também transgeracionais (Santos *et al.*, 2022).

Outro aspecto relevante para o uso desse organismo como modelo é sua capacidade de regenerar apêndices, o que permite investigações sobre a relação entre contaminação ambiental e processos regenerativos (Sun; Patel, 2019). Assim, devido às suas características, *P. hawaiiensis* destaca-se como um organismo modelo promissor para estudos de toxicidade em ambientes aquáticos (Vacchi; Santos; *et al.*, 2019).

1.2.1. Receptores canabinoides em anfípodes

Os receptores canabinoides, particularmente CB1 e CB2, são bem caracterizados em vertebrados, onde constituem componentes essenciais do sistema endocanabinoide, mediando respostas a compostos como CBD e THC. Estes receptores regulam funções fisiológicas cruciais, incluindo nocicepção, apetite e respostas imunológicas (Mechoulam *et al.*, 2014; Di Marzo *et al.*, 2015).

Em invertebrados, a compreensão dos sistemas endocanabinoides permanece limitada. Enquanto alguns estudos identificaram componentes do sistema endocanabinoide em certos grupos de invertebrados, como moluscos e nematoides (Elphick & Egertová, 2001; McPartland *et al.*, 2006), investigações específicas em crustáceos, particularmente anfípodes, são escassas.

Análises genômicas e moleculares em crustáceos não identificaram receptores homólogos aos CB1 e CB2 de vertebrados (Christie *et al.*, 2015). O genoma sequenciado de *Parhyale hawaiiensis*, um anfípode modelo, também não revelou sequências claramente identificáveis como receptores canabinoides típicos (Kao *et al.*, 2016). Entretanto, alguns estudos sugerem a existência de sistemas de

sinalização alternativos que poderiam interagir com canabinoides em invertebrados (Elphick, 2012).

1.3 Relevância ecológica da presença de drogas ilícitas em ambientes aquáticos

Devido à sua sensibilidade a contaminantes ambientais e facilidade de cultivo, *P. hawaiiensis* tem sido utilizado em estudos ecotoxicológicos para avaliar os efeitos de poluentes em ecossistemas marinhos.(Artal *et al.*, 2019). Essa aplicação é complementar aos estudos realizados em camundongos, os quais normalmente focam em toxicologia humana.

O presente estudo aborda a presença de drogas ilícitas em um contexto de ambientes costeiros, em função da característica da possível acumulação desses contaminantes, principalmente em regiões estuarinas e baías já que sua taxa de reposição de água é mais baixa podendo em regiões como o estuário de São Vicente, demorar cerca de 2 semanas para toda a troca dessa água, (Roversi; Rosman; Harari, 2016) fazendo com que esses compostos, tenham mais tempo para se dissolver ou reagir com outros compostos que podem auxiliar a solubiliza-lo em água como alguns hidrocarbonetos (Reynolds; Prasad, 1982), aumentando o seu tempo de permanência no ecossistema. No contexto da baixada santista, temos registro dessa contaminação por drogas ilícitas como a cocaína e o seu metabólito benzoilecgonina (Fontes *et al.* 2019), demonstrando que essas substâncias mesmo em concentrações ambientais ($0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$) , acabam desempenhando uma disrupção no metabolismo de algumas animais como aumento de dopamina e alteração na acetilcolinesterase (Fontes *et al* 2022).

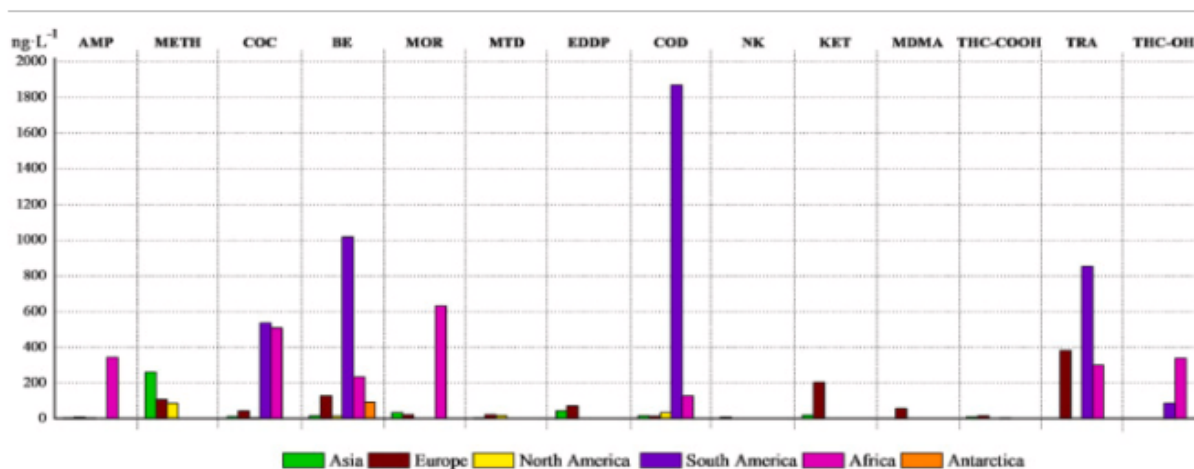


Figura 2: Distribuição das diferentes drogas em rios ao redor do mundo (Chen et al., 2021.)

