Perfil químico de extratos da *Dizygostemon riparius* (Plantaginaceae) e sua aplicação como larvicida frente ao *Aedes aegypti.*

Autor: Suzi Morais Aires Martins, suzi.aires@ifma.edu.br, Laboratório de Biomassa, Programa de Pós-Graduação em Química Ambiental, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Campus São Luis-Monte Castelo, 65030-005, São Luís, MA, Brasil. Orcid: https://orcid.org/0000-0003-3987-8542.
Orientadora: Kiany Sirley Brandão Cavalcante, kiany@ifma.edu.br, Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto Federal do Maranhão, Campus São Luis-Monte Castelo, 65030-005, São Luis, MA, Brasil. Orcid: https://orcid.org/0000-0002-6196-516X.

RESUMO
Dizygostemon riparius é uma planta aromática do gênero bitípico da família Plantaginaceae recentemente encontrada no Cerrado Maranhense, sendo registrada em 2019. Uma herbácea cujo óleo essencial do morfotipo lilás indica potencial larvicida contra a espécie *Aedes albopictus*. Contudo, dados exíguos da nova espécie vegetal na literatura implicam a necessidade de estudos químicos e biológicos, sendo este trabalho o primeiro estudo do perfil químico dos seus extratos e atividade larvicida contra o *A. aegypti* (MARTINS, 2023). Os extratos brutos acetato de etila e metanólico da biomassa foliar apresentaram rendimento de 17,60 e 25,96%. As análises por CLAE-UV-ESI-IT/MS confirmaram a presença de polimetoxiflavonas e cumarina como, isorhamnetina-3-galactosídeo-7-ramnosídeo, 5,7-diidroxi-3-(3-hidroxi-4,5-dimetoxifenil)-6-met oxi-4-benzopirona e 3',5-dihidroxi-4',6,7-tri metoxiflavona. O ensaio larvicida evidenciou maior resposta para o extrato acetato de etila, cujo valor de IC_{50} foi de 542,2±11,5 $\mu g.mL^{-1}$. Os resultados mostrados nesta pesquisa evidenciam o potencial químico e biológico da nova espécie e abrem perspectivas para estudos futuros com foco no isolamento e identificação de outros metabólitos secundários ativos para o conhecimento das potencialidades da planta.
Palavras-chave: *Metabolitos Secundários, Flavonas, Dengue, Larvicida*

1. Introdução

Os mosquitos do gênero *Aedes* têm gerado preocupação para os órgãos de saúde pública, pois são os principais artrópodes que contribuem para a proliferação de doenças tropicais, como dengue, uma doença viral endêmica em mais de 100 países, principalmente nas áreas tropicais em desenvolvimento, como México, Nicarágua e Brasil (BERRY et al., 2019; OPAS, 2018). As medidas de prevenção e controle são as principais estratégias estabelecidas pela organização mundial de saúde, no entanto, o controle químico ainda é o mais utilizado, onde emprega pesticidas sintéticos como organofosforados, carbamatos e piretróides para reduzir e/ou eliminar a população de mosquitos em áreas onde o vírus é prevalente. A principal desvantagem dos métodos de controle químicos em detrimento aos métodos de controle biológico é que o primeiro possui como característica serem persistentes no ambiente com tendências de acumulação na cadeia trófica.

Com base nisto, surgiu-se a necessidade de desenvolver compostos inseticidas biodegradáveis mais seguros empregando substância a base de metabólitos secundários de plantas (MARTINS et al., 2021). A exemplo destaca-se a *Dizygostemon* que é um gênero bitípico da família Plantaginaceae, originária no nordeste do Brasil que teve a primeira espécie identificada em 1846, a *Dizygostemon floribundum* localizada no Estado do Piauí. Atualmente o gênero ganhou destaque no meio científico por conta de uma nova planta popularmente conhecida como melosa, localizada no município de São Benedito do Rio Preto, a leste do Estado do Maranhão e identificada em 2019 como *Dizygostemon riparius*. Essa se diferencia por apresentar dois morfotipos, flor lilás e flor branca, onde destaca-se por ter caules esparsamente tomentosas e sépalas ligeiramente mais longas que o tubo da corola (SCATIGNA et al., 2018; SCATIGNA et al., 2019). Por ser um gênero pouco estudado, devido a existência de duas espécies, há poucos trabalhos publicados na literatura. O trabalho pioneiro da *D. riparius* (BRANDÃO et al., 2020),

demonstra que a composição química do óleo essencial do morfotipo lilás possui um perfil químico monoterpênico com potencial larvicida contra larvas de *Aedes albopictus.* Sabendo que os extratos vegetais possuem incontáveis aplicações biológicas, estes são potencialmente estudados para o desenvolvimento de fármacos e bioprodutos de origem natural, menos tóxicos ao meio ambiente e ao homem. Nesse sentido, ao encontro das preocupações ambientais mencionadas e diante de uma espécie ainda pouco explorada, a originalidade deste trabalho está contida em ser o primeiro estudo realizado para os extratos da *D. riparius* no que se refere ao perfil químico e atividade larvicida.

2. Objetivos

O objetivo desta pesquisa foi investigar a composição química dos extratos da espécie *Dizygostemon riparius* (Plantaginaceae) e sua atividade larvicida contra o *Aedes aegypti.*

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal

O material vegetal da *D. riparius* (SisGen= A4E886F) foi coletado em uma região com ausência de ações antrópicas às margens do Rio Preto no município de São Benedito do Rio Preto no Maranhão, Brasil (3°19'22.8"S 43°30'57.6"W). As folhas colhidas passaram pelo processo de separação, limpeza e secagem à sombra em temperatura ambiente por 7 dias. Em seguida triturados em moinho de fluxo contínuo (TE-651/2- Tecnal) em 1730 RPM, com malha de 8 mm.

