

EFEITO NA MORFOGÊNESE EMBRIONÁRIA DO *Aedes aegypti* ORIUNDA DA *Cannabis sativa* L. (Moraceae)

Data de aceite: 02/10/2023

Suelice Guedes da Silva Brito

Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-0617-703X>

Tainá Maria Santos da Silva

Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-8142-1995>

Paloma Lys de Medeiros

Departamento de Histologia e Embriologia - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-9517-1416>

Antônio Fernando de Oliveira

Departamento de Botânica - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

Sônia Pereira Leite

Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-0634-9734>

RESUMO: As arboviroses ainda são um problema de saúde pública, e o principal vetor é o *Aedes aegypti*. A *Cannabis sativa* L. (Moraceae) é uma planta que apresenta grande potencial terapêutico, apesar de suas propriedades psicotrópicas. A proposta deste estudo foi análise fitoquímica dos Canabinoides e observar durante na morfogênese embrionária os aspectos morfológicos das larvas de *Aedes Aegypti* oriunda da *Cannabis Sativa*. As análises físico-químicas foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e o bioensaio com extrato metanólico de inflorescências da *Cannabis sativa* L (EMICs), em diferentes concentrações (250, 500, 750 e 1000 µg/mL) foram observadas as alterações morfológicas nas larvas do 4º estágio (L4) em montagem total do mosquito *A. Aegypti*. Os resultados por CCD do EMICs foi detectada a presença de: Flavonoides, Cumarina, Terpenos, Fenol e ausência de Alcaloides e Saponina. As observações das larvas controle de *A. aegypti* apresentaram aspecto morfológico externo alongado e vermiforme. As que foram tratadas com o EMICs apresentaram aspecto morfológico externo semelhante ao das larvas controle, porém, após 72 horas de tratamento foi observado que as larvas

do estágio L4 expulsaram do tubo digestório para o meio externo, a membrana peritrofica contendo o alimento. Neste trabalho, a matriz peritrófica das larvas tratadas apresentou-se menos espessa do que a das larvas controle. Isso se deve ao fato de que a extrusão desta membrana foi um fato marcante neste trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: *Aedes aegypti*, *Cannabis sativa* L., Embriotoxicidade, ovos, Larvas.

1 | INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus é um vetor e promove a disseminação de quatro sorotipos de vírus da dengue. No entanto, uma diminuição no controle efetivo do vetor tem sido descrita devido a tolerância das larvas. De acordo com a origem embrionária e função fisiológica do *A. aegypti*, o trato digestivo é dividido em três regiões principais: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (GODOY 2015). Na grande maioria dos insetos, as células do intestino médio produzem uma matriz extracelular denominada matriz peritrófica (MP), que consiste em uma estrutura saculiforme composta por microfibrilas de quitina, com várias proteínas que suprem a MP são denominadas peritrofinas e precursores de quitina são secretados por células digestivas do intestino médio, e a MP se organiza por intercalação de fibrilas de quitina e peritrofinas (HEGEDUS *et al*, 2009). Plantas foram avaliadas como fonte de inseticidas naturais de *A. aegypti* e ensaios larvicidas foram conduzidos usando terceiro (L3) e quarto (L4) estágio ou comparando o efeito de extrato vegetal de plantas no desenvolvimento larval de L1 – L4 (MURUGAN; NOORTHEEN 2007)

Vários estudos abordaram a possibilidade de usar a técnica de cultura de embriões como um ensaio para o potencial atóxico embrionário de compostos xenobióticos (ARROIO *et al* 2004). Leite *et al* (2004) em seus estudos com embriotoxicidade *in vitro* demonstrou o potencial de baixo nível de toxicidade de plantas medicinais. Ensaio embriotóxico utilizando extrato aquoso de folhas *Indigofera suffruticosa* demonstrou inibição na eclosão de ovos e ecdise das larvas do mosquito A planta apresenta baixo nível de toxicidade, com viabilidade de 98% das larvas de *A. aegypti* (VIEIRA *et al*, 2012). O efeito do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* na fase larval (L4) não interfere no desenvolvimento do tamanho dos órgãos reprodutores como testículo e glândulas acessórias do *A. Aegypti*. (SILVA *et al*, 2018).

