

Ação dos extratos de *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker sobre as formas imaturas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus, 1762

Action of extracts of *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith and *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker on immature forms of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762

^{1,2,3}Maria das Graças A. Guimarães; ^{1,3}Karine da S. Martins; ^{1,3}Michele A.de Carvalho;^{1,3}Victor A. Kersten; ³Richard R. B.T.Vieira; ^{1,2,3,4}Marise Maleck

¹Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Rua Antenor Caravana, 677, Vassouras, 27700-000, RJ, Brasil. E-mail: *mgaguima@yahoo.com.br; mmaleck@oi.com.br

²Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Av. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, 27700-000, Vassouras, RJ, Brasil.

³Centro de Ciências Exatas, Tecnológicas e da Natureza e Centro de Ciências da Saúde, Universidade Severino Sombra, Av. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, 27700-000, Vassouras, RJ, Brasil.

⁴Colégio Pedro II, Campo de São Cristóvão, 177, São Cristóvão, 20921-440, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

Estudos discutem as bromélias como criadouros do *Aedes aegypti* L., vetor da dengue. Avaliou-se a toxicidade de extratos brutos de *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker (Bromeliaceae) e *Neoregelia compacta* (Mez) LB Smith (Bromeliaceae) em larvas de *A. aegypti*. Folhas de *N. compacta* trituradas com etanol e água destilada, hexano e acetato de etila, resultaram nos extratos hidroalcoólico, hexânico e de acetato de etila. Das flores e folhas de *A. fasciata*, maceradas em acetato de etila, obteve-se o extrato de acetato de etila. Os bioensaios foram realizados com aplicação desses extratos no meio de criação das larvas (L3) de *A. aegypti*. Neste estudo foram avaliadas a viabilidade larval e pupal, a emergência e a mortalidade. Os resultados dos bioensaios apontaram para a alta toxicidade (DL50 = 39,4 µg/mL) de *A. fasciata* e (DL50 = 23 µg/mL) de *N. compacta*. Os dados sugerem estas bromeliáceas como fonte de bioprodutos ativos na busca de um fitoproduto larvicida no controle do mosquito vetor da dengue.

Palavras-chave: atividade larvicida; Bromeliaceae; *Aedes aegypti*; dengue.

Abstract

Several studies have discussed bromeliads as breeding grounds for *Aedes aegypti* L., a dengue vector. The toxicity of crude extracts of *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker (Bromeliaceae) and *Neoregelia compacta* (Mez) LB Smith (Bromeliaceae) on *A. aegypti* larvae was evaluated in this study. Leaves of *N. compacta* were ground up with ethanol and distilled water, hexane and ethyl acetate to produce hydro alcoholic, hexane and ethyl acetate extracts. Flowers and leaves of *A. fasciata* were macerated in ethyl acetate to obtain an ethyl acetate extract. The bioassays were performed with application of these extracts to the breeding medium of L3 larvae of *A. aegypti*. In this study, larval and pupal viability, emergence and mortality were evaluated. The results from

the bioassays indicated that these extracts were highly toxic: LD50=39.4µg/mL for *A. fasciata* and LD50= 23 µg/mL for *N. compacta*. The data suggest that, within the search for larvicidal phytoproducts, these bromeliads are sources of active bioproducts for dengue vector mosquito control.

Keywords: larvicidal activity; Brom *aegypti*; dengue.

Introdução

As plantas são fontes ricas de substâncias farmacologicamente ativas, e algumas delas apresentam atividade larvicida e inseticida (Silva et al., 2003; Siddiqui et al., 2004) no que diz respeito ao controle de insetos nas culturas agrícolas (Morandi Filho et al., 2006) e na saúde pública (WHO, 2009).

A família Bromeliaceae, a que pertencem às espécies *Noeregelia compacta* (Mez) L.B. Smith e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, apresenta grande representatividade no Brasil (Manetti, Delaporte e Laverde Junior, 2009). As bromélias são importantes devido aos seus recipientes fitotelmatas, permanentes e ricos em micro e macro floras e faunas associadas, da qual podem participar formas imaturas de mosquitos da família Culicidae, incluindo-se o *Aedes*. Mas, poucos são os estudos referentes à química e farmacologia de *N. compacta* e *A. fasciata*. Na literatura observou-se que os principais compostos já isolados e identificados de bromélias são pertencentes às classes dos triterpenóides e flavonoides. Em menor número encontram-se os esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis, lignanas, entre outros (Williams, 1978; Manetti, Delaporte e Laverde Junior, 2009; Fabri e Costa, 2012). A ocorrência de flavonoides na família bromeliácea evidencia a importância química dos mesmos como possíveis agentes farmacológicos e possibilita considerá-los como potenciais quimiotaxonômicos. Manetti e colaboradores (2010), que identificaram flavonoides, taninos e saponinas, sugerem que a sua atividade citotóxica está relacionada provavelmente à presença de saponinas. Manetti, Delaporte e Laverde Junior (2009) relacionam a larga variedade de atividades fisiológicas aos diterpenos isolados de Bromeliaceae.