3.2. Extração

Os extratos brutos foram obtidos pelo método de extração sólido-líquido por maceração, no qual 180 g do material vegetal triturados foram acrescentados de acetato de etila P.A. (99,5%; DINÂMICA) e a mistura armazenada em temperatura ambiente (28°C) por 4 dias. O extrato bruto foi filtrado e o processo de extração repetido por mais 2x com a biomassa residual. O mesmo procedimento foi realizado com álcool metílico (99,9%, Merck). Os EACE e EMC foram concentrados em um evaporador rotativo a vácuo a uma temperatura de 40 °C, com pressão de 500 a 750 mm3Hg, posteriormente foram liofilizados, pesados e armazenados a 4°C.

3.3. Caracterização Química por CLAE-UV-ESI-IT/MS

Os extratos EACE e o EMC passaram pelo processo clean-up para remoção de interferentes em matrizes sólidas com solventes polares por extração em fase sólida (SPE) (HAKME and POULSEN, 2021). Eles foram analisados usando um sistema de cromatografia líquida Shimadzu Prominence com duas bombas injetoras automáticas Shimadzu LC-20AD (SIL-20A HT). Uma coluna C_{18} Phenomenex Gemini (250 x 4,6 mm - 5 μm) foi usada nas análises. A fase móvel foi acidificada com água ultrapura (0,1% HCOOH) e metanol grau HPLC, também acidificado (0,1% HCOOH), a uma taxa de fluxo de 1,0 $mL.min^{-1}$, com o gradiente de metanol: 5-100% de metanol em 0-60 min e 100% em 10 min. O volume de injeção foi de 10,0 μL. O CL foi acoplado a um espectrômetro de massa (Amazon X, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com ionização por eletrospray (ESI) e um analisador do tipo ion-trap (IT) em modo negativo, nas seguintes condições: tensão capilar 5 kV, capilar temperatura 325 °C, fluxo de gás de arrastamento (N_2) 12 $L.min^{-1}$, pressão do nebulizador de nitrogênio a 10 psi. O intervalo de aquisição foi de 100–1500 m/z.

3.4. Determinação de Polifenóis Totais e da Atividade Antioxidante dos extratos

A quantidade de compostos fenólicos totais nos extratos foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi., 1965 e Sousa et al., 2007). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi estimada a partir da curva analítica do ácido gálico com equação da reta com $R^2 = 0,9993$ e expressa em miligrama ácido gálico por grama de extrato (mg de AG/g de extrato ± DP). Com relação a Atividade Antioxidante Total (AAT) dos extratos brutos elas foram determinadas pelo método DPPH (Rufino et al, 2006) e Nascimento et al., 2011).

3.5. Avaliação ecotoxicológica dos extratos

O teste de toxicidade foi realizado segundo o bioensaio com *Artemia salina* (ABNT, 2016). O comportamento dos microcrustáceos frente aos EACE e EMC foram verificados em oito concentrações além da realização de dois testes controles, na ausência dos extratos, para validar os ensaios. O monitoramento foi realizado em 24 e 48 horas após a inserção dos náuplios no ambiente de teste, para analisar a quantidade de microcrustáceos vivos e mortos.

3.6. Avaliação da Atividade Larvicida dos extratos

Os bioensaios foram realizados, conforme metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde, com adaptações. Ovos do mosquito *A. aegypti* foram coletados em ambiente urbano, utilizando-se armadilhas de oviposição (ovitrampas). As larvas foram expostas a oito diferentes concentrações dos extratos (10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu g.mL^{-1}$). Cada concentração foi preparada em triplicata (WHO, 2005; WHO, 2009). Foram preparadas soluções estoques de 10.000 $\mu g.mL^{-1}$ para os extratos e as devidas diluições. Para o controle, as larvas foram mantidas em água destilada e também foi feita uma solução de DMSO/Tween 80 na mesma concentração utilizada para fazer a solução estoque. O controle positivo foi realizado com o padrão piriproxifeno (Sigma, 98% pureza) a 0,01 mg. mL^{-1} (GSC, 2014). Os ensaios foram realizados em quintuplicata nas concentrações de 200 a 1000 $\mu g.mL^{-1}$ para os extratos. Cada réplica continha 10 larvas no 3° ínstar e 20 mL de solução. O monitoramento de 24 h foi feito para contabilizar o número de larvas mortas e vivas nesse intervalo de tempo. As larvas foram identificadas em microscópio óptico, de acordo com a visualização de escamas do 8º segmento larval em comparação com chaves de identificação larval (CONSOLI, OLIVEIRA, 1994; DIVE, 2015).

