

https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

Avaliação do potencial larvicida do extrato hidroalcóolico da *Solanum paniculatum* frente ao *Aedes aegypti*

Evaluation of the larvicidal potential of *Solanum paniculatum* hydroalcoholic extract against *Aedes aegypti*

Antonio Rony da Silva Pereira Rodrigues¹, Edinalda Maria Cavalcante².

Universidade Estadual do Ceará. E-mail: antonio.rony@aluno.uece.br; 2. Universidade Estadual do Ceará. E-mail: edinalda.biologia123@outlook.com

Resumo - A dengue é uma infecção viral sistêmica, que atualmente apresenta quatro sorotipos diferentes, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A maior parte da população mundial vive em países onde a incidência de dengue é alta, que acarreta inúmeros casos de óbitos anualmente. O estudo teve como objetivo avaliar o potencial larvicida do extrato hidroalcóolico da *Solanum paniculatum*, frente as larvas do mosquiro *Aedes aegypti*. O trabalho consiste em um estudo experimental de caráter laboratorial. O extrato hidroalcóolico de *Solanum paniculatum* foi obtido com 100 g de fruto triturado e 50 ml de água destilada e 50 ml de álcool 70%, o material foi submerso por 5 dias. O experimento foi realizado em triplicata em grupos, contendo 10 larvas de *Aedes aegypti*. As larvas foram submetidas a testes, observando a leitura de mortalidade em 12, 24, 48 e 72 horas. Os resultados demostraram que as dosagens de 100, 350, 400 μL, são as que tiveram melhor resultado, sendo a dosagem de 400 μL alcançamdo taxa de mortalidade de 100% em 24 de exposição. Desse modo, o estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre inseticidas naturais, frente ao *A. aegypti*.

Palavras-chave: Aedes aegypti; Atividade larvicida; Solanum paniculatum.

Abstract - Dengue is a systemic viral infection, which currently has four different serotypes, called DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. Most of the world's population lives in countries where the incidence of dengue is high, which causes numerous cases of deaths annually. The study aimed to evaluate the larvicidal potential of *solanum paniculatum hydroalcoholic extract*, against the larvae of the mosquiro *Aedes aegypti*. The work consists of an experimental study of laboratory character. The hydroalcoholic extract of *Solanum paniculatum* was obtained with 100 g of crushed fruit and 50 ml of distilled water and 50 ml of 70% alcohol, the material was submerged for 5 days. The experiment was carried out in triplicate in groups containing 10 larvae of *Aedes aegypti*. The larvae were tested, observing the mortality reading at 12, 24, 48 and 72 hours. The results showed that the dosages of 100, 350, 400 μL, are the most that had the best result, and the dosage of 400 μL reached a mortality rate of 100% in 24 exposures. Thus, the study contributes to the expansion of knowledge about natural insecticides, in the face of *A. aegypti*.



https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

Keywords: Aedes aegypti; Larvicidal activity; Solanum paniculatum.

Introdução

Aedes aegypti é nativo do continente africno, mas no Brasil encontrou o clima idela para se reproduzir e sobreviver, o A. aegypti é o mosquiro transmissor da febre amarela, zika, chikungunya e dengue, sendo essas doenças conhecidas como arboviroses, transmitidas por artrópodes. (DOS SANTOS, 2021)

O mosquito *A. aegypti* possui aparência branca e uma cor negra brilhante em ao longo do corpo. As fêmeas são responsáveis por depositar os ovos em reservatórios de água que servem como criadouros, preferencialmente nas bordas (FUNASA,2001). O ciclo de vida é dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa (estágio intermediário entre larva e adulto) e adultos. O vírus é transmitido pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes* que se distribui em regiões tropicais e subtropicais do mundo, predominantemente em áreas urbanas e semiurbanas (KITTAYAPONG *et al.*, 2006).