A *Cannabis sativa* L. (Figura 1) é um arbusto da família Moraceae, conhecido pelo nome de “cânhamo da Índia”, que cresce livremente em várias partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais e temperadas. É uma planta dióica, pois tem espécimes masculinos e femininos (Mechoulam, 1973). A potencialidade medicinal da *Cannabis* está ligada ao grande número de substâncias químicas que já foi encontrado em amostras desta planta, sendo a principal classe a dos canabinóides. O termo canabinóides foi atribuído ao grupo de compostos com 21 átomos de carbono presentes na *C. sativa* L. , além dos respectivos ácidos carboxílicos, análogos e possíveis produtos de transformação. Os compostos canabinóides podem ser classificados como terpenofenóis e não foram

isolados de qualquer outra espécie vegetal ou animal (Mechoulam, 1973). Segundo Pereira (2019), a análise fitoquímica de extratos hidroalcoólicos da *C. sativa* L. revelou a presença de terpenos, compostos fenólicos e, em particular, os canabinóides. Atualmente vem se desenvolvendo vários estudos com o uso da *C. sativa* L. na terapêutica de várias patologias no campo da medicina e também na medicina veterinária para o controle da dor neuropática inflamatória e osteoartrite em animais com foco em felinos e caninos. No entanto é de suma importância a busca por novos meios de tratamento e sabendo da diversidade terapêutica de uma única planta é primordial que exploremos todo seu potencial. (PRADO *et al.*, 2021). Considerando que o material biológico é de fácil manuseio e o processo de execução da embriotóxicidade é rápido e eficaz. A proposta deste estudo foi análise fitoquímica dos Canabinóides e observar durante na morfogênese embrionária os aspectos morfológicos das larvas de *Aedes Aegypti* frente a *Cannabis Sativa*.



Figura 1- *Cannabis sativa* L.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e autenticação – O material vegetal (A Inflorescências da *Cannabis sativa* L.) foi coletado na associação de *Cannabis* medicinal sob a responsabilidade do HABEAS CORPUS CRIMINAL (0816688-22.2021.4.05.8300), no período de julho de 2022 na cidade de Paulista, Estado de Pernambuco, Brasil. A amostra autenticada pela Bióloga Marlene Barbosa do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) encontra-se catalogada sob o número 89.911 no Herbário do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

Mosquitos - Ovos de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller, foram cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artropodes e Vetores (LAFICAVE) da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro. Os ovos desses mosquitos foram contados usando um microscópio estereoscópio. As lavas geradas foram alimentadas com ração comercial de gatos. As larvas de 1º estágio foram usadas no experimento.

Preparação do Extrato. As inflorescências da *Cannabis sativa L.* (800g) foram lavadas em água corrente, colocados em estufa de fluxo de ar forçado a 40°C para secagem. Posteriormente foram trituradas e pesadas. Em seguida, o produto foi realizado uma maceração com metanol a temperatura ambiente. O material vegetal foi extraído com metanol por 48h em temperatura ambiente. Após a maceração o filtrado foi recolhido e concentrado em evaporador rotativo. O extrato bruto metanólico (*EMICs*) obtido foi transferido para placas de vidro e dessecado em uma capela de exaustão, com o auxílio de jato de ar quente até a completa evaporação do solvente e, posteriormente, armazenado em dessecador até a utilização nos testes de embriotoxicidade. Utilizou-se concentração máxima de 1000 µg/mL. Para tanto, foi feita pesagem de 0,04g do extrato em balança analítica de precisão e, em seguida, foi dissolvido em 400 mL de água destilada. A concentração foi, posteriormente, diluída em concentrações menores de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL. Essas soluções foram colocadas em frascos de 25 mL e em cada frasco foram colocadas 20 larvas para o experimento, foram utilizadas larvas de primeiro estágio, imediatamente após as eclosões dos ovos (Vieira *et al* 2012).

Cromatografia de camada delgada (CCD). Cerca de 15g da inflorescência da *Cannabis sativa L.* foram trituradas e submetidas à infusão com 3ml de metanol (70%) sob agitação durante 30 minutos. O extrato da inflorescência da *C. sativa L.* obtidos por infusão passou por filtração, simples em papel de filtro e posteriormente, analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados (WANER *et al* 1984). Foi investigada a presença de alcaloides, flavonoides, cumarina, terpenos, saponina e Fenol.