As taxas de mortalidade foram expressas em porcentagem de mortalidade (M%). Os dados experimentais são apresentados por média e desvio padrão. O limite de confiança foi estabelecido em 95% ($p < 0,05$). O potencial de letalidade dos bioativos presentes nos extratos foi avaliado pela determinação das concentrações letais a 50% (CL_{50}) e a 90% (CL_{90}) de probabilidade na mortalidade das larvas de *A. aegypti*. Para determinar a CL_{50} e CL_{90} foi utilizado a metodologia de regressão dos dados experimentais a um modelo matemático com abordagem estatística. A regressão linear foi utilizada para analisar os dados com perfil retilíneo (equação mostrada nos resultados e discussão), enquanto, a regressão logística foi utilizada para analisar dados com perfil sigmoidal (HOSMER-JR et al., 2013). As equações utilizadas para a determinação da CL_{50} e CL_{90} estão representadas pelas equações 1 e 2:

$$S = S_{Max} + \frac{S_{Min} - S_{Max}}{1 + (C/LC_{50})^{P_L}} \quad \text{(Equação 1)} \qquad LC_{90} = 10^{(logP_L + \frac{log9}{P_L})} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde S = susceptibilidade probabilística (0 - 1 ou 0 - 100%) de uma determinada classe de indivíduos submetidos a uma substância qualquer, S_{Max} = máxima susceptibilidade, S_{Min} = mínima susceptibilidade, C = concentração da espécie ativa, CL_{50} = concentração com probabilidade de 50% de letalidade e P_L = potencial relacionado a letalidade, quanto maior for o valor, mais próximas estarão as concentrações letais, tal como, CL_{50} e CL_{90} (concentração com probabilidade de 90% de letalidade). A qualidade de ajuste do modelo foi avaliada pelo coeficiente de determinação do ajuste para a regressão logística ou linear (R_{Adj}^2). Para obter os dados provenientes das regressões foi utilizado o programa computacional Origin pro 8.5.

4. Resultados e discussão

4.1. Perfil cromatográfico dos extratos brutos da Dizygostemon riparius: Análise por CLAE-UV-ESI-IT/MS

A identificação dos constituintes por CLAE-UV-ESI-IT/MS nos extratos brutos das folhas da *D. riparius* permitiu a observação de 17 picos (íons moleculares) no comprimento de onda 254 nm, dentre os quais quatorze foram identificados como compostos fenólicos pertencentes a uma

variedade de classes de produtos naturais. A identificação estrutural dos possíveis compostos foi realizada através da análise do modo de ionização negativo (Figura 1). Os resultados provenientes das análises foram comparados com bancos de dados entre eles o MassBank. Além disso, foram comparadas as abundâncias relativas dos íons fragmentos obtidos para cada pico cromatográfico. Os constituintes químicos identificados a partir dos extratos das folhas encontram-se na Tabela 1.

Figura 1. Cromatogramas comparativos de CLAE-UV-ESI-IT/MS, obtido para os extratos acetato de etila (a) e metanólico (b).

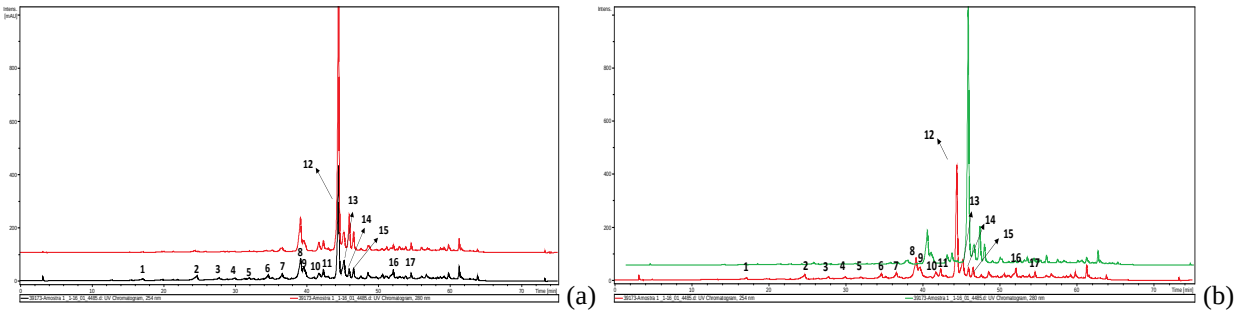


Tabela 1. Compostos identificados a partir do extrato bruto metanólico das folhas da *Dizygostemon riparius* por CLAE-ESI-IT/MS

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Massa [M-H]	Íons fragmentos MS/MS	Nome proposto
1	17,3	363	191	Dímero de ácido quínico
2	25,2	375	329; 161	NI
3	27,6	623	461; 315	Isorhamnetina 3-galactosídeo-7-ramnosídeo
4	23,4	363	335; 219	2-2-(3,4-dimetoxifenil)-7-metoxi-3,4-di-hidro-2H-cromeno- 3,4,5,6-tetrol
5	33,2	393	347; 329	7-hidroxi-5-metil-2-(2-oxopropil)-8-[(2S, 3R , 4R ,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxano-2-il] cromen-4-ona (Aloesina)
6	34,7	377	331	Impureza do solvente
7	37,3	341	311; 175	2-(2,6-dimetoxifenil)-5,6-dimetoxicromeno-4-ona (zapotin)
8	40,1	329	313; 299; 271	4',5,7-trihidroxi-3,6-di metoxiflavona
9	40,9	359	343; 329	5,7-diidroxi-3-(3-hidroxi-4,5-dimetoxifenil) -6- metoxi-4-benzopirona (irigenina)
10	42,6	345	317; 299; 255	2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-6,8- dimetoxicromen-4-ona
11	42,4	313	297; 283	5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-6,7-dimetoxicromeno-4-ona
12	44,3	329	299	4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona
13	45,2	343	327; 313; 241	3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorin)
14	46,0	343	328	Impureza do solvente
15	46,6	343	327; 313	5,7-Dihidroxi-3',4',6-trimetoxiflavona (eupatilina)
16	52,3	311	267	5,6,2'-trimetoxiflavona
17	54,5	315	269; 254	3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona

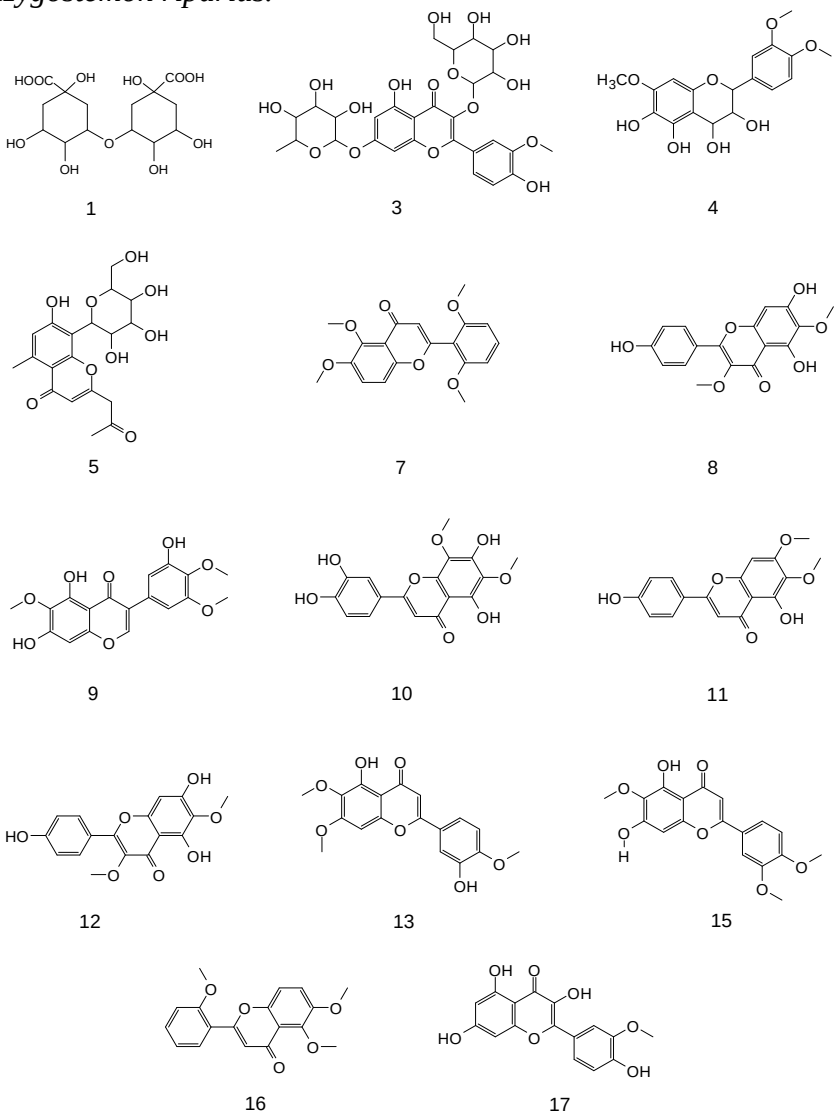
Legenda: CLAE-ESI-IT/MS. NI= Não identificado.

Os cromatogramas do extrato acetato de etila e metanólico demonstraram ter similaridade no perfil apesar de serem extraídos com solventes distintos, sendo observado apenas diferença na

intensidade dos picos de acordo com o comprimento de onda observado. As propostas estruturais dos compostos foram realizadas com base nos fragmentos, abundância relativa e comparação com dados da literatura. As estruturas dos polifenólicos identificados estão demonstradas na Figura 2.

A análise fitoquímica do extrato bruto demonstrou a presença de um dos principais grupos compostos derivados de flavonas, mais especificamente como polimetoxiflavonas. Os flavonoides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular que geralmente apresentam média e alta polaridade. Podem ocorrer livres ou glicosilados. A presença de flavonoides nos extratos de acetato de etila e metanólico podem ser explicados pela presença de agliconas livres com alto grau de metoxilação. Essas substâncias são uma das mais importantes classes de compostos encontrados nas plantas e possuem ação direta contra alguns larvicidas.

Figura 2. Estruturas dos compostos identificados a partir dos extratos acetato de etila e metanólico das folhas da *Dizygostemon riparius.*



4.2. Determinação de Polifenóis Totais e da Atividade Antioxidante dos extratos da Dizygostemon riparius

Os tipos dos compostos fenólicos extraídos e a atividade antioxidante variam mediante sua estrutura molecular e polaridade (ALAM et al. 2021). Portanto, os solventes usados durante o processo de extração têm influência na natureza e na quantidade de metabólitos secundários extraídos das plantas. Os solventes polares, como álcool metílico, comumente extraem compostos

fenólicos lipídicos e não lipídicos, glicosídeos e saponinas da matriz em estudo (BRUM; ARRUDA; ARCE, 2009) enquanto os solventes apolares, como acetato de etila, são usados para a extração de ácidos graxos e esteróides (DIRAR et al., 2019). Os extratos metanólicos apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais, sendo este 119,0 mg AG/g de extrato. Esses extratos também apresentaram inibição mais efetiva contra o radical DPPH, com IC_{50} de 48,06 $\mu g.mL^{-1}$ ± 1,19. Apesar das folhas da *D. riparius* apresentarem em sua composição a existência de flavonoides (principalmente flavonas) como 5,7-Dihidroxi-3',4',6-trimetoxiflavona (Eupatilina) e 5,6,2'-trimetoxiflavona, notou-se que ao comparar o percentual de inibição das amostras com o padrão quercetina (IC_{50}= 4,67 ± 1,14) obteve-se valores mais altos que o esperado. Esse fato pode ser atribuído aos tipos de compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais e suas respectivas propriedades químicas, como a natureza hidrofílica, o número de grupos hidroxilas e por conta de grande parte das flavonas identificadas no extrato serem metoxiladas, o que diminui a disponibilidade de grupos (OH-) no meio reacional e por consequência diminuem a atividade antioxidante do extrato (MUNTEANU; APETREI, 2021).

