

Aedes aegypti: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos

Aedes aegypti: experimental model of biological activity of plant products

Michele Teixeira Serdeiro^{†*}; Jacenir Reis dos Santos Mallet[‡], Nildimar Alves Honório[§]; Marise Maleck^{†||}

Resumo

Como citar esse artigo. Serdeiro MT; Mallet JRS; Honório MA; Maleck M. *Aedes aegypti*: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos. 2017 Jan./Jun.; 08 (1): 28-32.

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é reconhecido como transmissor de várias arboviroses de importância na saúde pública, como a dengue, zika, chikungunya e febre amarela urbana. O principal método de prevenir a transmissão desses vírus ainda é o controle do mosquito vetor. Produtos naturais de origem vegetal vêm sendo investigados, como mais uma ferramenta no controle de vetores, e compostos menos impactantes ao meio ambiente e a saúde humana. Devido à importância deste culicídeo, buscou-se extrato e frações de *Cecropia catharinensis* com atividade larvicida sobre *Ae. aegypti*. O extrato bruto metanólico (EBM) e sua fração (EBM1) obtidos da embaúba foram aplicados no meio de criação das larvas (L3) nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL. O tratamento com *C. catharinensis* resultou na alteração do período de desenvolvimento larval, pupal e de L3-adulto do mosquito. A mortalidade pupal (25 %) foi obtida pela fração EBM1. Este estudo demonstrou a eficácia de *C. catharinensis* sobre o período de desenvolvimento de *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Produtos Naturais; *Cecropia catharinensis*; Embaúba; Atividade larvicida.

Abstract

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) is recognized as a transmitter of several arboviruses of public health importance, such as dengue, zika, chikungunya and urban yellow fever. The main method of preventing transmission of these viruses is still vector mosquito control. Natural products of plant origin have been investigated, as another tool in vector control, and as less impacting compounds for the environment and human health. Due to the importance of *Ae. aegypti*, larvicidal activity of extract and fractions of *Cecropia catharinensis* on this culicidae were sought. The crude methanolic extract (CME) and its fraction (CME1) obtained from the embaúba plant were applied to the larvae breeding environment (L3) at concentrations of 10, 30 and 50 µg/mL. Treatment with *C. catharinensis* resulted in alteration of the larval, pupal and L3-adult mosquito development period. Pupal mortality (25 %) was obtained by the CME1 fraction. This study demonstrated the efficacy of *C. catharinensis* on *Ae. aegypti* developmental period.

Keywords: *Aedes aegypti*; Natural Products; *Cecropia catharinensis*; Embaúba; Larvicidal activity.

Introdução

Diante da situação epidemiológica do Brasil, já consolidada pelo vírus dengue, a introdução dos vírus chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV) aumentam a preocupação à saúde pública brasileira pela presença do mosquito cosmopolita *Aedes aegypti* (*Stegomyia*) (Linnaeus, 1762), o principal vetor destas arboviroses¹⁻⁴.

O principal método de prevenir a transmissão desses vírus ainda é o controle do mosquito vetor, que pode ser realizado através da aplicação de inseticidas químicos sintéticos, tais como os organofosforados e organoclorados, sendo estes considerados tóxicos para os seres humanos e para organismos não-alvo⁵.

O controle do *Ae. aegypti* através de produtos

naturais de origem vegetal vêm sendo investigados⁵⁻⁹, como mais uma ferramenta a ser utilizada e com compostos menos impactantes ao meio ambiente e a saúde humana⁵.

A natureza é uma das mais promissoras fontes de novas moléculas biologicamente ativas. As plantas são reconhecidas por sua diversidade química e pela sua aplicação em diferentes áreas, desde o seu uso na medicina popular até seus diversos modos de ação sobre os insetos, principalmente os de importância na saúde pública e na agricultura¹⁰⁻¹⁶.