Ensaio da Embriotoxicidade. O *Aedes aegypti*, cujo nome popular é mosquito da dengue, pertence ao Arthropoda Filo, Classe Hexapoda, Ordem Diptera e família Culicidae. O efeito do extrato metanólico da *EMICs* sobre o desenvolvimento larval, foi testado como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (PITTET; DIDIER *et al*, 2009). As larvas foram expostas ao extrato em concentrações 250, 500, 750 e 1000 µg/ml. O bioensaio foi realizado com larvas (n = 20), 1º estágio em triplicata para cada concentração e grupos controle com água destilada. As larvas foram colocadas em recipientes plásticos de 100mL contendo 50mL da solução teste e incubados a 27°C. As fases de desenvolvimento das larvas foram observadas durante o todo o processo a partir de 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h com o auxílio de microscópio DM500 acoplado com câmera ICC50W (Leica[®]).

Estudo morfológico das larvas do *A. aegypti*. As larvas do mosquito do *A. aegypti* grupo controle e exposto ao *EMICs* foram fixados com formaldeído (2,5%), após completa fixação, foi desidratada em série de etanóis em concentrações crescentes (70 a 100%) para avaliação morfológica, a captura das imagens das preparações histológicas foram realizadas utilizando uma câmera digital DM500 conectada a um microscópio DM500. (ampliação de 40x e 100x).

3 | RESULTADO

Análise fitoquímica

O resultado da Cromatografia em camada delgada (CCD) a partir de extrato metanólico da inflorescência da *C. sativa* L. está detalhado na tabela 2. O Extrato foi investigado com base técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) e caracterização que revela a ausência e presença das classes de compostos químicos. No extrato metanólico foi detectado a presença de: Flavonoides, Cumarina, Terpenos, Fenol e ausência de Alcaloides e Saponina.

Material testado	Rendimento (mg)	Testes positivos	Testes negativos
Extrato metanólico Por infusão	3.90mg	Flavonoides, Cumarina, Terpenos e Fenol	Alcaloides e Saponina.

Tabela 1 – Cromatografia em camada delgada (CCD) do Extrato Metanólico da inflorescência de *Cannabis sativa* L.

Estudo Morfológico de Larvas de *A. aegypti*

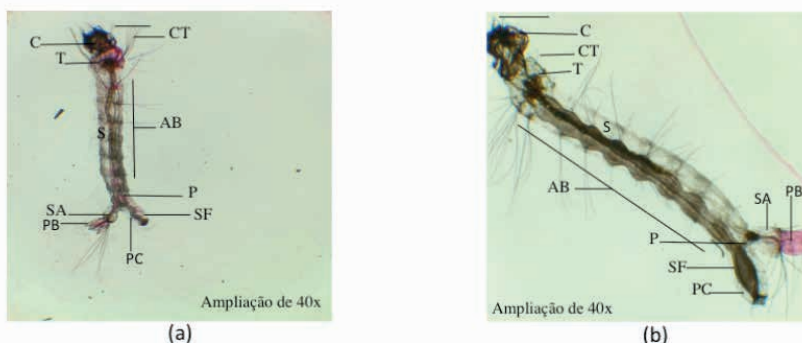


Figura 2- Aspecto morfológico de larvas de *A. aegypti* na concentração de 1000 µg/mL após o período de 72 horas de incubação. (a) Controle L4 (b) L4 tratada em extrato metanólico de *Cannabis sativa* L. (A) Antena; (AB) Abdome; (C) Cabeça; (CT) Cerdas do tórax; (T) Tórax; (S) Seguintos; (P) Ponte; (SA) Seguimento anal; (SF) sifão; (PB) Pólipos branquiais; (PC) Pectem. - Membrana peritrofica (seta) (40x).

Descrição Morfológica de Larvas de *A. Aegypti* L4 vivas controle em água destilada (Figura 2 (a)) e L4 vivas tratadas em extrato metanólico de inflorescência de *C. Sativa* (EMICs) (Figura 2(b)) após 72 h de incubação foram avaliadas usando microscopia óptica invertida. A Figura 2 (a; b) mostram os aspectos morfológicos das larvas de Culicidae é formado por três regiões distintas, denominadas de anterior, mediana e posterior: região anterior a cabeça foi identificado a antenas (A), o tórax um segmento mais amplo com cerdas; a mediana o abdômen constituído de 8 segmentos em cada segmento apresentado cerdas, região posterior e possível observar o Seguimento anal; (SF) sifão; (PB) Pólipos

branquiais; (PC) Pectem das larvas. Foi possível observar um aumento do desenvolvimento embrionário das larvas de acordo com as diferentes concentrações em relação ao controle com água destilada com aparência um pouco reduzida. Contudo as larvas expostas ao controle com Temephos não apresentaram forma viáveis com 100% de mortalidade.