A Figura 2 destaca a presença de drogas ilícitas em bacias hídricas e em suas concentrações, por mais que essas concentrações ainda se mantenham baixas, essa crescente tendência do uso da cannabis de maneira tanto medicinais quanto recreativa, associada com o fato de que os seus efeitos em organismos aquáticos não totalmente conhecidos, podendo induzir efeitos significativos como estresse oxidativo em algumas espécies como no mexilhão zebra (*Dreissena polymorpha*) (Parolini et al., 2016.). Por mais que o THC acabe se metabolizando em THC-COOH, ambas as moléculas têm uma toxicidade semelhante, tendo como principal diferença os efeitos psicoativos do THC em animais que tenham os receptores específicos (Stella et al., 2022). Em relação às propriedades, a volatilidade do THC em água é baixa, tendendo se adsorver em sólidos suspensos e sedimentos, podendo resultar em concentrações maiores nesse compartimento destino (Child; Tallon, 2022). Ambas as moléculas possuem um LogP estimado por volta de 6,4 fazendo com que elas tendem a se acumular em lipídios pela afinidade a ele (*PubChem*, “Cannabidiol”) além de ter fatores de bioconcentração superiores a 1.

Sobre a toxicidade do THC, deformidades de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) foram observadas em exposições de fase líquida, reportaram na faixa de 0,3-5 µg/ml (Carty; Thornton; Gledhill; Willett, 2017), além do potencial

transgeracional de alterar alguns fatores como quantidade de ovos (Carty *et al.*, 2019). Estes resultados indicam que os canabinoides possam ser considerados compostos de preocupação emergente, se tornando cada vez maior interesse em análises dos seus impactos.

Nesse contexto, a hipótese deste trabalho é a de que extratos de cannabis contendo THC e CBD podem induzir efeitos tóxicos em organismos marinhos, manifestados em termos de toxicidade aguda. Com isso, a justificativa é de que substâncias derivadas da cannabis são poluentes ambientalmente relevantes para os ecossistemas costeiros, num contexto da sua crescente ocorrência ambiental, resultado da legalização e consumo.

2. Objetivos

O objetivo principal do trabalho é determinar os efeitos tóxicos da *cannabis* em organismos marinhos. Como objetivo específico, o estudo visa determinar preliminarmente a toxicidade aguda de dois extratos contendo diferentes concentrações de THC e CBD sobre o anfípodo marinho *P. hawaiiensis*.

3. Materiais e método

3.1 Obtenção dos extratos

Os extratos de canabinoides utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Instituto Adesaf, uma organização da sociedade civil (OSC) certificada pelo Governo Federal como Entidade Beneficente de Assistência Social (Cebas) para ações no âmbito da criação de uma Comissão para implantação das diretrizes da “*Política Municipal de Fornecimento Gratuito de Medicamentos Formulados Vegetal à Base de canabidiol*” da prefeitura de Santos. Os extratos foram catalogados em diferentes concentrações de acordo com as especificações do fornecedor. Esses compostos foram armazenados no BIOMOLPEP, localizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Litoral Paulista. O armazenamento ocorreu em armários, longe da presença direta do sol, a uma temperatura aproximada de 22°C. A pureza dos compostos foi comercialmente garantida pelo Instituto Adesaf. Após o recebimento, os compostos foram separados em tubos Eppendorf em doses de cerca de 2 ml e colocados em uma caixa apropriada para esse tipo de armazenamento. A caixa foi selada com fita adesiva para evitar contaminação. Posteriormente, os compostos foram transportados para a UNIFESP, Campus Baixada Santista, no Edifício Acadêmico IV.

Foram utilizados dois extratos de óleos canabinoides: o primeiro extrato contendo 60 mg/mL de THC (extrato 1) e 5,5 mg/mL de CBD e o segundo (extrato 2) contendo 30 mg/mL de THC e 3,7 mg/mL de CBD. ambos os extratos foram escolhidos pois eram os que tinham a maior quantidade dos compostos de interesse nos quais tínhamos disponibilidade

3.2 Obtenção e manejo dos organismos-teste

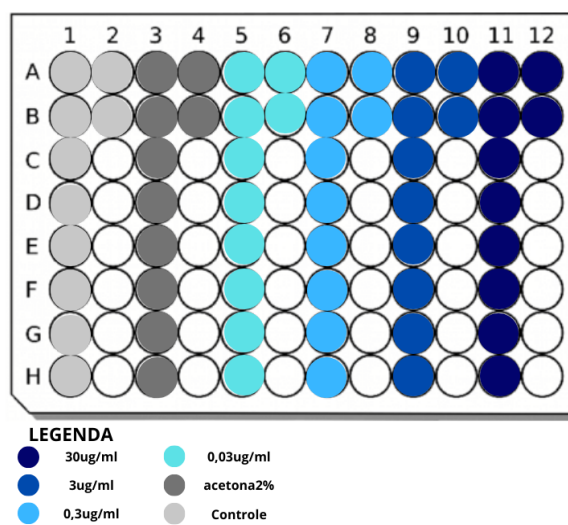
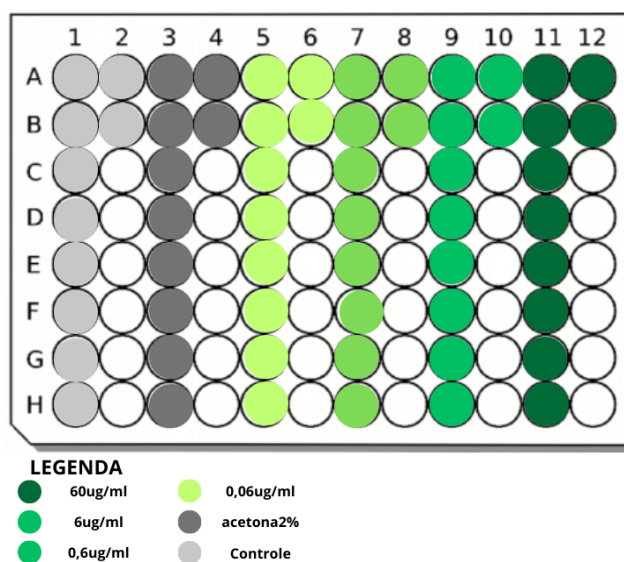
Os animais, coletados em na região de fital de costões rochosos do Litoral de