Cecropia catharinensis Cuatrec 1959 pertence ao gênero *Cecropia* e família Urticaceae. Espécies deste gênero são popularmente conhecidas como embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva, e são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da América Central e América do Sul^{17,18}. Na medicina

Afiliação dos autores: † Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil;

‡ Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

§ Laboratório de Transmissores de Hematozoários e Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

|| Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas em Saúde, Universidade; Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ Brasil

* mserdeiro@gmail.com

popular, *C. catharinensis* é utilizada no tratamento da asma, bronquite e doenças cardiovasculares¹⁹ e também vem demonstrando toxicidade sobre insetos sugadores de grãos²⁰.

Este estudo teve como objetivo avaliar ação larvicida de extratos e frações das folhas de *C. catharinensis*, sobre *Ae. aegypti*, modelo de estudo, devido a sua importância na saúde pública.

Materiais e métodos

Extração e Fracionamento de Folhas de *C. catharinensis*

O extrato bruto metanólico (EBM) foi obtido por extração exaustiva das folhas secas de *C. catharinensis* e a fração EBM1 foi obtida a partir de EBM pelo tratamento com diclorometano, metodologias descritas por Serdeiro (2013)²¹ e Almeida et al. (2016)²².

Ae. aegypti

Os ovos de *Ae. aegypti* foram obtidos a partir do Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores (Nosmove), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Para a realização dos testes, os ovos foram analisados quanto à viabilidade e colocados para eclosão em recipientes contendo água mineral previamente aquecida a 28 °C e foi adicionado ração para peixe (Alcon Guppy®). Os recipientes contendo os ovos foram mantidos em câmara climatizada BOD a 27 ± 1 °C e 70 ± 10 % UR. Após a eclosão as larvas de terceiro estágio (L3) foram separadas para os bioensaios.

Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras-RJ.

O extrato EBM e a fração EBM1 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL e as soluções aplicadas no meio de criação das larvas, em recipientes de vidro contendo água mineral (20 mL).

Foram utilizadas 20 larvas de terceiro estágio (L3) de *Ae. aegypti* por grupo teste, controle (sem substância e sem DMSO) e controle testemunho (sem substância e com DMSO). Os experimentos foram realizados em triplicatas (R1, R2 e R3), totalizando 60 larvas/grupo, e três repetições. Após o tratamento, os insetos foram mantidos em dieta normal (ração de peixe na proporção de 0,3 mg para cada larva)

em câmara climatizada - BOD a 27 ± 1 °C e 70 ± 10%. Foram avaliadas a viabilidade larval, pupal, emergência e a mortalidade das formas imaturas do mosquito. Os bioensaios foram realizados conforme metodologia adaptada de WHO (2005)²³ e de Maleck et al. (2017)⁹.

Análise estatística

Os resultados obtidos dos ensaios biológicos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey com nível de significância de 5% através do programa Graphpad- Prism^{24,25}.