Noeregelia compacta (Mez) L.B. Smith pertence à família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, nativa do Brasil e endêmica nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Silva e Gomes, 2003). Com poucos dados encontrados na literatura, entre os compostos derivados do metabolismo secundário do gênero *Noeregelia* há aqueles compartilhados com a família Bromeliaceae. Yano (2003) cita três esteróides e uma substância pura 3,4-dimetoxicinamato

de 1'-glicerila dos extratos hexânicos de folhas de *N. cruenta* e *P. flammea*. Os extratos com diferentes preparações (hexânicos, metanólicos, aquosos) de folhas, rizomas, sementes e de frutos destas espécies mostraram atividades antineoplásica, antifúngica, antibacteriana e antioxidante.

O gênero *Aechmea* (Ruiz & Pav) é o maior e um dos mais complexos gêneros de Bromeliaceae (Forzza et al., 2012). Originária do Brasil, onde se encontram 60% de suas espécies, o gênero *Aechmea* reúne cerca de 240 espécies (Luther, 2008) endêmicas do Estado do Rio de Janeiro (Sousa e Wanderley, 2000).

Aedes aegypti L., vetor do vírus da dengue, é encontrado em áreas urbanas, e apresenta importância médica (Silva et al., 2004), por ser responsável por epidemias frequentes causadas pela migração dos quatro sorotipos nas Américas (WHO, 2009). A sua grande capacidade de adaptação a condições adversas, tais como períodos de quiescência de ovos em ambientes inóspitos (Barrera, 1996; Silva e Silva, 1999; Varejão et al., 2005; Serpa et al., 2006) e o crescimento normal em águas poluídas (Beserra et al., 2009; Beserra et al., 2010), faz com que o controle deste vetor seja muito difícil. O mosquito parece ter preferência por ambientes com riqueza de microrganismos e de matéria orgânica (Barrera, 1996), especialmente os encontrados em Bromeliaceae. A única forma de controle destes insetos ainda é aplicação de inseticidas e larvicidas.

Vários estudos têm chamado a atenção para os produtos naturais com atividade larvicida que poderiam ser úteis no controle de diversos vetores (Consoli et al., 1988; Park et al., 2002; Silva et al., 2003), incluindo *A. aegypti* (Cabral et al., 2009; Maleck et al., 2013).

Quando da epidemia de dengue no Rio de Janeiro em 2001/2002 foi levantada a possibilidade de bromélias domésticas serem criadouros de larvas de *A. aegypti* (Mocellin et al., 2009). Segundo Bermúdez-Monge e Barrios (2011) os efeitos químicos resultantes do metabolismo desses vegetais interferem na abundância e diversidade da fauna em seus

reservatórios. A necessidade de seu estudo se torna primordial (Cunha et al., 2002) quanto à possibilidade de possuir e eliminar nos seus reservatórios substâncias com atividades larvicidas para *A. aegypti* e à desmistificação como seus prováveis criadouros.

Este estudo teve como objetivo avaliar a interferência sobre o desenvolvimento de formas imaturas de *A. aegypti* e a toxicidade dos extratos de *A. fasciata* e *N. compacta* sobre as mesmas, tendo em vista encontrar-se na literatura referências divergentes para o fato de as bromélias serem ou não criadouros de mosquitos.

Material e Métodos

Material vegetal

Endêmica do Estado do Rio de Janeiro (Sousa e Wanderley, 2000), *A. fasciata* apresenta folhagem rígida, com estrias verticais, rosuladas, em forma de roseta aberta até tubular; bainha em geral alargada, lâminas com margens serradas ou serrilhadas - espinhos nas bordas - e marmorizadas de verde com escamas cinza prateadas, principalmente quando jovem; a inflorescência, durável e rígida, é formada por brácteas cor-de-rosa vistosas a inconspícuas, com espinhos nas bordas e flores roxas delicadas, com dois apêndices petalinos internos; sépalas livres a conatas, em geral assimétricas e mucronadas; pétalas róseas e lilases; seis estames, inclusos na corola, livres ou os do segundo ciclo adnatos às pétalas; ovário ínfero; fruto baga; sementes sem apêndices conspícuos; rizoma conspícuo; escapo bem desenvolvido (Sousa e Wanderley, 2000).

Também nativa do Brasil, endêmica nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, a *N. compacta* é um vegetal epífita caracterizando-se por ser acaule, rizomatosa, de roseta bem aberta, com até 0,40 m de diâmetro, com folhas largas, rijas e coriáceas, nas cores verde ou variegada. A inflorescência forma-se em uma depressão no centro da planta, pela modificação das folhas internas à roseta (brácteas) nas cores vermelho-viva, protegendo flores brancas e discretas e originando um receptáculo achatado para recolher água. As folhas que rodeiam as inflorescências são brilhantes e coloridas. Propaga-se por separação de rebentos ou por sementes (Silva e Gomes, 2003).

Dentre bromélias de origem brasileira, para este estudo foram escolhidas as espécies *Aechmea*

fasciata (Lindley) Baker e *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith. Os representantes de bromélias usados neste estudo localizavam-se em área periurbana do Município de Miguel Pereira, RJ, região serrana do Estado do Rio de Janeiro, em altitude de 640m, com temperatura média de 24°C e índice pluviométrico de 1.750mm³ (PMMP, 2011). As bromélias encontravam-se dispostas no solo, entre as coordenadas 22°28'30.77"S e 43°29'35.51" O, e em galhos de árvores, entre as coordenadas 22° 28' 30. 49"S e 43°29' 35. 23"O. Os espécimes utilizados foram classificados por Carlos Amaral e as suas exsiccatas estão depositadas no Herbário da Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil sob os números HUSSBRO-001(*N. compacta*) e HUSSBRO-002 (*A. fasciata*).