O mosquito transmite o virus DENV, que pertence à família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus. O DENV é classificado em 4 sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O DENV é caracterizado como um virus envelopado com genoma de RNA de fita única. O virus é compost por 3 componentes estruturais, que formam o capsídeo e montage das partículas virais. (GUBLER, 2002; ROSS, 2010).

O padrão de urbanização brasileiro e latino-americano é baseado na desigualdade distribuição do acesso a recursos e serviços urbanos entre grupos sociais que ocupam diferentes espaços interurbanos, favorecem o aumento da proliferação do *A. aegypti*, por ter pouco ou nenhum sanemaento básico, criando cradoros para o mosquito (JOHANSEN; CARMO; ALVES, 2014). Em geral, os grupos populacionais com acesso restrito à infraestrutura urbana são aqueles em piores condições socioeconômicas e residentes em áreas ocupadas, espaços produzidos por um processo de urbanização acelerado, incompleto e desigual (COSTA *et al.*, 2015; MARICATO, 2013; BUENO, 2008; ROLNIK & NAKANO, 2009).

A Organização Mundial da Saúde estima que entre 50 e 100 milhões de infecções causaas pelo *Aedes aegypti* ocorrem a cada ano e que quase metade da população mundial reside em países onde a dengue é endêmica (WHO, 2009). No Brasil, até a 19ª Semana Epidemiológica (SE) (período entre 2/1/2022 a 14/5/2022), foram notificados 855.910 casos prováveis de dengue, foram notificados 855.910 casos prováveis de dengue, 76.480 casos de Chikungunya e 3.140 casos provaveis de Zika, que representa um aumento de 165,7, 74,9 e 70,7%, para Dengue, Chikungunya e Zika, respectivamente, quando comparado ao mesmo período do ano passado (BRASIL, 2022).

A melhor forma de controle do mosquito continua sendo o monitoramento dos criadoros e o uso de inseticidas. Os inseticidas podem ser classificados segundo três pontos de vista: finalidade, modo de ação e origem. O uso de inseticidas gera mundialmente de bilhões de dólares na tentativa de controlar insetos. Os produtos naturais inseticidas foram muito utilizados até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço a partir da II Guerra Mundial, devido a pesquisas em produtos biocidas (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

O Aedes aegypti desenvolve uma adaptação ou aprimoramento, que lhes confere resistência aos inseticidas. Esses mecanismos de resistência estão relacionados à variabilidade



https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

genética existente nas populações do mosquito (FERREIRA *et al.*, 2022). Por isso o uso de novos métodos para controlar o mosquito se torna essencial, sendo o desenvolvimento de inseticidas naturais um meio promissor.

O Brasil abriga a mais rica biodiversidade do planeta, devido a variedade de biomas e a ampla distribuição territorial (JOLY et al., 2011). A grande variedade de substâncias químicas presentes na flora brasileira permite a busca de novos compostos inseticidas, com maior eficácia e menor danos ao meio ambiente. Para o estudo optou-se pela *Solanum paniculatum* L. A *S. paniculatum* L, é amplamente utilizada na medicina popular para tratamento de anemias, e contra afecções do estômago, do baço e do fígado (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015; LORENZI, 2008). A espécie faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

Em estudo fitoquímico, utilizando alccol a 70%, se identificou substâncias como saponinas esteoidais e ácido caféico, e em etanol 70%, se obteve saponinas esteroidais, a rutina flavonoides rutina e quercetina, que demostra a planta com múltiplas subtâncias fitoquímicas importantes (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015).

Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar o potencial larvicida do extrato hidroalcóolico do extrato de frutos de *Solanum paniculatum*, frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, a fim de desenvolver um inseticida natural que consiga impedir o desenvolvimento do ciclo de vida do mosquito.

Metodologia

Local do experimento

O presente trabalho baseia-se na sua natureza experimental de laboratório. Com base em pesquisas experimentais com extratos naturais e larvas do mosquito *A. aegypti*, no laboratório da EEM José Waldemar.