São Paulo (Itanhaém), são cultivados em laboratório desde 2023, em recipientes de plástico de 5 litros com 1 cm de substrato e 2l de água salgada com salinidade 30 ± 2 , e densidade populacional de até 7000 indivíduos por metro quadrado. Os cultivos são mantidos em condições controladas de aeração (constante; 6 ± 2 mg/L de oxigênio dissolvido), iluminação (12:12; claro:escuro) e temperatura (24 ± 2 °C) e pH de 8 ± 1 a 9 ± 2 . A alimentação é feita com ração comercial para peixes ou matéria vegetal, em quantidades específicas para adultos e neonatos (2 pellets por matriz). A troca de água parcial (50%) é realizada duas vezes por semana, com troca total feita uma vez por mês (Artal *et al.*, 2017).

3.3 Desenho experimental e experimentos de ecotoxicidade

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de maneira estática, ou seja, mantendo a concentração dos compostos sem a troca do meio de exposição, por um período de 48 horas. Para isso, foram utilizados animais juvenis em uma microplaca de 96 poços, com 10 animais por concentração, abrangendo pelo menos quatro diluições seriadas diferentes (fator de diluição de 10x). Para o extrato 1, (contendo 60 mg/mL de THC e 5.5mg/ml de CBD) e o extrato 2 (30 mg/ml de THC e 3,7 mg/ml de CBD) ambos foram diluídos 100x, resultando em soluções estoque (10 µL em 10 mL). Em seguida, as diluições seriadas foram estabelecidas nas concentrações para o extrato 1 (60 µg/mL, 6 µg/mL, 0,6 µg/mL e 0,06 µg/mL) e extrato 2 (30 µg/ml, 3 µg/m, 0,3 µg/m e 0,03 µg/m). Os testes também incluíram controles para o solvente e controle neutro, sendo que o controle solvente utilizou 2% de acetona (Artal *et al.*, 2019). Os testes foram realizados em tréplicas (n=3), totalizando 30 indivíduos por concentração.

A



B

Figuras 3 e 4 : Desenho experimental dos testes de toxicidade aguda com *P. hawaiiensis*. A = extrato 1(placa marcada em verde; B = Extrato 2 (placa marcada em azul).

3.4 Análise de resultados

Os resultados de mortalidade foram expressos em % e analisados quanto a

distribuição em homogeneidade de variâncias. Em seguida, as respostas dos diferentes tratamentos (diluições dos extratos) foram comparadas com as respostas dos respectivos controles através do teste t de Student para determinação da maior diluição testada que não causa efeito letal (CENO), e similarmente, a maior diluição que causa efeitos tóxicos (CEO). Para fins de comparação da toxicidade dos dois extratos, foram determinadas as concentrações letais a 20% e 50% dos organismos testados a 48h (CL₂₀ e CL₅₀, respectivamente). Nesse caso, as diluições nominais foram transformadas em log10 para posterior análise de regressão não linear. As análises foram feitas no programa estatístico *Graphpad Prism*.

4. Resultados e Discussão

Os resultados dos testes de toxicidade com os extratos 1 e 2 são apresentados na tabela 1 e nas figuras de 1 a 4. Podemos observar a partir de esses resultados que apenas os tratamentos da menor diluição apresentaram uma diferença significativa dos efeitos tóxicos (mortalidade) em comparação ao grupo controle. As comparações dos controles com os respectivos solventes (acetona) não apresentaram diferenças significativas, indicando que a presença da acetona para diluição dos extratos não afetou os efeitos observados.

A partir desses resultados, a concentração com efeito observado (CEO) foi determinada a partir de 60 µg/ml para o Extrato 1, e 30 µg/ml para o extrato 2. Sendo assim, para os extratos 1 e 2, os valores de CENO foram (6 µg/ml e 3 µg/ml, respectivamente). Por fim, foram estimadas as CL₅₀ e CL₂₀ para o Extrato 1 (2449µg/ml e 6,13 µg/ml, respectivamente), e apenas a CL₂₀ para o Extrato 2 (19,17µg/ml). No entanto, foi possível uma comparação a partir dos valores de CL₂₀, indicando que o extrato 1 é mais tóxico relativamente.

Comparação	Diferença Média	q	P. Valor	P Significativo?
------------	-----------------	---	----------	------------------

Extrato 1				
Controle x acetona	3,33	0,48	0,98	Não
Controle x 0.06	-13,33	1,92	0,25	Não
Controle x 0,6	-13,33	1,922	0,25	Não
Controle x 6	-6,66	0,96	0,79	Não
Controle x 60	83,33	12,01	<0,001	Sim
Extrato 2			9	
Controle x acetona	0,00	0,00	0,9999	Não
controle x0.03	3,33	0,52	0,97	Não
Controle x 0,3	3,33	0,52	0,97	Não
Controle x 3	0,00	0,00	0,99,	Não
Controle x 30	20,00	3,133	0.033	Sim