Extração

Folhas e caules de *N. compacta* e *A. fasciata* foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. Após a secagem, o material vegetal foi fragmentado e triturado para a preparação dos extratos.

As folhas de *N. compacta* (38g) foram maceradas, separadamente, utilizando diferentes solventes com polaridade crescente: em hexano (Isolar) (400 mL), em acetato de etila (Quimex) (370 mL) e em etanol (Vetec) e água destilada (400 mL; 1:1), obtendo-se os extratos hexânico, de acetato de etila e hidroalcoólico.

As flores (23g) e folhas secas (60g) de *A. fasciata* foram maceradas em 230 mL e 600 mL acetato de etila. Todos os materiais foram preparados em frasco de vidro escuro, sob agitação ocasional de duas vezes por semana, durante 20 dias. Após a maceração, o material vegetal foi filtrado e evaporado em rotavapor a 40°C, armazenado em frasco de vidro escuro, e mantido em geladeira a 12°C e 25% de UR. Para a utilização nos bioensaios, os extratos hidroalcoólico e de acetato de etila foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), devido a sua menor toxicidade perante aos demais solventes, e o extrato hexânico foi dissolvido em acetona, devido a sua polaridade.

Bioensaios

Os ovos de *A. aegypti* foram obtidos no Núcleo de Apoio e Pesquisa de Vetores–NapVE/Parceria DIRAC-IOC-VPAAPS/FIOCRUZ e mantidos no

laboratório de Insetos Vetores/USS, Vassouras, RJ. Para os bioensaios, os ovos foram colocados em um recipiente (4,0 cm x 4,5cm) contendo água mineral. Após 1h foi adicionado a este meio, alimento de ração de peixes (Alcon Guppy) (0,3 mg/larva) (WHO, 1970; Cabral et al., 2009) para incubação dos ovos e desenvolvimento das larvas (Cabral et al., 2009; Narciso, 2009; Leite et al., 2012). Após a eclosão, as larvas de terceiro estágio (L3) foram separadas e colocadas (20 larvas por grupo) em recipientes de vidro, contendo água mineral (20 mL). Após 1h foi adicionado a este meio de criação larval, alimento de ração de peixe conforme citado acima, para a realização dos testes biológicos.

Para avaliação da atividade larvicida, os extratos de folhas e flores de *N. compacta* e *A. fasciata* foram aplicados ao meio de criação larval nas concentrações de 10, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e submetidos à investigação de atividade biológica sobre formas imaturas (L3) de *A. aegypti*.

Os bioensaios compreenderam grupos testes, grupo controle (controle sem solvente de diluição) e controle testemunho (com solvente de diluição). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e três repetições. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e foto período de 12h.

As observações foram realizadas durante 30 dias, e os resultados analisados quanto ao período de desenvolvimento, à viabilidade e à mortalidade, além de avaliação morfológica das larvas mortas através de microscopia óptica.

Análises Estatísticas

Os resultados foram tratados pela análise de variância F- ANOVA (Sokal e Rohlf, 1979), a significância estatística foi determinada pelo teste Tukey sendo considerado como significativo $P \leq 0,05$ e o erro padrão calculado através da média dos experimentos, através do programa Graphpad Instat 3.05 (Motulsky, 1999) e BioEestat 5.0 (Ayres et al., 2007), e o teste χ^2 com nível de significância de $P \leq 0,01$. Os desvios padrão foram calculados utilizando a média dos experimentos e análise de Trimmed Spearman-Kärber para determinar a DL_{50} (Hamilton, Russo e Thurson, 1977).

Resultados

Da extração vegetal foram obtidos 0,155g de extrato hexânico, 1,927 g de hidroalcoólico, 274 g de

acetato de *N. compacta* e 179 mg de acetato de etila de *A. fasciata*.

O extrato hidroalcoólico de *N. compacta* estendeu a fase larval (L3-adulto) de *A. aegypti* em 3 dias em concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (8-24) e diminuiu na concentração de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ de L3-adulto (13-23) se comparado ao grupo controle (8-21) (Tabela 1A). O mesmo extrato de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou $4,7 \pm 2,6$ de mortalidade para L4. Nas concentrações de 100 e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ a mortalidade de pupas foi de $5,0 \pm 0,6$ para a concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e $4,0 \pm 1,5$ para a de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparadas a não ocorrência de mortalidade de pupas no grupo controle (Tabela 1C).

A viabilidade de adultos foi de apenas de $5,0 \pm 0,0$ a $6,3 \pm 4,0$ (200 e $100\mu\text{g mL}^{-1}$), em comparação a $18,3 \pm 2,1$ e $18,7 \pm 2,3$ de adultos dos grupos controles (Tabela 1B).

Na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ as larvas L3 duraram 4 dias, as L4 duraram 9 dias e as pupas sobreviventes duraram 11 dias, com mortalidade de 33% em $200\mu\text{g mL}^{-1}$. As larvas L3 sobreviveram, as L4 duraram 10 dias com 25% de mortalidade e as pupas duraram 10 dias com 32% de mortalidade.