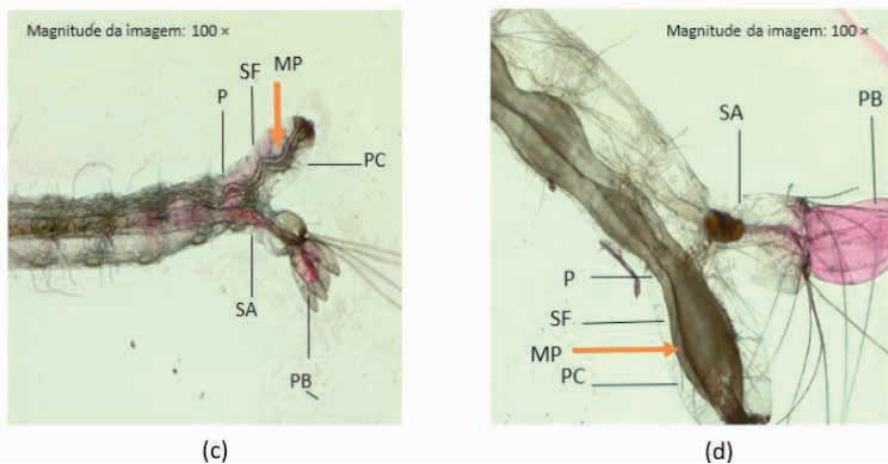


Figura 3 - Aspecto morfológico do intestino posterior da larva de *Aedes aegypti* na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ após o período de 72 horas de incubação. (c) Controle L4 (d) L4 tratada em EMICs (P) Ponte; (SA) Seguimento anal; (SF) sifão; (PB) Pólipos branquiais; (PC) Pectem. - (MP) Membrana peritrofica (seta) (100x)

O aspecto morfológico do intestino posterior das larvas controle de *A. aegypti* apresentaram aspecto morfológico externo alongado e vermiforme (Figura 3 (c)). As que foram tratadas com o *EMICs* apresentaram aspecto morfológico externo semelhante ao das larvas controle, porém, após 72 horas de tratamento foi observada na região posterior do seguimento anal (SF) que as larvas do estágio L4 expulsaram do tubo digestório para o meio externo, a membrana peritrofica (MP) contendo o alimento (Figura 3 (d)). A observação morfológica da região posterior do intestino no seguimento anal (SF) de larvas de *A. aegypti* em desenvolvimento embrionário tratadas com *EMICs* (Fig. 3 (d)) mostrou continuidade na estrutura do envelope peritrofico (PE), resultando epitélio subjacente delgado, aumento do lúmen intestinal e segmentos com aspecto hipertrofico em comparação com as larvas controle.

As alterações no desenvolvimento estão diretamente dependentes de mudanças morfológicas que ocorrem quando as larvas estão crescendo em contato com diferentes substâncias de extrato.

4 | DISCUSSÃO

O uso medicinal da *Cannabis* hoje é permitido em alguns estados americanos e em países como Holanda e Bélgica, para aliviar sintomas relacionados ao tratamento de câncer,

AIDS, esclerose múltipla e síndrome de Tourette (que causa movimentos involuntários) (ROBSON 2001; IVERSEN, 2003). No Brasil, o uso medicinal da *Cannabis sativa L.* ou de seus derivados ainda é limitado. Em 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) liberou o uso medicinal de CBD após análise de diversos estudos clínicos, os quais demonstraram a possibilidade do uso terapêutico da substância (ANVISA, 2018)

A proposta deste estudo foi análise fitoquímica dos canabinoides e investigação durante o processo na morfogênese embrionário observando os aspectos morfológico das larvas de *Aedes Aegypti* submetida a exposição do extrato metanólico de inflorescências da *Cannabis sativa L.* (EMICs). O resultado da Cromatografia em camada delgada (CCD) a partir de extrato metanólico da inflorescência da *C. sativa L.* foi detectado a presença de: Flavonoides, Cumarina, Terpenos, Fenol e ausência de Alcaloides e Saponina. Segundo Pereira et al. 2019 a análise fitoquímica de extratos da *Cannabis sativa L.* revelou a presença de terpenos, compostos fenólicos e, em particular, os canabinóide. A presença de terpenos e fenóis obtidos no CCD corrobora com estudo relatado por Mechoulam, (1973) que os compostos canabinóides podem ser classificados como terpenofenóis e não foram isolados de qualquer outra espécie vegetal ou animal.