Tabela 1 :Resultados do teste de Dunnett para os Extratos

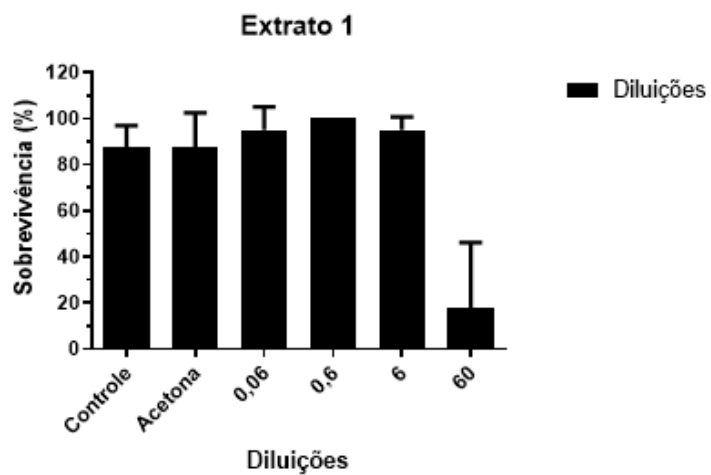


Gráfico 1: Resultados do teste de toxicidade aguda do extrato 1, taxa de sobrevivência de *P. hawaiiensis*.

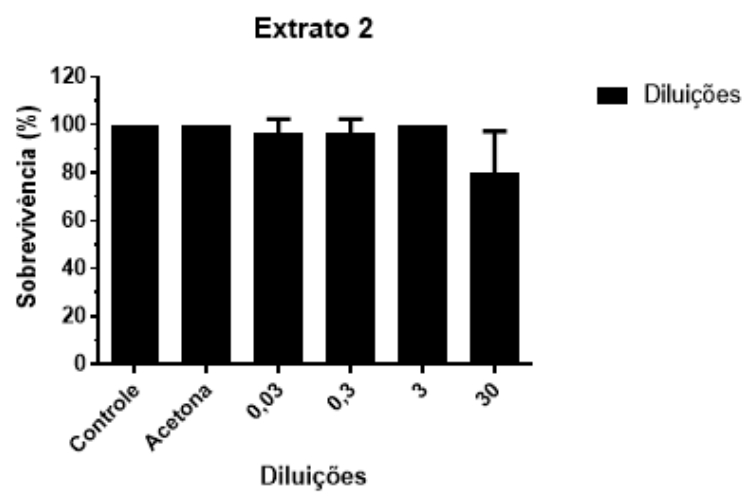


Gráfico 2: Resultados do teste de toxicidade aguda do extrato 2, taxa de sobrevivência de *P. hawaiiensis*.

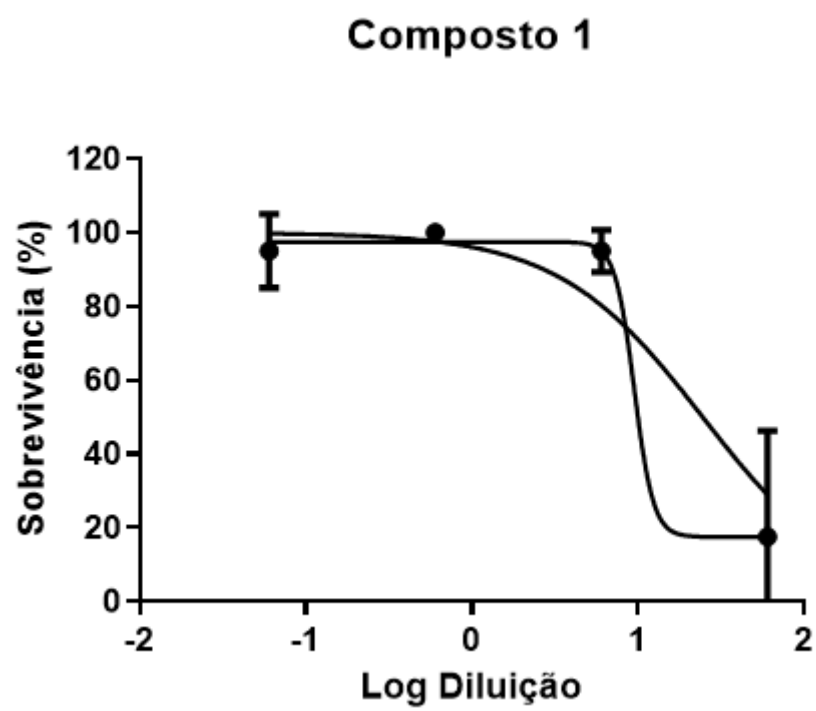


Gráfico 3: curva de sobrevivência do composto 1 com 2 curvas de regressão.