O extrato hexânico ($200\mu\text{g mL}^{-1}$) reduziu o período de desenvolvimento de larvas (L3) a adulto ($15,0 \pm 4,2$) ($P < 0,001$) quando comparado aos controles ($19,3 \pm 3,7$) e ($20,0 \pm 4,5$) e aumentou o período de desenvolvimento larval na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ em 2 dias (2-11) em relação ao controle (2-9) (Tabela 2A). As concentrações de 100 ($13,0 \pm 3,5$) ($P < 0,001$) e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ ($12,0 \pm 4,4$) ($P < 0,001$) aumentaram o período de desenvolvimento de pupa em dois dias se comparado ao grupo controle. O desenvolvimento de L3-adulto diminuiu em 2 dias na concentração de $10\mu\text{g/mL}^{-1}$ ($16,3 \pm 3,7$) ($P < 0,01$), 1 dia na concentração de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ ($15,0 \pm 4,2$) ($P < 0,001$) e aumentou este período em 1 dia na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ($15,3 \pm 4,1$) ($P < 0,001$).

A mortalidade larval (L4) $5,3 \pm 2,0$; $6,7 \pm 3,0$ e $8,3 \pm 2,3$ ocorrida em 10, 100 e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, de extrato hexânico, não foi registrada no grupo controle (Tabela 2C) e, reduziu significativamente ($8,7 \pm 1,5$) ($P < 0,001$), ($11,0 \pm 2,0$) ($P < 0,001$) e ($9,0 \pm 1,0$) em 10, 100 e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ a emergência em relação ao controle ($19,0 \pm 1,7$) (Tabela 2B).

O extrato de acetato de etila (AcoEt) de *N. compacta* reduziu entre 1 a 2 dias o período de desenvolvimento de *A. aegypti*, na concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 1 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato hidroalcoólico de *N. compacta*.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3 – adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	3,5±0,5a	(3-4)	14,8±3,1a	(6-19)	17,0±3,3a	(8-21)
DMSO	3,7±0,47a	(3-4)	16,7±2,8b	(10-21)	19,0±3,1b	(12-24)
10µg mL ⁻¹	2,7±0,5b***	(2-5)	14±3,5ac***	(6-20)	16,0±5,4ac*	(8-24)
100µg mL ⁻¹	3,4±0,5ac*	(3-4)	13,7±2,7ac***	(8-21)	18,8±4,5a	(10-22)
200µg mL ⁻¹	3±2b***	(3-4)	15,2±2,5ab	(8-19)	19,8±4ad	(13-23)

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0	100	20,0±0	92	18,3±2,1a	100	18,3±2,1a	92
DMSO	20,0±0	100	20,0±0	93	18,7±2,3a	100	18,7±2,3a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0	95	19,0±1,0	74	14,0±2,0a	82	5,3±4,0b**	27
100µg mL ⁻¹	20,0±0	100	20,0±0	72	14,3±3,0a	55	6,3±4,0b**	32
200µg mL ⁻¹	20,0±0	97	19,3±1,1	62	12,0±3,0a	45	5,0±0b**	25

C	L3			L4		Pupa			
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0	0	0	1,7±2,1	(6-14)	8	0	0	0
DMSO	0	0	0	1,3±2,3	(9-14)	7	0	0	0
10µg mL ⁻¹	1,0±1,0	3-3	5	2,3±2,1	(4-24)	12	0,7±1,1a	(10-12)	5
100µg mL ⁻¹	0	4-4	0	2,3±1,5	(6-15)	12	5,0±0,6b***	(10-21)	33
200µg mL ⁻¹	0,7±1,1	0	3	4,7±2,6	(4-14)	25	4,0±1,5c**	(11-21)	32

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. 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; *P < 0.1 vs controle de DMSO (testemunho).

Tabela 2 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato hexânico de *Neoregelia compacta*.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3 – adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	4,2±1,7	(2-9)	16,0±4,0a	(7-22)	19,3±3,7a	(9-23)
Acetona	4,0±2	(2-7)	17,0±5,0a	(1-4)	20,0±4,5a	(9-24)
10µg/mL ⁻¹	4,4±2,4	(2-9)	15,0±4,6a	(1-15)	16,3±3,7bd**	(9-21)
100µg/mL ⁻¹	4,3±2,1a	(2-11)	13,0±3,5ac***	(1-17)	15,3±4,1c***	(7-22)
200µg/mL ⁻¹	4,0± 1,8	(2-8)	12,0±4,4bc***	(1-17)	15,0±4,2c***	(8-21)

B	L3-L4		L4-pupa		L3 – adulto		Pupa-adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	95	19±1,7a	100	19,0±1,7a	100	19,0±1,7a	95
Acetona	20,0±0a	100	20,0±0a	97	19,3±0,6a	100	19,3±0,6a	97
10µg/mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0	63	12,7±0,6b**	68	8,7±1,5b***	43
100µg/mL ⁻¹	20,0±0a	97	19,3±0,6	67	12,3±2b**	85	11,0±2,0b***	55
200µg/mL ⁻¹	20,0±0a	97	19,3±1,0	55	10,7±1,5c***	81	9±1,0b***	43

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	1,0±1,7a	(3-5)	5	0	0	0	0	0	0
Acetona	0	0	0	0,7±0,6a	(4-4)	3	0	0	0
10µg/mL ⁻¹	0	0	0	5,3±2a	(11-22)	27	0,3±0,6a	(14-14)	2
100µg/mL ⁻¹	0,7±0,6a	(2-8)	3	6,7±3b*	(3-19)	32	1,0±1,0a	(11-21)	8
200µg/mL ⁻¹	0,7±1a	(1-7)	3	8,3±2,3b*	(2-20)	42	0,7±0,6a	(10-20)	6

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. 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; *P<0,1 vs controle de acetona (testemunho).