O uso terapêutico da *Cannabis sativa L.* (maconha) está associado aos efeitos dos seus fitocanabinóides, principalmente o Canabidiol (CBD) (PETROCELLIS, CASCIO & MARZO, 2004). Devido ao grande interesse pelos efeitos causados pelos compostos presentes na Cannabis, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com intuito de compreender melhor as relações entre estrutura química dos canabinóides e atividade biológica apresentada por esses compostos (MECHOULAM 1973; RAZDAN 1986; TARZIA et al 2003; ARROIO et al 2004). Estudo similar reportando o processo da morfogênese embrionário observando os aspectos morfológicos das larvas de *A. aegypti* expostos a inflorescência da *Cannabis sativa L.* não foi encontrado na literatura. Isto dificultar fazer estudo comparativo. Relatos com Embrões de zebrafish foram tratados com CBD a partir da fertilização até completarem 5 dias pós fertilização (dpf), ao completarem 24 horas pós fertilização (hpf) o córion foi retirado e em seguida realizada a microinjeção intracerebroventricular de β -amilóide ($10\mu\text{M}$), tendo como controles animais injetados com DMSO (1%) e animais não injetados. Aos 5dpf estes animais foram retirados do tratamento e avaliados o comportamento, durante todo o período de tratamento foi realizada uma análise de embriotoxicidade. Não foi observado nenhum efeito na morfologia dos animais injetados comparados ao controle. (CORADINI et al, 2012). Análises da embriotoxicidade realizadas no período de 24hpf a 10dpf não demonstraram alterações nas taxas de sobrevivência, eclosão ou malformações no sistema nervoso entre os grupos tratados com CBD em relação aos controles. (CORADINI et al, 2012).

Nesse estudo as larvas utilizadas no experimento na morfogênese embrionário foram geradas a partir da eclosão dos ovos de *A. aegypti* do experimento preliminar. Elas foram expostas nas diferentes concentrações sob o EMICs e apresentaram 100% desenvolvimento

de larvas do 1^a estágio até 4^a estágio em relação ao controle de forma similar. Contudo no processo na morfogênese embrionário das larvas onde as mudanças de larvas do 1^a até 4^a estágio de *A. Aegypti*, destacando que nas concentrações de 250 µg/mL a 1000 µg/mL seu potencial embriotóxico é insignificante visto que o desenvolvimento larval acontece no seu processo natural, isto sugere que os compostos químicos presente na espécie *C. sativa* L. não inibe o desenvolvimento das larvas nas mudanças estágios, durante o processo natural de crescimento larval caracterizando ausência de embriotoxicidade. Observação morfo-histológica é importantes ferramentas para detectar alterações nos tecidos e células provocadas por compostos xenobioticos (LEITE 2003). Nas análises microscópicas foram observados os aspectos morfológicos de larvas de 4^a estágio do *A. aegypti* exposto em diferentes concentrações do *EMICs*.

O resultado do efeito do *EMICs* no desenvolvimento do tamanho e formas das larvas no 4^a estágio não mostraram alterações em relação ao controle. Embora a morfologia externa das larvas do grupo teste tenham apresentado características semelhantes às do grupo controle, a extrusão da matriz peritrófica após 72 horas de tratamento do *EMICs* na concentração 1000 µg/mL, mostra o mecanismo de defesa da larva de *A. aegypti* que elimina todo o alimento contaminado com a substância larvicida. No caso do *EMICs* ingerido pelas larvas de *A. aegypti* junto com o alimento, a extrusão da matriz peritrófica não foi possível identificar a destruição do epitélio intestinal e nem mortalidade das larvas.

A extrusão da matriz serviu para comprovar a ação toxica da substância, o que está de acordo com outros autores (VIEIRA *et al* 2012). As principais alterações morfologica observadas foram: elevada vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico com acúmulo de material no seu interior, aumento no número de camadas do epitélio, aumento da espessura da matriz peritrófica e hipertrofia das células. Contudo em relação às larvas no 4^a estágio tratada *EMICs* na concentração 1000 µg/mL, apresentaram alterações na região posterior, e expulsaram do tubo digestório para o meio externo, a membrana peritrofica contendo o alimento. Por conseguinte, esses dados caracterizaram alterações morfológicas ou embriotoxicas e ou teratogênicas, uma vez que as *larvas* L4 apresentaram aspecto morfologias não similares em relação ao controle. A matriz peritrófica é extracelular e secretada pelo epitélio do mesentério em alguns *arrtrópodes*. Esta membrana age como uma barreira protetora contra várias substâncias químicas, agentes microbianos e até mesmo contra agressões físicas causadas pelos alimentos ingeridos (ARRUDA *et al* 2003; BARRETO *et al* 2006).