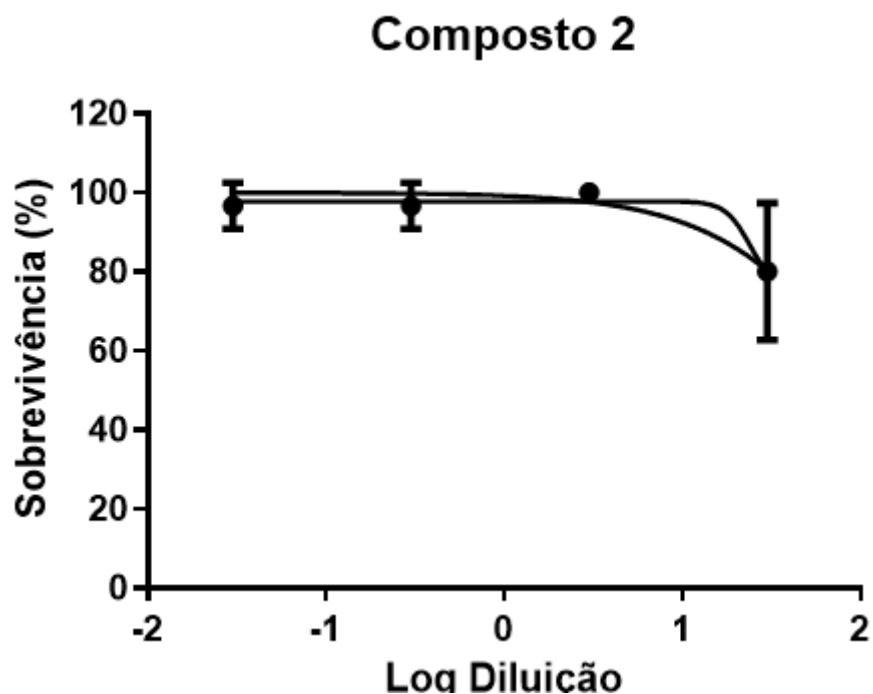


Gráfico 4: curva de sobrevivência do composto 1 com 2 curvas de regressão.

Os resultados de CL_{50} e CL_{20} indicam que, embora esses compostos causem efeitos agudos em *P. hawaiiensis*, as concentrações associadas a tais efeitos são superiores às concentrações ambientalmente relevantes em alguns rios e estuários monitorados, indicando baixo risco para essa espécie nessas condições. Por exemplo, em alguns rios da África, as concentrações totais de THC e THC-COOH chegam a apenas 0,0002 $\mu\text{g/mL}$ (CHEN *ET AL.*, 2021). Baixas concentrações também foram detectadas na costa da Espanha em plantas de tratamento de esgoto de Barcelona que em torno de 0,000016 $\mu\text{g/mL}$ (López-García *et al.*, 2021).

Contudo, é importante considerar que a ausência de efeito agudo se aplica somente à mortalidade, o que não exclui a possibilidade de efeitos crônicos nas mesmas condições experimentais. Ambos os compostos, THC e CBD, também estão associados a efeitos subletais, como o estresse oxidativo, que pode impactar a saúde dos organismos a longo prazo (PAROLINI *ET AL.*, 2016). Outro fator crucial que podemos ter como um possível resultado da presença do THC é a alteração na mobilidade como efeito adverso conhecidamente causado pelos canabinoides (Guitirrez *et al.*, 2021), sendo a hipolocomoção que é característica como parâmetro não mensurado no presente trabalho. Ainda, efeitos sobre a reprodução e gametogênese também foram reportados, já que ambos os compostos (THC e CBD) podem modificar a maturação de oócitos (Totorikaguena *et al.*, 2019).

Em relação ao mecanismo de ação, por mais que não exista até o momento informações sobre a presença de receptores específicos (CB1 ou CB2) em invertebrados (Elphick; Egertová, 2009), outros receptores podem desempenhar essa função mediação, fazendo com que os organismos tenham um metabolismo e um efeito adverso análogo ao reportado para os diferentes grupos. Como exemplo de efeitos não relacionados diretamente a seus receptores específicos, pode ser citado a alteração celular do funcionamento do canal de cálcio em neurônios (Bernarroch, 2014).

Por fim, em relação a resposta letal, um dos possíveis motivos das respostas dos animais é a interação do THC com os canais de cálcio, principalmente os de tipo N que são presentes em células do sistema nervoso (Mackie; Hillie, 1992), alterados a curto prazo de tempo de exposição. Logo, com uma possível inibição desses canais, que pode ocasionar problemas cardíacos em humanos por exemplo, pode comprometer a circulação e o metabolismo energético dos anfípodos, já que a espécie não possui sistema vascular completo, mas o seu funcionamento bioquímico e intracelular dos canais de cálcio é um mecanismo basal (Verkhratsky; Parpura, 2014), o que sugere um potencial efeito de canal de cálcio é um mecanismo basal levando a mortalidade (Wirkner; Richter, 2007). Ainda, o CBD

5. Conclusão

Apesar de apenas analisarmos mortalidade, os resultados do presente estudo permite concluir, mesmo que de forma preliminar, que os extratos de canabinoides testados apresentam toxicidade aguda ao *P. hawaiiensis*, porém, e até o presente, as concentrações testadas não apresentam risco para espécie num contexto de concentrações ambientalmente relevantes. Como perspectivas futuras, estudos de toxicidade crônica e de mecanismos específicos são necessários para avaliar de forma sistêmica os efeitos desses extratos nesse e em outros organismos.

6. Referências Bibliográficas

- ARTAL, M.C., dos Santos, A., Henry, T.B., Umbuzeiro, G.A., 2018. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. *Ecotoxicology* 27, 103–108. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1875-3>.
- APUL, Onur G.; ROWLES, Lewis Stetson; KHALID, Arsalan; KARANFIL, Tanju; RICHARDSON, Susan D.; SALEH, Navid B.. Transformation potential of cannabinoids during their passage through engineered water treatment systems: a perspective. *Environment International*, [S.L.], v. 137, p. 105586, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2020.105586>
- AVELAR, W. E. P., et al. "The Marine Mussel *Perna Perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an Indicator of Contamination by Heavy Metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil." *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 118, no. 1/2, 2000, pp. 65–72, <https://doi.org/10.1023/a:1005109801683> . Accessed 29 Oct. 2024.
- BARNARD, Jerry Laurens. Gammaridean amphipoda of the rocky intertidal of California: Monterey Bay to La Jolla. *Bulletin of the United States National Museum*, 1969.
- BENARROCH, Eduardo E.. Synaptic effects of cannabinoids. **Neurology**, [S.L.], v. 83, n. 21, p. 1958-1967, 18 nov. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000001013>.
- BOIX, Clara; IBÁÑEZ, María; BIJLSMA, Lubertus; SANCHO, Juan V.; HERNÁNDEZ, Félix. Investigation of cannabis biomarkers and transformation products in waters by liquid chromatography coupled to time of flight and triple quadrupole mass spectrometry. *Chemosphere*, [S.L.], v. 99, p. 64-71, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.007>
- Boutet, Agnes, and Bernd Schierwater. *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology*. CRC Press, 26 Nov. 2021.
- CARTY, Dennis R; THORNTON, Cammi; GLEDHILL, James H; WILLETT, Kristine L. Developmental Effects of Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 162, n. 1, p. 137-145, 2 nov. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfx232>.
- CARTY, Dennis R.; MILLER, Zachary S.; THORNTON, Cammi; PANDELIDES, Zacharias; KUTCHMA, Marisa L.; WILLETT, Kristine L.. Multigenerational consequences of early-life cannabinoid exposure in zebrafish. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 364, p. 133-143, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2018.12.021>.