Tabela 3 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato bruto de acetato de etila de *Neoregelia compacta*.

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	100	20,0±0a	98	19,6±0,6a	100	19,6±0,6a	98
DMSO	20,0±0a	100	20,0±0a	93	18,6±1,5a	100	18,6±1,5a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0a	87	17,3±3,0a	67	11,6±3,0b***	58
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	100	20,0±0a	98	19,6±0,6a	100	19,6±0,6a	98
DMSO	20,0±0a	100	20,0±0a	93	18,6±1,5a	100	18,6±1,5a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0a	87	17,3±3,0a	67	11,6±3,0b***	58
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0	0	0	0,3±0,6a	13-13	2	0	0	0
DMSO	0	0	0	1,3±1,5a	6-11	7	0	0	0
10µg mL ⁻¹	0	0	0	2,7±2,8a	5-11	13	5,6±2,8	3-9	32,7
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	4-4	100	0	0	0	0	0	0
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	4-4	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. 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 *** $P < 0.001$; ** $P = < 0.01$; * $P < 0.1$ vs controle de DMSO (testemunho).

Tabela 4 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato bruto de acetato de etila de *A. fasciata*.

Tratamento A	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3 – adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	6,0±1,0a	(4-7)	10,5±2,3 a	(5-14)	11,4±1,6a	(7-15)
DMSO	5,0±0,4a	(4-5)	9,0±3,0b	(5-13)	10,1±2,6b	(7-15)
10µgmL ⁻¹	2,3±0,6b***	(2-4)	6,4±1,7c***	(5-11)	6,9±1,4c***	(7-13)
100µgmL ⁻¹	2,0±0b***	(2-2)	7,0±2,1bc**	(5-12)	7,2±1,6c***	(7-14)
200µgmL ⁻¹	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	100	20,0±0a	98	19,7±0,6a	100	19,7±0,6a	98
DMSO	20,0±0a	100	20,0±0a	93	18,7±1,5a	100	18,7±1,5a	93
10µgmL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0a	73	14,7±3,5a	75	11,0±4,0a	55
100µgmL ⁻¹	20,0±0a	45	9,0±10b*	74	7,0±6,5bc*	95	6,3±6,0b**	32
200µgmL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0	0	0	0,3±0,6a	13-13	2	0	0	0
DMSO	0	0	0	1,3±1,5a	6-11	7	0	0	0
10µgmL ⁻¹	0	0	0	5,3±3,5a	3-10	27	3,6±0,6b***	5-10	25
100µgmL ⁻¹	11,0±10,1a	3-3	55	2,3±4,0a	3-10	12	0,3±0,6a	10-10	5
200µgmL ⁻¹	20,0±0a	3-3	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. 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 *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.1$ vs controle de DMSO (testemunho).

(9,0 ± 2,0) (P<0,001). Não houve desenvolvimento larval em 100 e 200µg mL⁻¹. O período de desenvolvimento L3-adulto (9,0 ± 2,0) (P=<0,001) e de pupas (7,2 ± 2,0) (P=<0,01) foi reduzido em 3 dias, na concentração de 10µg mL⁻¹ em relação ao controle 13,2 ± 1,7 e 10,6 ± 2, 3 respectivamente) (Tabela 3A). A viabilidade de adultos foi de 11,6 ± 3,0 em relação a 19,6 ± 0,6 no controle. A viabilidade de L3 a adulto (11,6 ± 3,0) (P=<0,001) foi reduzida, na concentração de 10µg mL⁻¹, em relação ao controle (19,6 ± 0,6). Devido à mortalidade não houve viabilidade em 100 e 200µg mL⁻¹ (Tabela 3B).

O extrato de AcoEt mostrou toxicidade larval (L3) em 100 e 200µg mL⁻¹, em 4 dias após o tratamento, e uma dose letal (DL₅₀) = 23µg mL⁻¹. Na concentração de 10µg mL⁻¹ a mortalidade de pupas foi de 5,6 ± 2,8 em relação ao controle onde a mesma não ocorreu (Tabela 3C).

O estudo da atividade larvicida com o extrato de AcoEt de *A. fasciata* alterou o período de desenvolvimento das larvas, nas concentrações de 10 (2,3 ± 0,6) (P< 0,001) e 100µg mL⁻¹ (2,0 ± 0,0) (P<0,001) com redução de 5 dias; e, de L3-adulto (6,9 ± 1,4) (P<0,001) e (7,2 ± 1,6) (Tabela 4A).

Na concentração de 10µg mL⁻¹ de AcoEt, a viabilidade de pupa para adultos foi 11,0 ± 4,0 em relação ao grupo controle (19,7 ± 0,6). Na concentração de 100µg mL⁻¹, o extrato bruto de AcoEt resultou em mortalidade larval (L3), em 3 dias, e de 2,3 ± 4,0 (L4), perfazendo um total de 67% de larvas mortas num período de 10 dias. A mortalidade de pupas (3,6 ± 0,6) (P=<0,001) ocorreu em concentração de 10µg mL⁻¹ (Tabela 4C). A atividade larvicida foi obtida na concentração de 200µg mL⁻¹ com 100% de mortalidade larval em 3 dias após a aplicação do extrato de *A. fasciata*, e registrando uma DL₅₀ = 39,4µg mL⁻¹.