Resultados e discussão

Espécies vegetais do gênero *Cecropia* vem sendo estudadas quanto a avaliação de suas atividades biológicas e o isolamento de seus metabólitos secundários¹⁸. No presente trabalho, o tratamento sobre as larvas (L3) de *Ae. aegypti* com o extrato bruto (EBM) de *C. catharinensis* na concentração de 10 µg/mL interferiu na duração do desenvolvimento nas fases de pupa (dias) (4,5 ± 1,4; p ≤ 0,001) e L3-adulto (dias) (10 ± 1,6; p ≤ 0,1) (Tabela 1A), enquanto que na concentração de 50 µg/mL apenas interferiu na fase pupal (4,7 ± 1,2; p ≤ 0,001) (Tabela 1A). Quanto à viabilidade o extrato EBM apresentou de 90 a 98 % de emergência (10 a 50 µg/mL) (Tabela 1B), apresentando baixa toxicidade, de 2-7 % de mortalidade larval e 3-8% de mortalidade de pupas nas concentrações testadas (Tabela 1C). Semelhante a este resultado, aplicação do extrato bruto metanólico das folhas de *Cecropia pachystachya*, sobre a dieta de *Atta sexdens rubropilosa* não apresentou toxicidade sobre esta espécie de formiga²⁶. Estudos com *C. catharinensis* sobre o Hemiptera *Oncopeltus fasciatus*, por aplicação oral do extrato EBM, resultou em 30 % de mortalidade de ninfas de 5º estágio na concentração de 100 µg/mL e quando aplicados diretamente sobre os ovos de *O. fasciatus* inibiu em 100 % a sua eclosão²⁰. Estes dados mostraram a interferência do extrato EBM principalmente sobre a inibição da eclosão. Os bioensaios com a fração EBM1, no meio de criação das larvas (L3) de *Ae. aegypti*, demonstrou alteração do período de desenvolvimento da fase larval (dias) nas concentrações de 10 (3,6 ± 1,3; p ≤ 0,001), 30 (4,5 ± 2,1; p ≤ 0,001) e 50 µg/mL (4 ± 1,3; p ≤ 0,001), respectivamente (Tabela 2A). Esta interferência também foi significativa na fase pupal nas mesmas concentrações 10 (7,3 ± 1,9; p ≤ 0,001), 30 (8,5 ± 2,4; p ≤ 0,001) e 50 µg/mL (7,3 ± 2,9; p ≤ 0,001) e também nas fases L3-adulto nas concentrações de 10 (9,8 ± 1,7; p ≤ 0,01), 30 (11,5 ± 2,7; p ≤ 0,01) e 50 µg/mL (10,1 ± 2,4; p ≤ 0,01) (Tabela 2A). Quanto

a mortalidade a fração EBM1 apresentou 25 % de mortalidade pupal (Tabela 2C), na concentração de 50 µg/mL, consequentemente resultando em 72 % de adultos (Tabela 2B). O tratamento com EBM1 não mostrou mortalidade larval (Tabela 2C). Almeida et al. (2016)²², com estudos de atividade citotóxica em

3 linhagens de células tumorais humanas, utilizando extrato bruto metanólico (EBM) e as frações semipurificadas (EBM1 e EBM2) das folhas de *C. catharinensis* demonstraram que a fração EBM1 inibiu o crescimento celular das 3 linhagens utilizadas nos ensaios biológicos, embora o extrato metanólico, similar

Tabela 1. Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação, com EBM de *Cecropia catharinensis*.

| Aplicação | Larval (dias) | | Pupal (dias) | | L3-adulto (dias) | |
|-----------|------------------------|-----|----------------------------|------|-------------------------|------|
| A | X ± DP | IV | X ± DP | IV | X ± DP | IV |
| Controle | 1,5 ± 0,9 ^a | 1-4 | 4,7 ± 1,4 ^a | 3-9 | 7,2 ± 1,7 ^a | 5-13 |
| DMSO | 1,6 ± 0,9 ^a | 1-4 | 6,2 ± 2,1 ^b | 4-12 | 7,9 ± 2,1 ^a | 5-15 |
| 10 µg/mL | 1,8 ± 1 ^a | 1-4 | 4,5 ± 1,4 ^{b***} | 3-8 | 6,9 ± 1,6 ^{b*} | 5-10 |
| 30 µg/mL | 1,9 ± 0,8 ^a | 1-4 | 5,5 ± 1,8 ^c | 3-10 | 7,8 ± 2,3 ^a | 4-15 |
| 50 µg/mL | 1,8 ± 1,4 ^a | 1-6 | 4,7 ± 1,2 ^{ab***} | 3-8 | 7,3 ± 1,6 ^a | 5-12 |

| Aplicação | L3-L4 | | L4-pupa | | Pupa-adulto | | L3-adulto | |
|-----------|---------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
| B | X ± DP | % | X ± DP | % | X ± DP | % | X ± DP | % |
| Controle | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 |
| DMSO | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 |
| 10 µg/mL | 20 ± 0 ^a | 98 | 19,6 ± 0,6 ^a | 100 | 19,6 ± 0,6 ^a | 100 | 19,6 ± 0,6 ^a | 98 |
| 30 µg/mL | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 93 | 19,3 ± 1,1 ^a | 97 | 19,3 ± 1,1 ^a | 90 |
| 50 µg/mL | 20 ± 0 ^a | 98 | 19,6 ± 0,6 ^a | 100 | 19,3 ± 0,6 ^a | 92 | 18 ± 0 ^a | 90 |