- CASTIGLIONI, Sara, et al. "Illicit Drugs in the Environment." *Wiley*, 18 Jan. 2011, <https://doi.org/10.1002/9781118000816>. Accessed 13 July 2023.
- CHEN, Like; GUO, Changsheng; SUN, Zhenyu; XU, Jian. Occurrence, bioaccumulation and toxicological effect of drugs of abuse in aquatic ecosystem: a review. **Environmental Research**, [S.L.], v. 200, p. 111362, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2021.111362>.
- CHILD, Robert B.; TALLON, Mark J.. Cannabidiol (CBD) Dosing: plasma pharmacokinetics and effects on accumulation in skeletal muscle, liver and adipose tissue. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 2101, 18 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu14102101>
- CHRISTIE, Andrew E.. Expansion of the neuropeptidome of the globally invasive marine crab *Carcinus maenas*. *General And Comparative Endocrinology*, [S.L.], v. 235, p. 150-169, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.05.013>.
- DIVAKARAN, O.; PILLAI, N. Krishna. The Vascular System of *Parhyale hawaiiensis*(Amphipoda). *Acta Zoologica*, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 129-139, jun. 1975. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6395.1975.tb00088.x>.
- ELPHICK, Maurice R.; EGERTOVÁ, Michaela. Cannabinoid Receptor Genetics and Evolution. **The Receptors**, [S.L.], p. 123-149, 2009. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-503-9_5.
- ELPHICK, Maurice R.; EGERTOVA, Michaela. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences*, [S.L.], v. 356, n. 1407, p. 381-408, 29 mar. 2001. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2000.0787>.
- ELPHICK, Maurice R.. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 367, n. 1607, p. 3201-3215, 5 dez. 2012. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0394>.
- FLORES, Leandro Ebling; ZAMIN, Lauren Lúcia. Potencial neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório do Canabidiol: relevância e perspectivas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 224, 27 out. 2017. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v16i2.20568>.
- FONTES, Mayana Karoline; CAMPOS, Bruno Galvão de; CORTEZ, Fernando Sanzi; PUSCEDDU, Fabio Hermes; MORENO, Beatriz Barbosa; MARANHO, Luciane Alves; LEBRE, Daniel Temponi;
- GUIMARÃES, Luciana Lopes; PEREIRA, Camilo Dias Seabra. Seasonal monitoring of cocaine and benzoylecgonine in a subtropical coastal zone (Santos Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 149, p. 110545, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110545>.

- GUTIERREZ, Arnold; CREEHAN, Kevin M.; TURNER, Mitchell L.; TRAN, Rachelle N.; KERR, Tony M.; NGUYEN, Jacques D.; TAFTE, Michael A.. Vapor exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) slows locomotion of the Maine lobster (*Homarus americanus*). **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [S.L.], v. 207, p. 173222, ago. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173222>.
- KAO, Daniel et al. The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. *eLife*, v. 5, e20062, 2016. DOI: 10.7554/eLife.20062. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.20062>. Acesso em: 27 nov. 2024.
- HARDING, Erika K.; SOUZA, Ivana A.; GANDINI, Maria A.; GADOTTI, Vinícius M.; ALI, Md Yousof; HUANG, Sun; ANTUNES, Flavia T. T.; TRANG, Tuan; ZAMPONI, Gerald W.. Differential regulation of Cav3.2 and Cav2.2 calcium channels by CB1 receptors and cannabidiol. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 180, n. 12, p. 1616-1633, 7 fev. 2023. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/bph.16035>.
- HOW, Zuo Tong, and Mohamed Gamal El-Din. "A Critical Review on the Detection, Occurrence, Fate, Toxicity, and Removal of Cannabinoids in the Water System and the Environment." *Environmental Pollution*, vol. 268, Jan. 2021, p. 115642, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115642>.
- HUNT, Benjamin James. Advancing molecular crustacean chronobiology through the characterisation of the circadian clock in two malacostracan species, *Euphausia superba* and *Parhyale hawaiiensis*. Diss. University of Leicester, 2016.
- LÓPEZ-GARCÍA, Ester; MASTROIANNI, Nicola; PONSÀ-BORAU, Núria; BARCELÓ, Damià; POSTIGO, Cristina; ALDA, Miren López de. Drugs of abuse and their metabolites in river sediments: analysis, occurrence in four spanish river basins and environmental risk assessment. *Journal Of Hazardous Materials*, [S.L.], v. 401, p. 123312, jan. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123312>
- LUIZ, Tambosi, José. "Remoção de Fármacos E Avaliação de Seus Produtos de Degradação Através de Tecnologias Avançadas de Tratamento." *Repositorio Institucional UFSC*, 2008, repositorio.ufsc.br/handle/123456789/90956.
- MACKIE, K; HILLE, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 89, n. 9, p. 3825-3829, maio 1992. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.9.3825>.
- ARTAL, Mariana Coletty et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale Hawaiiensis*. *Ecotoxicology*, v. 27, n. 2, p. 103-108, 15 nov. 2017. DOI: 10.1007/s10646-017-1875-3. Arnaud; SERANO, Julia M.; JARVIS, Erin; BRUCE, Heather S.; WANG,