Obtenção do material vegetal e preparação dos extratos

Foi realizado coletas do material vegetal em uma fazenda particular localizado no município de Salitre, Ceará (07° 17' 05" "S 40° 27' 26"W), local onde a espécie desenvolveu-se espontaneamente, durante o mês de dezembro de 2021, em seu período reprodutivo. A espécie foi identificada pela Prof^a Rocicleia Mota. Após cada coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas imediatamente para o laboratório. Os frutos foram submetidos à limpeza em água corrente, secagem em estufa à temperatura de 65 ° C por 48 horas, foram divididos ao meio, macerados em liquidificador e adicionados em frascos hermeticamente fechados.

Para obtenção do extrato hidroalcóolico de *Solanum paniculatum* foi utilizado com 100 g de fruto triturado e posteriormente adicionado a bequer com 50 ml de água destilada e 50 ml de álcool 70%, o material foi submerso por 5 dias e em seguida o extrato foi armazenado em frasco âmbar para a luz não interferir na qualidade do extrato, esse material ficou reservdo em ambiente refrigerado a 10°C.

https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

Obtenção dos mosquitos (Aedes aegypti)

Para a coleta de *Aedes aegypti*, ovitrampas foram confeccionadas, com vasos utilizados para plantas, dentro deles foi adicionado um pedaço de madeira de mdf, que serve como material de coleta dos ovos postos pelo mosquito. Para atrair a fêmea do *Aedes* a ovitrampa, foi produzido um concentrado de capim (*Poaceae*), o capim ficou submerso em água por 15 dias até a obtenção do concentrado. Na ovitrampa foi adicionado 50 ml de concentrado de campim e 100 ml de água limpa.

As ovitrampas foram distribuídos na comunidade, sendo que a cada 7 dias as paletas de madeira eram coletadas e levadas ao laboratório para contagem e separação dos ovos de *A. aegypti*, os ovos após a contagem são imersos em água para eclodir e monitorados diariamente afim de obter as larvas e iniciar o processo de teste.

Desenvolvimentos dos ensaios laboratóriais

Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório da EEM Jose Waldemar de Alcantâra, com uso de equipamentos de proteção individual e respeitando todas as normas de segurança em laboratório. Os testes de toxicidade foram realizados com a subdivisão em 6 grupos, 2 seis deles, grupos de teste. A avaliação da atividade larvicida consistiu na utilização de 100, 200, 350, 400 μ L do produto desenvolvido. Os outros dois grupos foram controles: o primeiro com o larvicida Piriproxifeno (Controle 1), na concentração de 0,1 g, como padronizado pela Organização Mundial de Saúde, e o segundo com uma mistura de glicerina e etanol (Controle 2) nas proporções de 90,91% e 3,64% (v / v), respectivamente.

Todo o experimento foi realizado em triplicata para cada um dos grupos, contendo 10 larvas de *Aedes aegypti*, a uma temperatura de 22º a 28ºC. As larvas foram submetidas ao teste por 72 horas, sendo observada a leitura de mortalidade em 12, 24, 48 e 72 horas, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos da pipeta de Pasteur, não podendo atingir a superfície do líquido.

Os testes de toxicidade do larvicida foi realizado com filhotes de *Ceriodaphnia dubia* com 24 horas de idade, foi adicionado em recipientes 10 filhotes incubados em água destilada e concentrações diferentes de extrato de *Solanum paniculatum*. A mortalidade foi determinada após 24 horas pela visualização do indivíduo em microscópio. Por se tartar de um estudo com animais invertebrados, não necessitou de aprovação pelo Comite de Ética em Pesquisa – CEP.

Resultados e Discussão

O potencial larvicida de *Solanum paniculatum* foi avaliado em larvas de mosquitos afim de encontrar um produto natural, eficaz e seguro que no futuro possa substituir os compostos organofosforados ou outros agentes sintéticos. A primeira leitura de mortalidade de *Aedes aegypti* foram avaliadas dentro de 12 horas após o início do experimento.