Discussão e Conclusão

Espécies da família Bromeliaceae vêm sendo estudadas quanto à identificação e isolamento e atividades farmacológicas de seus compostos orgânicos como triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados de ácidos cinâmicos, gliceróis etc. (Manetti, Delaporte e Laverde Junior, 2009).

Em relação à atividade inseticida, citam-se os estudos com *Bromelia antiacantha*, bromélia terrestre nativa da Mata Atlântica, sobre o Hemiptera *Oncopeltus fasciatus* Dallas (1852) (Hemiptera: Lygaidae) (Santos et al. 2009). A toxicidade dos extratos de *B.*

antiacantha encontrada sobre o Hemiptera confirma o alto índice de mortalidade (55 a 100%), mostrados com os extratos de AcoEt (200µg mL⁻¹) de *N. compacta* e *A. fasciata* sobre as larvas de *A. aegypti*. Em contrapartida o extrato hexânico de *N. compacta* apresentou toxicidade abaixo de 50% sobre as larvas de *A. aegypti*. Estes dados mostraram que a atividade larvicida foi obtida com o extrato de AcoEt tanto para *N. compacta* como para *A. fasciata*.

Estudos de Candido (2011) com os óleos vegetais de *R. communis* (mamona) e *C. phyllacanthus* (favela) sobre larvas L3 de *A. aegypti* demonstraram que os óleos vegetais daqueles vegetais apresentaram toxicidade ao larval (L3) (90%); o estágio de pupa demonstrou ser susceptível aos extratos vegetais avaliados; que os tais extratos causaram mortalidade significativa dos mosquitos; que o aumento da exposição aos produtos implica na utilização de menores concentrações dos extratos vegetais para atividade pupicida de 100%; que óleos extraídos das sementes possuem maior potencialidade no controle de larvas e pupas; que concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ de *C. phyllacanthus* e *R. communis* alteraram o ciclo de vida do *A. aegypti*, reduzindo o índice de emergência de adultos tais como se obteve com extrato de AcoEt de *N. compacta* em concentração de 10µg mL⁻¹ (58%); que os extratos de mamona atuam negativamente em pelo menos algum estágio do ciclo de vida de *A. aegypti*, semelhante a extratos de 100µg mL⁻¹ e 200µg mL⁻¹ de *N. compacta* que foram letais a larvas do 4º estágio (L4).

Estudada a ação de extrato hexânico de *N. compacta* sobre larvas de terceiro instar (L3) de *A. aegypti* pode-se acrescentar que este, nas concentrações de 10, 100 e 200 µg mL⁻¹ não apresentaram toxicidade sobre as larvas de 3º estágio (L3), as pupas e os adultos de *A. aegypti*, além da viabilidade de 100% entre L3-adultos no extrato dissolvido em acetona (testemunho). O extrato hidroalcoólico de *N. compacta* nas concentrações utilizadas, de 10, 100 e 200µg mL⁻¹, não apresentou toxicidade significativa sobre a viabilidade e o desenvolvimento larval (L3 e L4) e pupal.

O extrato bruto de acetato de etila de *N. compacta* apresentou maior eficácia, nas concentrações de 100 e 200µg mL⁻¹ sobre L3, L4 e pupas quando comparado aos extratos hidroalcoólico e hexânico da mesma espécie de bromélia.

Em extrato de acetato de etila de *A. fasciata* a eficácia da concentração 200µg mL⁻¹ expressou-se

semelhante ao extrato de acetato de etila de *N. compacta*, eliminando as larvas L3 em menos de um dia e consequentemente impedindo seu desenvolvimento.

A toxicidade do extrato de AcoEt de *N. compacta* (200µg mL⁻¹) sobre L4 foi de 100%. Tais resultados indicam o uso do extrato de *N. compacta* na concentração de 200µg mL⁻¹ no controle de formas imaturas de *A. aegypti*, também confirmando a ação de extratos de fumo (*Nicotina tabacum*), inseticida largamente estudado, que apresentou potencial larvívica, mas não como ovívica em *A. aegypti* como registrado por Quirino et al. (2009).

Consoli et al. (1988) utilizando extratos de vinte e nove espécies vegetais, verificaram suas influências na sobrevivência de larvas de que *A. fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae): que quando os extratos são diluídos em metanol e etanol não apresentam influência na sobrevivência de larvas; os extratos de *Anacardium occidentale*, *Agave americana*, *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Nerium oleander*, *Spatodea campanulata*, *Tibouchinas crobiculata* e *Vernonias alzmanni* reduziram a sobrevivência larvária significativamente quando em concentração de 100ppm; ainda demonstraram ação larvívica de *A. sativum* na concentração de 1 ppm e *A. occidentale* na concentração de 100 ppm., o que se pode confirmar na concentração de 100µg mL⁻¹ de extrato de AcoEt de *N. compacta* e *A. fasciata* sobre as larvas L3.