4.3. Avaliação ecotoxicológica de extratos da Dizygostemon riparius

A toxicidade da *D. riparius* foi determinada a partir da taxa de mortalidade dos microcrustáceos após 48 horas de exposição a oito concentrações dos extratos brutos. Os testes controles, realizados na ausência dos extratos, não apresentaram mortalidade superior a 10% da população de *Artemias*, o que segundo a norma da ABNT (2016), é considerado confiável para testes controles. Os testes apresentaram uma taxa crescente de mortalidade com o aumento da concentração dos extratos acetato e metanólico, o que favorece a relação dose-efeito e na determinação do valor da concentração letal cinquenta. O extrato AcOEt e MeOH apresentaram CL_{50} de 87,3 e 28,7 mg. L^{-1}, respectivamente.

Apesar do extrato acetato demonstrarem serem menos nocivos para as *Artemias*, de acordo com a avaliação toxicológica para extratos vegetais, eles são classificados como potencialmente tóxicos; assim como os extratos metanólicos, pois conforme a definição estabelecida por Amarante (2011) os valores de CL_{50} encontrados são inferiores a 100 mg. L^{-1}. Esta toxicidade pode ser justificada pela abundância de alcaloides e/ou compostos fenólicos presentes na planta (MARTINS et al., 2021b), o que resulta em um indicativo para possíveis atividades biológicas como ação antifúngica e inseticida, visto que grande parte dessas bioatividades são provenientes desses compostos (ROSA et al., 2016).

4.4. Avaliação da atividade larvicida

A atividade larvicida dos extratos da *D. riparius* foi testada em nove concentrações diferentes que variaram entre 200 - 1000 $\mu g.mL^{-1}$ para EMC e EACE. Os testes foram realizados em quintuplicata para cada concentração e o percentual de mortalidade foi obtido através da média e desvio padrão. A Tabela 3 apresenta as concentrações e a taxa de mortalidade após 24 horas de exposição. Nos testes de suscetibilidade das larvas de *A. aegypti*, obteve-se mortalidade crescente em função do aumento da concentração. A inexistência de mortalidade em todos os grupos controles negativos indica que o DMSO e o Tween 80 utilizados no preparo dos extratos, não afetaram o desenvolvimento larval.

O ajuste dos dados ao modelo logístico ou linear determinaram os valores de CL_{50} e CL_{90} para os extratos, o maior potencial larvicida foi evidenciado para o EACE, cujo valor correspondeu a 582,3±23,0 $\mu g.mL^{-1}$. Enquanto a estimativa para o EMC foi de 2628,5±135,0 $\mu g.mL^{-1}$ para o ajuste linear. Ao realizar o controle positivo não observou-se mortalidade das larvas em 24h e 48h. No entanto, já esperava-se esse resultado, visto que o piriproxifeno atua na interrupção do hormônio juvenil dos mosquitos, no entanto sua produção ainda é presente na fase larvária, sendo esta interrompida ao final do 4º ínstar larval quando a atuação do piriproxifeno é mais efetiva. Portanto, se verifica o efeito de prolongação do tempo que o vetor se mantém como larva, que

pode chegar até 20 dias. Esse composto tem pouco efeito sobre a mortalidade de larvas, no entanto, é efetivo em pupas e na inibição de emergência do inseto adulto (GSC, 2014). Outros estudos relataram resultados semelhantes, a exemplo pode-se destacar o trabalho realizado por Carvalho et al. (2020), onde a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* variou de 0,6 a 2,0%, e a de pupas de 99 a 88%. Nesse sentido, a atividade larvicida expressa pelo extrato acetato de etila da *Dizygostemon riparius* representa um dado inovador por se tratar de um resultado inédito para literatura científica e com atuação na fase larvária, gerando grande potencial biotecnológico.

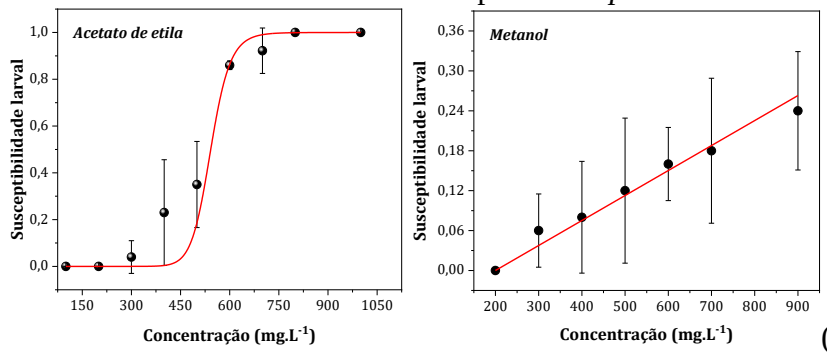
Tabela 3. Ação larvicida dos extratos das folhas da *D. riparius* após 24 horas de exposição.