- Jennifer; RAY, Shagnik; BARKER, Carryn A.; O'CONNELL, Liam C.; PATEL, Nipam H.. CRISPR/Cas9 Mutagenesis Reveals Versatile Roles of Hox Genes in Crustacean Limb Specification and Evolution. *Current Biology*, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 14-26, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.021>.
- MARZO, Vincenzo di; STELLA, Nephi; ZIMMER, Andreas. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature Reviews Neuroscience*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 30-42, 19 dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3876>.
- MAZZARA, Eugenia; SPINOZZI, Eleonora; MAGGI, Filippo; PETRELLI, Riccardo; FIORINI, Dennis; SCORTICHINI, Serena; PERINELLI, Diego Romano; BONACUCINA, Giulia; RICCIARDI, Renato; PAVELA, Roman. Hemp (*Cannabis sativa* cv. Kompolti) essential oil and its nanoemulsion: prospects for insecticide development and impact on non-target microcrustaceans. *Industrial Crops And Products*, [S.L.], v. 203, p. 117161, nov. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117161>.
- MCPARTLAND, John M.; MATIAS, Isabel; MARZO, Vincenzo di; GLASS, Michelle. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*, [S.L.], v. 370, p. 64-74, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2005.11.004>.
- Medical Marijuana Market Size & Share Report, 2030. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/medical-marijuana-market>PUC
- MECHOULAM, Raphael; HANUŁ, Lumír O.; PERTWEE, Roger; HOWLETT, Allyn C.. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 757-764, 15 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3811>.
- MILAN, Simone; LELARIO, Filomena; SCRANO, Laura; OTTATI, Chiara; BUFO, Sabino Aurelio; ALPENDURADA, Maria de Fátima. Detection of Eight Cannabinoids and One Tracer in Wastewater and River Water by SPE-UPLC–ESI-MS/MS. *Water*, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 588, 15 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/w14040588>.
- Mohan, Harsh. "Ecotoxicity, Occurrence, and Removal of Pharmaceuticals and Illicit Drugs from Aquatic Systems." *Biointerface Research in Applied Chemistry*, vol. 11, no. 5, 30 Jan. 2021, pp. 12530–12546, <https://doi.org/10.33263/briac115.1253012546>.
- NBR 15638: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos.
- NUNES, Beatriz Zachello; HUANG, Yuyue; RIBEIRO, Victor Vasques; WU, Siqi; HOLBECH, Henrik; MOREIRA, Lucas Buruaem; XU, Elvis Genbo; CASTRO, Italo B.. Microplastic contamination in

- seawater across global marine protected areas boundaries. *Environmental Pollution*, [S.L.], v. 316, p. 120692, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120692>.
- Özengin, Nihan, and Ayse Elmaci. "Removal of Pharmaceutical Products in a Constructed Wetland." *Iranian Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 4, 28 Dec. 2016, pp. 221–229, <https://doi.org/10.15171/ijb.1223>. Accessed 9 Jan. 2021.
- PARIS, M. et al. The crustacean model *Parhyale hawaiiensis*. *Current topics in developmental biology/Current Topics in Developmental Biology*, p. 199–230, 1 jan. 2022.
- Parolini, Marco, et al. "Increase in Cannabis Use May Indirectly Affect the Health Status of a Freshwater Species." *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 36, no. 2, 5 Oct. 2016, pp. 472–479, <https://doi.org/10.1002/etc.3575>. Accessed 15 Feb. 2020.
- PÉREZ-ACEVEDO, Ana; BUSARDÒ, Francesco; PACIFICI, Roberta; MANNOCCHI, Giulio; GOTTARDI, Massimo; POYATOS, Lourdes; PAPASEIT, Esther; PÉREZ-MAÑÁ, Clara; MARTIN, Soraya; TRANA, Annagiulia di. Disposition of Cannabidiol Metabolites in Serum and Urine from Healthy Individuals Treated with Pharmaceutical Preparations of Medical Cannabis. *Pharmaceuticals*, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 459, 12 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph13120459>.
- POOVACHIRANON, S.; BOTO, K.; DUKE, N.. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, [S.L.], v. 98, n. 1-2, p. 129-140, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90078-x](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(86)90078-x).
- BCHEM. Cannabidiol. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/644019#section=Absorption-Distribution-and-Excretion>>. Acesso em: 11 out. 2024.
- REYNOLDS, J. E. F.; PRASAD, A. B. (Ed.). *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. 28. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1982. p. 353.
- REHM, E. Jay; HANNIBAL, Roberta L.; CHAW, R. Crystal; VARGAS-VILA, Mario A.; PATEL, Nipam H. The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: a new model for arthropod development. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2009, p. pdb.emo114, 2009. DOI: 10.1101/pdb.emo114. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.emo114>. Acesso em: 27 nov. 2024.
- RITTER, Carmen J.; BOURNE, David G.. Marine amphipods as integral members of global ocean ecosystems. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, [S.L.], v. 572, p. 151985, mar. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2023.151985>.
- ROVERSI, Fernando; ROSMAN, Paulo Cesar Colonna; HARARI, Joseph. Análise da renovação das águas do Sistema Estuarino de Santos usando modelagem computacional. **Ambiente e Água - An**

- Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 566, 23 jun. 2016. Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrograficas (IPABHi). <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1770>.
- SANDOVAL, Alline Corrêia; FERNANDES, Dione Rodrigues; SILVA, Ederson Aparecido da; TERRA JÚNIOR, André Tomaz. O uso indiscriminado dos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES). *Revista Científica Faema*, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 165, 15 dez. 2017. *Revista FAEMA*. <http://dx.doi.org/10.31072/rcf.v8i2.589>.
- SANTOS, Amanda dos; BOTELHO, Marina Tenório; VANNUCI-SILVA, Monizze; ARTAL, Mariana Coletty; VACCHI, Francine I.; MAGALHÃES, Gabriel Rampazzo; GOMES, Vicente; HENRY, Theodore Burdick; UMBUZEIRO, Gisela de Aragão. The amphipod *Parhyale hawaiiensis* as a promising model in ecotoxicology. **Chemosphere**, [S.L.], v. 307, p. 135959, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135959>.
- SANTOS, F. R.; SOUZA, A. L.; FERREIRA, P. M. et al. *Contribution of wastewater to DBP formation. Science of the Total Environment*, [S.L.], v. 745, p. 140856, 2020. Disponível em: <https://asu.elsevierpure.com/en/publications/contribution-of-wastewater-to-dbp-formation>. Acesso em: 7 nov. 2024.
- SHOEMAKER, Clarence R.. Observations on the Amphipod Genus *Parhyale*. **Proceedings Of The United States National Museum**, [S.L.], v. 106, n. 3372, p. 345-358, 1956. Smithsonian Institution. <http://dx.doi.org/10.5479/si.00963801.106-3372.345>.
- SINISA." Ministério Das Cidades, 2023, www.gov.br/cidades/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/saneamento/sinisa.
- Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento. Ministério Das Cidades, www.gov.br/cidades/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/saneamento/snis/painel.
- Stella, Nephi. "THC and CBD: Similarities and Differences between Siblings." *Neuron*, vol. 111, no. 3, Jan. 2023, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.022>.
- Sun, Dennis A., and Nipam H. Patel. "The Amphipod Crustacean *Parhyale Hawaiiensis*: An Emerging Comparative Model of Arthropod Development, Evolution, and Regeneration." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, vol. 8, no. 5, 1 Sept. 2019, p. e355, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31183976/, <https://doi.org/10.1002/wdev.355>.
- TOTORIKAGUENAA, Lide et al . Tetrahydrocannabinol Modulates in Vitro Maturation of Oocytes and Improves the Blastocyst Rates after in Vitro Fertilization. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 439-452, 23 ago. 2019. Cell Physiol Biochem Press GmbH and Co KG. <http://dx.doi.org/10.33594/000000149>.

- VACCHI, Francine I.; SANTOS, Amanda dos; ARTAL, Mariana C.; MAGALHÃES, Gabriel R.; VENDEMIATTI, Josiane A. de Souza; UMBUZEIRO, Gisela de Aragão. *Parhyale hawaiiensis* as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 149, p. 110658, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110658>.
- Vargas-Abúndez et al. "Marine Amphipods (*Parhyale Hawaiiensis*) as an Alternative Feed for the Lined Seahorse (*Hippocampus Erectus*, Perri 1810): Nutritional Value and Feeding Trial." *PeerJ*, vol. 9, 19 Oct. 2021, pp. e12288–e12288, <https://doi.org/10.7717/peerj.12288>. Accessed 2 Jan. 2024.
- VEJA. "Em Um Ano, Mercado de Cannabis Medicinal Dobra No Brasil." *VEJA*, 7 Nov. 2023, veja.abril.com.br/coluna/cannabiz/em-um-ano-mercado-de-cannabis-medicinal-dobra-no-brasil. Accessed 17 Oct. 2024.
- VERKHRATSKY, Alexei; PARPURA, Vladimir. Calcium signalling and calcium channels: evolution and general principles. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 739, p. 1-3, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.013>.
- WILLIAMS, Jenny; BRETTEVILLE-JENSEN, Anne Line. Does liberalizing cannabis laws increase cannabis use? **Journal Of Health Economics**, [S.L.], v. 36, p. 20-32, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhealeco.2014.03.006>.
- Wirkner, Christian S., and Stefan Richter. "Comparative Analysis of the Circulatory System in Amphipoda (Malacostraca, Crustacea)." *Acta Zoologica*, vol. 88, no. 2, 6 Apr. 2007, pp. 159–171, <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00279.x>.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: PEDRO MATHIAS LOYOLA

Título: "Avaliação da toxicidade aguda de diferentes óleos de canabidiol sobre o *Parhyale hawaiiensis*"

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama	AP
Profa. Dra. Alessandra da Silva Augusto	Aprovado

PARECER:

O discente apresentou um bom trabalho com metodologia adequada e resultados inéditos. Também respondeu a todos os perguntas com propriedade e clareza. Somar de parecer favorável a obra aprovada.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que o discente **Pedro Mathias Loyola** obteve o seguinte conceito:



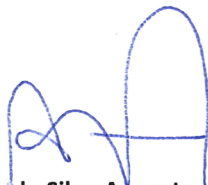
APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 11 de dezembro de 2024.


Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama


Profa. Dra. Alessandra da Silva Augusto