O mesentério é o principal alvo de substâncias tóxicas, químicas e biológicas e a eliminação da matriz peritrófica, juntamente com o alimento ingerido, parece ser a primeira forma de defesa das larvas para a eliminação do que é toxico. No caso do *cannabis sativa* ingerido pelas larvas de *A. aegypti* junto com o alimento, a extrusão da matriz peritrófica, contudo não ocorreu a mortalidade das larvas. São escassos os trabalhos com as espécies *Cannabis sativa* L. em observação morfológico do *A. aegypti*.

Segundo Vieira *et al* (2012) demonstrou que efeito do extrato aquoso de *I. suffruticosa* pode atuar promovendo alterações morfológicas na membrana peritrofica em larvas de *A. aegypti*. Além disso, a inibição da formação de membrana peritrofica afetou severamente o desenvolvimento inicial das larvas no 2^a estágio *A. aegypti*, na região anterior do intestino médio. No entanto, a observação morfológica de larvas submetidas ao extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* mostrou disruptura da estrutura membrana peritrofica (VIEIRA *et al* 2012). No entanto, estudos da relação entre estrutura química e atividade biológica têm sido realizados no sentido de modificar a estrutura química destes compostos a fim de suprimir sua psicoatividade (FARIAS; GONÇALVES; NASCIMENTO, 2016).

Neste trabalho, a matriz peritrófica das larvas tratadas apresentou-se menos espessa do que a das larvas controle, contrapondo-se aos resultados apresentados por outros pesquisadores (ARRUDA *et al* 2003; BARRETO *et al* 2006). Isso se deve ao fato de que a extrusão desta membrana foi um fato marcante neste trabalho. O que possibilitara exploração das suas propriedades farmacológicas em outros ensaios. Com o intuito de colaborar nesta discussão, este trabalho busca contribuir para o conhecimento dos possíveis processos envolvidos no uso terapêutico da *Cannabis*, visando o suporte para áreas de pesquisa sobre planejamento de novos compostos canabinóides que apresentem atividade terapêutica e ausência de atividade psicotrópica.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Mestranda Suelice Guedes da Silva Brito e Prof.^a Dr.^a Sonia Pereira Leite: delineamento metodológico, concepção do protocolo de pesquisa, revisão da literatura, Doutoranda Tainá Maria S. da Silva apoio laboratorial, Fotomicrografias; Prof.^a Dr.^a Paloma Lys de Medeiros, Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite foi responsável pela elaboração dos dados e avaliação da qualidade. Todos os autores revisaram criticamente o artigo e concordaram em ser responsáveis por todos os aspectos do trabalho.

REFERENCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE; **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro, Brasil, Editora Fiocruz, 2006.

ARROIO *et al* A theoretical study on the analgesic activity of cannabinoid compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 709, n. 1-3, p. 223-229, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article>. Acesso em 10 out. 2022

BRASIL (anvisa). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 325, de 3 de dezembro de 2019.** Acesso em: 19 de out 2022]; 344 (69) Disponível em: <https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019>.

Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Rev Soc Bras Med Trop** 36: 17-25, 2003.

Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. Estudos das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponária* Lin (Sapindaceae). **Rev Patol Trop** 35: 37-57, 2006.

CORADINI, K. et al. Free and nanoencapsulated curcumin prevents scopolamine-induced cognitive impairment in adult zebrafish. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, p. 102781, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102781>

FARIAS, D. F.; GONÇALVES, I. F. de S.; NASCIMENTO, A. P. do N.; (2016) **Avaliação da Ambriotoxicidade da Concentração Inibitória Mínima do Óleo Essencial de *Lippia Sidoides* contra *Streptococcus mutans* utilizando *Danio Rerio*, um vertebrado modelo** disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/editora/analises/conbracis>

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Brasil). Informativos para compartilhamento nas redes sociais: informações gerais. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2020. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/coronavirus/material-para-download>. Acesso em 09 de dez 2022

GRAEME L. CLOSE; SCOTT H. GILLHAM; ANDREAS M. KASPER. Canabidiol (CBD) e o atleta: Alegações, Evidências, **Sports Science Exchange** (2021) Vol. 29, No. 213, 1-7, 2021. Disponível: <https://gssilatam.org/br/wp-content/uploads/2021/07/213>. Acesso em 10 out. 2022

IVERSEN, LESLIE. **Cannabis and the brain**. *Brain*, v. 126, n. 6, p. 1252-1270, 2003.