Extrato	Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)	Mortalidade (%)	CL_{50} ($\mu g.mL^{-1}$)	CL_{90} ($\mu g.mL^{-1}$)	P_L / Slope	R_{Adj}^2
EACE	200	0.0	517.6±14.0	582.3±23.0	18.6±4.5	1.000*
	300	4.0				
	400	23.0				
	500	35.0				
	600	86.0				
	700	92.2				
	800	100.0				
EMC	200	0.0	1544.6±79.3	2628.5±135.0	$3.7x10^{-2}$±$1.9x10^{-3}$	0.985**
	300	6.0				
	400	8.0				
	500	12.0				
	600	16.0				
	700	18.0				
	900	24.0				
Piriproxifeno	10	0.0	--	--	--	--

Legenda: * Sigmoidal fit; ** Linear fit ($S = 3.7x10^{-2}C - 7.5$, metanol)

O perfil larvicida dos extratos brutos foliares acetato de etila e metanol da espécie *D. riparius* frente às larvas de *A. aegypti* foram exibidos na Fig. 3. Os perfis de ajuste sigmoidal e linear da suscetibilidade, respectivamente, dos extratos brutos acetato de etila e metanólico para as folhas refletem o aumento da mortalidade com o aumento da dosagem. Assim, as CL_{50} e CL_{90} indicam que a eficácia de letalidade para os extratos das folhas aumentam com o aumento da concentração do EMC e EACE, porém, os valores de CL_{50} e CL_{90} do EACE mais próximos mostram uma maior letalidade do mesmo. O caráter dos compostos presentes na folha da planta expressa maior letalidade frente às larvas de *A. aegypti* de acordo a polaridade, visto que, a diferença na atividade biológica está relacionada à quantidade de cada composto nos extratos. O extrato de acetato de etila extraiu os compostos apolares em maior quantidade e esses compostos apolares podem ser responsáveis pelo efeito biológico encontrado (Dirar et al., 2019).

Fig. 3. Perfil larvicida dos extratos brutos foliares da espécie *D. riparius* frente larvas de *A. aegypti*.



(a) (b)

Legenda: Extrato acetato de etila (a), extrato metanólico (b)

Após o contato com os extratos em estudo, as larvas apresentaram agitação inicial e tornaram-se letárgicas com o decorrer do tempo, fazendo movimentos desordenados até completa paralisação. Esses efeitos colaterais, de acordo com a literatura, são causados por conta da absorção dos compostos, que pode acontecer através do sifão respiratório, cutícula ou ingestão, podendo atuar de forma local ou de maneira sistemática (Luz et al., 2020).

A presença de compostos como taninos, saponinas, cumarinas, alcaloides e flavonoides, interferem no desenvolvimento de insetos (Granados-Echegoyen et al., 2019). Além disso, muitos desses compostos desempenham um papel importante como mediadores ecológicos, contribuindo diretamente com os sistemas de defesa das plantas. Nos estudos direcionados por Baskar et al (2014), observou-se que um dos compostos de grande relevância identificado foi a pectolinaringenina (5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxi-flavona) isolada do extrato clorofórmio das folhas de *Clerodendrum phlomidis* Lf. Esse composto trata-se de uma flavona metoxilada e provou afetar o sistema de desintoxicação dos insetos *Earias vittella* e *Helicoverpa armigera* através da redução das atividades de glutationa S-transferase (GST) e esterase. Além desse mecanismo de ação, de acordo com Muthu et al. (2015), a pectolinaringenina também exibiu atividade antialimentar nos insetos *Earias vittella* e atividade larvicida em larvas de *A. aegypti* (Muthu et al. 2012). Dos compostos identificados no CLAE-ESI-IT/MS para a *D. riparius*, nota-se a presença de compostos derivado das flavonas, as polimetoxiflavonas, a exemplo, pode-se destacar a eupatilina (5,7-dihidroxi-3',4',6-trimetoxiflavona), a qual possui fórmula estrutural semelhante a pectolinaringenina, com diferença de apenas mais uma metoxilação no carbono 3.

Outro estudo que pode-se destacar foi o realizado por Barbehenn e Constabel (2011), onde a inclusão de extratos foliares de *Calluna vulgaris* (Ericaceae) em uma dieta artificial à base de taninos, causou uma diminuição significativa no desempenho larval de *Operophtera brumata* (L.) sendo esta associada com diminuição da digestão de proteínas, desse modo, os taninos reduzem consistemente o crescimento e a sobrevivência das larvas, pois essas moléculas inativam as enzimas digestivas e dão origem a um complexo tanino-proteína de difícil digestão. Já as cumarinas, do mesmo modo que os alcaloides, podem atuar como inibidores da acetilcolinesterase (AcheI), uma enzima que promove a captação de acetilcolina nas sinapses neuronais, levando à paralisia e morte das larvas (Khanikor et al., 2013). Porém, é difícil associar a atividade biológica apenas a uma única substância, pois sabe-se que existem uma diversidade de compostos presentes nos extratos brutos (Ravi et al., 2018), então frequentemente essa ação biológica ocorre devido a uma ação sinérgica entre os constituintes presentes (Ravindran et al., 2020). Outro fator que também pode acontecer é a supressão dessa atividade em função de interferentes presentes na matriz. Devido a isso, alguns trabalhos na literatura reportam a aplicação de substâncias isoladas e purificadas para o estudo de atividades biológicas (Chabán et al., 2019).

5. Conclusão

Através do estudo químico de dereplicação por LC-MS, é possível concluir que as polimetoxiflavonas são compostos encontrados em abundância nos extratos da planta e parecem ser os quimiomarcadores da espécie *D. riparius*. A identificação das polimetoxiflavonas como quimiomarcadores obtém também amparo de alguns estudos que incluem os flavonoides metoxilados, como alguns dos marcadores químicos anotados e com ação larvicida.