O período de desenvolvimento larval pelo extrato de AcoEt de *A. fasciata* torna-se menor nas concentrações de 10µg mL⁻¹ e 100µg mL⁻¹ (55% e 31,66%), respectivamente, e inexistente em 200µg mL⁻¹, o que significa que maiores concentrações aumentam o efeito tóxico sobre as larvas, se comparado ao desenvolvimento do grupo controle (98%) e ao grupo testemunho (93%), como demonstrado para outras espécies de bromélias estudadas por Consoli et al. (1988).

Os ensaios biológicos com os extratos brutos de *A. fasciata* e *N. compacta*, comparados ou não aos estudos encontrados sobre estas espécies de bromélias, sugerem a necessidade da purificação do extrato de acetato de etila na busca de um fito-produto natural com ação larvívica para *A. aegypti*. Este estudo é pioneiro sobre a atividade larvívica de extratos de *N. compacta* e *A. fasciata* sobre *A. aegypti* e consequentemente podendo agir como método alternativo sobre a população do principal mosquito vetor da dengue.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ): a FUSVE/USS; a Dra. Nildimar Honorio Rocha (Núcleo de Apoio e Pesquisa de Vetores–NapVE/ Parceria DIRAC-IOC-VPAAPS/ FIOCRUZ) a parceria e os ovos de *A. aegypti*; a Dr^a Ana Paula de Almeida pelas correções e sugestões; e, a Msc. Michele Teixeira Serdeiro pelas sugestões e leitura do manuscrito.

Referências

Ayres, M.; Ayres Júnior, M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. 2007 – *Bio Estat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. 5ª ed., Sociedade Civil Mamirauá: Belém (PA).

Barrera, R.1996 - Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecological Entomology*, v. 21, n. 1, p. 117–127.

Bermúdez-Monge, J.; Barrios, H. 2011 - Insectos Asociados a *Vriesea sanguinolenta* Cogn. & Marshal (Bromeliaceae). *Scientia* (Panamá), v.21, n.2, p.7-32.

Beserra, E.B.; Fernandes, C.R.M.; Sousa, J.T.; Freitas, E.M.; Santos, K. 2010 - Efeito da Qualidade da Água no Ciclo de Vida e na Atração para Oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Nov.– Dec.. *Neotropical Entomology*, v. 39, n. 6, p. 1016-1023.

Beserra, E.B.; Freitas, E.M.; Souza, J.T.; Fernandes, C.R.M.S.; Santos, K.D. 2009 - Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v.99, n.3, p.281-285.

Cabral, M.M.O.; Alencar, J.A.; Guimarães, A.E.; Kato, M.J. 2009 - Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v.25, n.1, p.103-105.

Candido, L.P. 2011 - *Bioatividade de extratos vegetais sobre os diferentes estágios do ciclo de vida de Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.1762). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental (MCTA)), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, 2010, 112p. Disponível em: <http://pos-graduacao.ascom.uepb>.

edu.br/ppgcta/?wpfb_dl=28. Acesso em: 26 mai. 2012.

Consoli, R.A.G.B.; Mendes, N.M.; Pereira, J.P.; Santos, B.S.; Lamounier, M.A. 1988 - Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevida de larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.83, n.1, p. 87-93.

Cunha, S.P.; Alves, J.R.C.; Lima, M.M.; Duarte, J.R.; Barros, L.C.V.; Silva, J.L.; Gammara, A.T.; Monteiro Filho, O.S.; Wanzeler, A.R. 2002 - Presença de *Aedes aegypti* em Bromeliaceae e depósitos com plantas no Município do Rio de Janeiro, RJ. In: Gerência de Entomologia da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.36, n.2, p.244-245.

Fabri, R.L.; Costa J.A.B.M. 2012 – *Bromelia antiacantha* Bertol. 2012 - *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. IX, n.2, p.37-48.

Forzza, R.C.; Costa, A.; Siqueira Filho, J.A.; Martinelli, G.; Monteiro, R.F.; Santos-Silva, F.; Saraiva, D.P.; Paixão-Souza, B. 2012 - Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005805>>. Acesso em: 8 jan. 2013.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurson, R.V. 1977 – Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environment Science Technology*, v.11, n.7, p. 714-719. Disponível em: <<http://www.math.montana.edu/~jimrc/classes/stat524/notes/TrimmedSpearmanKarber.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

Leite, A.C.F.C.; Kato, M.J.; Soares, R.O.A.; Guimarães, A.E.; Santos-Mallet, J.R.; Cabral, M.M.O. 2012 - Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.22, n.3, p.517-521.

Luther, H.E. 2008 - *An Alphabetical List of Bromeliad Binomials*. 11^a ed., Sarasota: The Marie Selby Botanical Gardens. Disponível em: <http://www.selby.org/sites/all/files/Bromeliad_Binomial_List_For_Web.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2012

Maleck, M.; Santos, F.C.C.; Serdeiro, M.T.; Guimarães, A.E.; Ferreira, B.; Gunaydin, K.; Almeida, A.P. 2013 - Kellin: a furanochromone with toxicity against *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera)

and *Aedes aegypti* (Diptera). *Journal of Natural Pharmaceuticals*, v.4, n.1, p.32-36.

Manetti, L.M.; Delaporte, R.H.; Laverde Junior, A. 2009 - Metabólitos secundários da família bromeliaceae. *Química Nova* [online], v.32, n.7, p.1885-1897. ISSN 0100-4042.