KUMAR, RN; CHAMBERS, WA; PERTWEE, RG Ações farmacológicas e usos terapêuticos da cannabis e dos canabinóides. *Anestesia*, v. 56, n. 11, p. 1059-1068, 2001

LEITE, S.P *et al.* (2004) **Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Reproductive Toxicology***. pp. 701-705. doi: 10.1265/jjh.73.330.

LEITE, S. P. (2003) *Indigofera suffruticosa* Mill; ensaio fitoquímico e ações biológicas. (Tese de Doutorado em Produtos Naturais). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2003.

LENIN, J, Q; **Cannabis y medicina tradicional: libertad, sociabilidad y subsidiariedad de este tipo de fitoterapia**. 2015. VE - 2015 Ano 16 nro. 1

LIMA, A. A. de; ALEXANDRE, U. C.; SANTOS, J. S. O uso da maconha (*Cannabis sativa* L.) na indústria farmacêutica: uma revisão. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e46101219829, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.19829. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19829> Acesso em: 27 set. 2022.

MECHOULAM, R.; **Marijuana: Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects**, Academic Press: New York, 1973. 2. Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 131.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. **Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti*** (Insecta: Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, v. 98, n. 1, p. 198-201, 2007.

PEREIRA, Tamara Sofia Lima dos Santos Pinto. **Análise fitoquímica e atividade biológica de *Cannabis ruderalis* em modelos in vitro e baseados em células**. Dissertação de Mestrado, Especialização em Biotecnologia, Universidade do Minho, Escola de Ciências, Braga – Portugal dez. 81 pag. 2019.

PITTET, D et al. As diretrizes da Organização Mundial da Saúde sobre higiene das mãos na assistência à saúde e suas recomendações de consenso. **Controle de Infecção & Epidemiologia Hospitalar**, v. 30, n. 7, p. 611-622, 2009.

PRADO, B. N. et al. O uso de Cannabis e suas Aplicações Terapêuticas para Analgesia na Clínica de Pequenos Animais. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 113, 2021. DOI: 10.51161/rem/1934. Disponível em: <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rem/article/view/1934>. Acesso em: 27 set. 2022.

RAZDAN, R. K.; Structure-activity relationships in cannabinoids. **Pharmacological reviews**, v. 38, n. 2, p. 75-149, 1986. Disponível em: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/38/2/75>. Acesso em: 12 out. 2022.

RODRIGUES NETO, A. A. et al. Evaluation of embryotoxic and embryostatic effects of the aqueous extract of *Rhizophora mangle* and tannic acid on eggs and larvae of *Aedes aegypti*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, p. 2141-2148, 2017. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170297>

ROBSON, P. Aspectos terapêuticos da cannabis e canabinóides. **The British Journal of Psychiatry**, v. 178, n. 2, p. 107-115, 2001.

SANTOS, R. X.; VOLEJO, I. P. G. “Estudo Experimental in Vivo E in Vitro De Plantas Medicinais Nos Processos De Embriotoxicidade E Teratogenicidade, **Saúde e meio ambiente**: revista interdisciplinar, v. 10, p. 227-240, 2021. <https://doi.org/10.24302/sma.v10.2797>.

SILVA, T. M. S. et al. Effects of *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) on the developmental reproductive biology of *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 2384-2399, 2021.

SILVA. B. SILVA; LEITE. P. S. Efeito da Fração alcaloide bis-indolica de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180

TARZIA, G et al. **Synthesis and structure–activity relationships of a series of pyrrole cannabinoid receptor agonists**. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 11, n. 18, p. 3965-3973, 2003.

VIEIRA J.R.C. *et al* (2012). ***Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**; 1-5. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/741638>

VIEIRA, J.R.C *et al* (2012). **Oviposition and Embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on Early Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-6 <http://dx.doi.org/10.1155/2012/741638>