Referências

ABNT, NBR. 16530. Ecotoxicologia Aquática–Toxicidade Aguda–Método De Ensaio Com *Artemia sp* (Crustacea, Brachiopoda) 2016.

ALAM, M.Z.; ALHEBSI, M.S.R.; GHNIMI, S.; KAMAL-ELDIN, A. Inability of total antioxidant activity assays to accurately assess the phenolic compounds of date palm fruit (*Phoenix dactylifera L.*). **NFS Journal**, [s. l.], v. 22, p. 32-40, jan 2021.

AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; POVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.

BARBEHENN, R. V.; CONSTABEL, C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1551-1565, set. 2011.
BASKAR, K.; MUTHU, C.; IGNACIMUTHU, S. Effect of pectolinaringenin, a flavonoid from *Clerodendrum phlomidis*, on total protein, glutathione S-transferase and esterase activities of Earias vittella and *Helicoverpa armigera*. **Phytoparasitica**, v. 42, n. 3, p. 323-331, fev. 2014.
BERRY, I. M.; EYASE, F.; POLLETT, S.; KONONGOI, S. L.; JOYCE, M. G.; FIGUEROA, K.; OFULA, V.; KOKA, H.; KOSKEI, E.; NYUNJA, A.; MANCUSO, J. D.; JARMAN, R. G.; SANG, R. Global Outbreaks and Origins of a Chikungunya Virus Variant Carrying Mutations Which May Increase Fitness for *Aedes aegypti:* Revelations from the 2016 Mandera, Kenya Outbreak. **Am J Trop Med Hyg**, v. 100, ed. 5, p. 1249–1257, jul. 2019.
Brandão, C.M., Cavalcante, K.S.B., Teles, R.M., Marques, G.E.C., Monteiro, O.S., Andrade, E.H.A., MAIA, J.G.S. Composition and larvicidal activity of the oil of *Dizygostemon riparius* (Plantaginaceae), a new aromatic species occurring in Maranhão, Brazil. Chem. Biodivers. 17, e2000462, 2020.
BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; ARCE, M. A. B. R. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 9 jul. 2009.
CARVALHO, B.L., GERMANO, R.N.L., BRAGA, K.M.L., ARAÚJO, E.R.F.D., ROCHA, D.D.A., OBARA, M.T. Susceptibility of *Aedes aegypti* populations to pyriproxyfen in the Federal District of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v, 53, e20190489. 2020 https://doi.org/10.1590/0037-8682-0489-2019.
CHABÁN, M. F.; KARAGIANNI, C.; JORAY, M. B.; TOUMPA, D.; SOLA, C.; CRESPO, M. I.; PALACIOS, S. M.; ATHANASSOPOULOS, C.M.; CARPINELLA, M.C. Antibacterial effects of extracts obtained from plants of Argentina: Bioguided isolation of compounds from the anti-infectious medicinal plant Lepechinia meyenii. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 1-9, jun. 2019.
Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L., 1994. Major mosquitoes of sanitary importance in Brazil, first ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.
DIRAR, A.I.; ALSAADI, D.H.M.; WADA, M.; MOHAMED, M.A.; WATANABE, T.; DEVKOTA, H.P. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 261-267, nov. 2019.
DIVE (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA). **Guia De Orientação Para Treinamento De Técnicos De Laboratório De Entomologia,** 2015.Disponível em:<https://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/capacitacao/guia-orientacao-treinamento-de-tecnicos.pdf. >Acesso em: out. 2021
FABRICK, J. A.; YOOL, A. J.; SPURGEON, D. W. Insecticidal activity of marigold Tagetes patula plants and foliar extracts against the hemipteran pests, Lygus hesperus and Bemisia tabaci. **PLOS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1-15, mar. 2021.
GRANADOS-ECHEGOYEN, C. A.; CHAN-BACAB, M. J.; ORTEGA-MORALES, B. O.; VÁSQUEZ-LÓPEZ, A.; LAGUNEZ-RIVERA, L.; DIEGO-NAVA, F.; GAYLARDE, C. Argemone mexicana (Papaverales: Papavaraceae) as an Alternative for Mosquito Control: First Report of Larvicidal Activity of Flower Extract. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 261-267, jan. 2019.
GSC-Governo de Santa Catarina, Orientações para uso do larvicida pyriproxyfen 0,5G no programa de controle da dengue em Santa Catarina, 2014. Disponível em :<https://www.dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agravos/Dengue/Publicacoes/CONTROLE%20VETORIAL/4-%20Orienta%C3%A7%C3%A3o%20T%C3%A9cnica%20Pyriproxyfen.pdf.> Acesso em : agost. 2022).
HAKME, E.; POULSEN, M. E. Evaluation of the automated micro-solid phase extraction clean-up system for the analysis of pesticide residues in cereals by gas chromatography-Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1652, p. 1-11, jun 2021.
Hosmer Jr, D.W., Lemeshow, S., Sturdivant, R.X., 2013. Applied logistic regression, third ed. John Wiley and Sons, New Jersey.
KHANIKOR, B.; PARIDA, P.; YADAV, R.N.S.; BORA, D. Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 2, p. 006-012, fev. 2013
LUZ, T. R. S. A.; MESQUITA, L. S. S.; AMARAL, F. M. M.; COUTINHO, D. F. Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti L.*(Diptera: Culicidae) larvae. **Acta Tropica**, v. 212, 2020.
MARTINS, A.C.R.; COSTA, J.K.N.; HERBERT, A.; FARIAS, F.R.S.; REZENDE, M.; JUNIOR, V.A.K.; GEUS, J.L. Avaliação da toxicidade das tinturas de aroeira e de romã através do bioensaio com *Artemia salina.* **Research, Society and Development**, v. 10, ed. 3, p. 1-9, mar. 2021b.
MARTINS, R.L., RODRIGUES, A.B.L., RABELO, E.M., SANTOS, L.L., BRANDÃO, LB., FAUSTINO, C.G., FARIAS, A.L.F., SÁ, D.M.C., CANTUARIA, P.C., GALARDO, A.K.R., ALMEIDA, S.S.M.S. Development of larvicide nanoemulsion from the essential oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng against *Aedes aegypti*, and its toxicity in non-target organism. **Arab. J. Chem**. 14, 103148, 2021.
MARTINS, R.L., RODRIGUES, A.B.L., RABELO, E.M., SANTOS, L.L., BRANDÃO, LB., FAUSTINO, C.G., FARIAS, A.L.F., SÁ, D.M.C., CANTUARIA, P.C., GALARDO, A.K.R., ALMEIDA, S.S.M.S. Development of larvicide nanoemulsion from the essential oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng against *Aedes aegypti*, and