Manetti, L.M.; Turra, A.F.; Takemura, O.S.; Svidzinski, T.I.E.; Laverde Junior, A. 2010 - Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.4, p.406-413.

Mocellin, M.G.; Simões, T.S.C.; Nascimento, T.F.S.; Teixeira, M.L.F.; Lounibos, L.P.; Oliveira, R. L.. 2009 - Bromeliad-inhabiting mosquitoes in an urban botanical garden of dengue endemic Rio de Janeiro - Are bromeliads productive habitats for the invasive vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online], 104 (8): 1171-1176, . ISSN 0074-0276.

Morandi Filho, W.J.; Botton, M.; Grützmacher, A.D.; Giolo, F.P.; Manzoni C.G. 2006 - Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ciência Rural* [online]. Santa Maria, v.6, n.4, p.1072-1078. ISSN 0103-8478.

Motulsky, H.J. 1999 - *Analyzing data Graph Pad Prism*. San Diego, CA: Graph Pad Software Inc.; 1999.

Narciso, J.O.A. 2009 – Atividade larvicida de neolignana isolada de *Ocotea cymbarum* sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Monografia de Especialização em Entomologia Médica. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.

Park, I.K.; Schin, S.C.; Park, J.D.; Ahn, Y.J. 2002 - Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.50, p.1866-1870. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902925>>. Acesso em: 07 dez. 2012.

Prefeitura Municipal de Miguel Pereira – PMMP-Venha conhecer a cidade de Miguel Pereira visitando o site de informações da cidade e região: Miguel Pereira - O 3º Melhor Clima do Mundo - Site Oficial.

Disponível em: <<http://www.miguelpereira.com.br/>>. Acesso em 23 out.2011.

Quirino, T.F.; Beserra, E.B; Silva, J. A.; Silva, A.D; Albuquerque, I.M. 2009 - *Avaliação do potencial inseticida de extratos de Nicotiana tabacum (Solanacea) para o controle de Aedes aegypti (L.) (Diptera: culicidae)*. Anais do Congresso de Pós-graduação e Pesquisa, XVI Encontro de Iniciação Científica. Campina Grande, PB. ISSN: 2176-7963.

Santos, F.C.C.; Almeida, A.P.; Cabral, M.M.O.2009 – *Bromelia antiacantha* apresenta toxicidade para *Oncopeltus fasciatus*. Anais do VIII Encontro de Iniciação Científica. Vassouras, RJ. ISSN: 978-85-88187-13-9.

Serpa, L.L.N.; Costa, K.V.R.M.; Voltolini, J.C.; Kakitani, I. 2006 - *Variação sazonal de Aedes aegypti e Aedes albopictus no município de Potim, São Paulo*. *Revista de Saúde Pública*. [online]. v.40, n.6, p. 1101-1105. ISSN 0034-8910.

Siddiqui, B.S.; Gulzar, T.; Mahmood, A.; Begum, S., Khan, B.; Afshan, F.2004 - *New insecticidal amides from petroleum ether extracto of dried Piper nigrum L. whole fruits*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*(Tokyo), v.52, p.1349-52.

Silva, H.H.G.; Silva, I.G. 1999 - *Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [online], v.32, n.4, p.349-355. ISSN 0037-8682.

Silva, H.H.G.; Silva, I.G., Santos, R.M.G.; Rodrigues Filho, E.; Elias, C.N. 2004 - *Atividade larvicida de taninos isolados de Magonia pubescens St. Hil. (Sapindaceae) sobre Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, n.5, p.396-399.

Silva, I.G.; Guimarães, V.P.; Lima, C.G.; Silva, H.H.; Elias, C.N.; Mady, C.M.; Silva, V.V.M.; Nery, A.P.; Rocha, K.R.; Rocha, C.; Isac, E. 2003 - *Efeito*

larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em criadouros artificiais. *Revista de Patologia Tropical*, v.32, n.1, p.73-86.

Silva, N.N.F.; Gomes, J.M.L. 2003 - *Bromeliaceae do Sítio Morro do Céu, Serra, ES*. *Natureza on line*, [online], v.1, n.2, p.1–11.

Sokal, R.R.; Rohlf, J.F. 1979 - *Biometria. Principios y Métodos Estadísticos em la Investigación Biológica*, H Blume, Madrid, 832 p.

Sousa, G.M.; Wanderley, M.G.L. 2000 - *Aechmea Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil*. *Acta Botânica Brasileira*. [online], v.14, n.1, p.77-97. ISSN 0102-3306.

Varejão, J.B.M.; Santos, C.B.; Rezende, H.R.; Bevilacqua, L.C.; Falqueto, A. 2005 - *Criadouros de Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [online], v.38, n.3, p.238-240. ISSN 0037-8682.

Williams, C.A.1978 - *The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the bromeliaceae*. *Phytochemistry*, v.17, n.4, p.729–734.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1970 - *Health aspects of chemical and biological weapons*. Geneva, Switzerland: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/csr/deliberedemics/biochem1stenglish/en/>. Acesso em: 28 Jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2009 - *Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva, Switzerland: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/048-59.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2011.

Yano, M. 2003 - *Estudo químico e farmacológico de Neoregelia cruenta (R. Graham) LB. Smith (Bromeliaceae)*. *Biblioteca Virtual em Saúde: Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, s.n; ago. 175p.