| Aplicação | L3 | | L4 | | Pupa | |
|-----------|------------------------|---|------------------------|---|------------------------|---|
| C | X ± DP | % | X ± DP | % | X ± DP | % |
| Controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DMSO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 µg/mL | 0,3 ± 0,6 ^a | 2 | 0 | 0 | 1 ± 1 ^a | 5 |
| 30 µg/mL | 0 | 0 | 1,3 ± 1,1 ^a | 7 | 0,6 ± 1,1 ^a | 3 |
| 50 µg/mL | 0,3 ± 0,6 ^a | 2 | 0 | 0 | 1,6 ± 0,6 ^a | 8 |

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como *** P≤0,001; *P≤0,1 vs controle DMSO.

Tabela 2. Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação, com EBM1 de *Cecropia catharinensis*.

| Aplicação | Larval (dias) | | Pupal (dias) | | L3-adulto (dias) | |
|-----------|----------------------------|------|----------------------------|------|----------------------------|------|
| A | X ± DP | IV | X ± DP | IV | X ± DP | IV |
| Controle | 2 ± 1,2 ^a | 1-5 | 6 ± 1,8 ^a | 2-8 | 8,7 ± 2,3 ^a | 4-13 |
| DMSO | 1,5 ± 0,5 ^a | 1-2 | 3,1 ± 1,3 ^b | 2-7 | 5,4 ± 1,3 ^b | 4-9 |
| 10 µg/mL | 3,6 ± 1,3 ^{b***} | 1-8 | 7,3 ± 1,9 ^{bc***} | 4-12 | 9,8 ± 1,7 ^{b**} | 8-15 |
| 30 µg/mL | 4,5 ± 2,1 ^{bc***} | 2-11 | 8,5 ± 2,4 ^{b***} | 4-13 | 11,5 ± 2,7 ^{b**} | 6-16 |
| 50 µg/mL | 4 ± 1,3 ^{b***} | 2-6 | 7,3 ± 2,9 ^{b***} | 4-14 | 10,1 ± 2,4 ^{bc**} | 5-15 |

| Aplicação | L3-L4 | | L4-pupa | | Pupa-adulto | | L3-adulto | |
|-----------|---------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
| B | X ± DP | % | X ± DP | % | X ± DP | % | X ± DP | % |
| Controle | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 |
| DMSO | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 100 |
| 10 µg/mL | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 98 | 19,6 ± 0,5 ^a | 95 | 19,3 ± 1,1 ^a | 93 |
| 30 µg/mL | 20 ± 0 ^a | 100 | 20 ± 0 ^a | 93 | 18,6 ± 1,1 ^a | 97 | 18 ± 2 ^a | 90 |
| 50 µg/mL | 20 ± 0 ^a | 98 | 19,6 ± 0,5 ^a | 98 | 19,3 ± 0,6 ^a | 75 | 14,3 ± 4,5 ^a | 72 |

| Aplicação | L3 | | L4 | | Pupa | |
|-----------|-----------|---|------------------------|---|------------------------|----|
| C | X ± DP | % | X ± DP | % | X ± DP | % |
| Controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DMSO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 µg/mL | 0 | 0 | 0,3 ± 0,5 ^a | 2 | 1 ± 1 ^a | 5 |
| 30 µg/mL | 0 | 0 | 1,3 ± 1,1 ^a | 7 | 0,6 ± 1,1 ^a | 3 |
| 50 µg/mL | 0,3 ± 0,6 | 2 | 0,3 ± 0,5 ^a | 2 | 5 ± 4 ^a | 25 |

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como ***P ≤ 0,001; **P ≤ 0,01 vs controle DMSO.

aos resultados apresentados neste estudo, também não apresentou toxicidade no modelo utilizado.