its toxicity in non-target organism**. Arab. J. Chem**. 14, 103148, 2021.
MARTINS, S.M.A., CAVALCANTE, K.S.B., TELES, R.M., BRANDÃO, C.M., GODINHO, A.S., SILVA, L.K., HOLANDA, C.A., ROCHA, C.Q. Chemical profiling of *Dizygostemon riparius* (Plantaginaceae) plant extracts and its application against larvae of *Aedes aegypti L*. (Diptera: Culicidae). **Acta Trop**., 237, 106706, 2023.
MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), Combate ao *Aedes Aegypti*: Prevenção e controle da Dengue, Chikungunya e Zika, (2018). Disponível em: < http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/aedes-aegypti.> Acesso em: Set. 2022.
MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), *Controle de vetores*, (2019). Disponível em: < https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/combate-ao-aedes.> Acesso em: Setem. 2022).
MUNTEANU, I.G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, 3380, v. 22, n. 7, p. 1-30, mar. 2021.
MUTHU, C.; BASKAR, K.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Bioefficacy of pectolinaringenin from Clerodendrum phlomidis Linn. F. against Anopheles stephensi and bhendi fruit borer, Earias vittella fab. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 358-366, jun. 2015.
MUTHU, C.; REEGAN, A. D.; KINGSLEY, S.; IGNACIMUTHU, S. Larvicidal activity of pectolinaringenin from Clerodendrum phlomidis L. against Culex quinquefasciatus Say and *Aedes aegypti L*.(Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, sep. 2012.
OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de Dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev Bras Plantas Med**, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016
OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde. *Dengue*. 2018. Disponível em:<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>. Acessado em: jul. 2022.
RAVI, R.; ZULKRNIN, N. S. H.; ROZHAN, N. N.; YUSOFF, N. R. N.; RASAT, M. S. M; AHMAD, M. I.; ISHAK, I. H.; AMIN, M. F. M. Chemical composition and larvicidal activities of Azolla pinnata extracts against *Aedes* (Diptera:Culicidae).**PLOS ONE**, p. 1-18, nov. 2018.
RAVINDRAN, D. R.; BHARATHITHASAN, M.; RAMAIAH, P.; RASAT, M. S. M.; RAJENDRAN, D.; SRIKUMAR, S.; ISHAK, I. W.; SAID, A. R.; RAVI, R.; AMIN, M. F. M. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Flower Extracts from Clitoria ternatea against *Aedes* (Diptera: Culicidae). **Hindawi: Journal of Chemistry**, p. 1-9, set. 2020.
RODRÍGUEZ, M. M.; RUIZA, A.; PIEDRA, L.; GUTIERREZA, G.; REY, J.; CRUZ, M.; BISSET, J.A. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Boyeros municipality, Cuba and associated mechanisms. **Acta Tropica**, v. 212, p. 1-8, out. 2020
ROSA, C.S.; VERAS, K.S; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti L*. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de Myrcia sylvatica (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 19-26, mar. 2016.
RUFINO, M.S.M et al. Metodologia Científica:Determinação da AtividadeAntioxidante Total em Frutaspelo Método de Redução doFerro (FRAP). **EMBRAPA**, Fortaleza, ed. 1, p. 1-4, dez. 2006.
SCATIGNA A. V., BRANDÃO C. M., COLLETTA G. D., TELES R. DE M., CAVALCANTE K. S. B., SOUZA V. C. & SIMÕES A. O. *Dizygostemon riparius* (Plantaginaceae, Gratioleae), a new species from Maranhão, northeastern Brazil. **Willdenowia**, v. 49, n. 2, p. 177-186, 2019.
SCATIGNA, A. V.; FRITSCH, P. W.; SOUZA, V. C.; SIMÕES, A. O. Phylogenetic Relationships and Morphological Evolution in the Carnivorous Genus Philcoxia (Plantaginaceae, Gratioleae). **American Society of Plant Taxonomists**, MM, v. 43, n. 4, p. 910-919, 2018.
SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult**, v.16, p.144-158, jan. 1965.
SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, abr. 2007.
WHO. Expert Committee on Antibiotics & World Health Organization. **Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests : second report of the Expert Committee on Antibiotics** [meeting held in Geneva from 11 to 16 July 1960]. World Health Organization, 1961. Disponível em:https://apps.who.int/iris/handle/10665/40480. Acesso em: jan.2020
WHO. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. WHO,Geneva 2005. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf. Acesso em: agos.2019.