Conclusão

Os resultados demonstraram que a fração obtida

das folhas de *C. catharinensis* alterou o período de desenvolvimento de *Ae. aegypti*. Sugere-se a purificação desta fração ativa e maiores estudos da sua atividade biológica sobre os ovos e fisiologia de *Ae. aegypti*.

Declarações

Os autores declaram não possuírem conflitos de interesse diretos ou indiretos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); à FUSVE/USS; à FIOCRUZ/ CAPES-Brasil Sem Miséria.

Fontes de Financiamento

FAPERJ e FUSVE/USS.

Referências

- Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int*. 2015; Article ID 321873.
- Pinto Junior VL. Zika virus na bofeia da globalização. *Rev Med Saude Brasilia*. 2014; 4(2):142-43.
- Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110: 569-72.
- Lima-Camara TN. Arboviroses emergentes e novos desafios para saúde pública no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2016; 50:36.
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res*. 2012; 135(5): 581-98.
- Guimarães MGA, Martins KS, Carvalho MA, Kersten VA, Vieira RBT, Maleck M. Bioatividade de Bromélias sobre *Aedes aegypti*. *Rev Fitos*. 2013; 8(2): 73-160.
- Dias CN, Moraes DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res*. 2014; 113(2): 565-92.
- Marques AM, Velozo LS, Carvalho MA, Serdeiro MT, Honório NA, Kaplan MAC, Maleck M. Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: a potencial natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. *J Vector Dis*. 2017; 54: 61-8.
- Maleck M, Hollanda PO, Serdeiro MT, Soares RO, Honório NA, Silva CG. Toxicity and larvicidal activity of Podophyllum-Based Lignans against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2017; 54(1): 159-66.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 1027-31.
- Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, Siani AC, Henriques MGMO. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res*. 2005; 54: 295-303.
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 2006; 51: 45-56.
- Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes CMS, Barbosa-Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. *Fitoterapia*. 2007; 78: 20-24.
- Kirst HA. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot*. 2010; 63:101-11.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012; 75 (3): 311-35.
- Maleck M, Santos FCC, Serdeiro MT, Guimarães AE, Ferreira B, Gunaydin K, Almeida AP. Khellin: a furochromone with toxicity against *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) and *Aedes aegypti* (Diptera). *J Nat Pharm*. 2013; 4(1): 32-36.
- Consolini AE, Migliori GN. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96:417- 22.
- Costa GM, Schenkel EP, Reginatto FH. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun*. 2011; 6 (6): 913-29.
- Machado EC, Yunes RA, Malheiros A, Gomez EC, Delle Monache F. Two new 11 α , 12 α -epoxy-ursan-28, 13 β -olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. *Nat Prod Res*. 22(15): 1310-16.
- Maleck M, Serdeiro MT, Santos FCC, Braun AMO, Chaves DSA, Faria AR, Almeida AP. Bioactivity of Brazilian plant extracts on *Oncopeltus fasciatus*. *Int J Fauna Biol Stud*. 2014; 1 (6): 114-20.
- Serdeiro MT. Fracionamento de extratos de *Cecropia catharinensis*, Cuatrec, 1959 e avaliação de atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L (*Stegomyia*), Linnaeus, 1762 [dissertação]. Vassouras: Universidade Severino Sombra; 2013. 66p.
- Almeida AP, Quintela JC, Chaves DAS, Barbosa JF, Pinto M, Pedro M. The cytotoxic effect of extracts obtained from *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae). *Rev Virtual Quim*. 2016; 8(1): 27-34.
- World Health Organization. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/>
- Motulsky HJ. Analyzing data Graph Pad Prism. San Diego, CA: Graph Pad Software Inc.; 2000.
- Sokal RR, Rohlf FJ. Principios y Metodos Estadísticos em La Investigación Biológica. H. Blume Ed., Madri, Espanã. 1979. 223.
- Torres AF, Lasma O, Carvalho GA, Santa-Cecília LUC, Fanetti R, Oliveira D. Atividade inseticida de extratos de plantas no controle de formiga cortadeira, em cafeeiro. *Coffee Science, Lavras*. 2013; 8(3): 371-78.