O controle 1 realizado com o produto utilizado pela vigilância epidemiológica, o Piriproxifeno, apresentou 100% de larvas vivas, em 12, 24, 48 e 72 horas, comprovando que o produto inibe o desenvolvimento das características adultas do inseto, mantendo-as como larvas. O controle 2 com álcool e glicerina também apresentou 100% de larvas vivas, mostrando

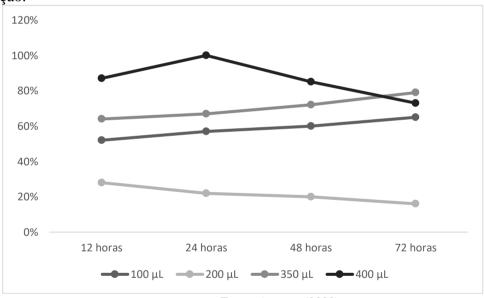
https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

que não possuem atividade biológica. A dose de $100~\mu L$ do extrato, resultou em 52% das larvas mortas nas primeiras 12 horas, a atividade larvicida passou a aumentar no decorrer das horas, registrando 57%, 60% e 65% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

A dosagem de $200~\mu L$, marcou 28% das larvas mortas nas primeiras 12 horas de contato. Registou-se que com o decorrer das horas as taxas de sobrevivência das larvas submetidas a dosagem de $200~\mu L$, tenderam a cair, registrando 22%, 20% e 16% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente. As larvas do grupo de dosagem de $350~\mu L$ tiveram taxa de mortalidade em 64%, nas primeiras 12 horas de contato, com tendência a aumento da taxa de mortalidade no decorrer das horas, 67% (24 horas), 72% (36 horas) e 79% (72 horas).

O tratamento com $400\mu L$ do produto apresentou taxa de mortalidade de 87% nas primeiras 12 horas, 100% em 24 horas, mas a taxa de mortalidade tendeu a cair em 48 e 72 horas, com valores de 85% e 73%, respectivamente. O valor indicativo mostra houve grande eficácia, possivelmente devido à interferência do triterpenos presente nos frutos, causando intoxicação direta nas larvas.

GRÁFICO 1 - Curva de mortalidade em porcentagem, dada por Dosagem x Tempo de Exposição.



Fonte: Autores (2022).

O LC₅₀ para o extrato foi calculado cruzando as curvas de larvas mortas e larvas vivas, resultando em um log estimado de 2,1, com uma concentração aproximada de 105 μ L (0,68 μ g mL-1 de extrato bruto) com um intervalo de confiança de 2013 μ g mL-1. Os resultados de toxicidade obtidos com frente a *Ceriodaphnia dúbia*, demostrou a mortalidade de todos os indíviduos nas primeiras 12 horas de contato.

Silva et al. (2008), ao avaliar os constituintes voláteis extraídos das folhas de plantas medicinais, constatou que eles favoreciam 100% de mortalidade de *A. aegypti* larvas após 24 horas a 2.000 ppm (*Hyptis fruticosa Salmz*. ex Benth), 1.000 ppm (*Hyptis pectinata* Poit) e 300 ppm (*Lippia gracilis* Schauer).

Estudos de Medeiros et al. (2012), demonstrou que extratos de Aspidosperma pyrifolium, Piptadenia stipulacea, Mimosa tenuiflora frente a larvas de A. aegypti possuem



https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

capacidade de inibir os movimentos do mosquito. Estudos separados por controle mostraram intensa mobilidade, percebida pelas contrações corporais e rápida reação a estímulos mecânicos, enquanto larvas com extratos reduziram a mobilidade.

Outros estudos realizados por Coria (2008), também afirmam que concentrações de extratos vegetais têm a capacidade de retardar o desenvolvimento de *Aedes aegypti* larvas. A dose de 100 µL teve mortalidade de 95,41%. Amer; Mehlhorn (2006), menciona que a espécie *Cymbopogon winterianus* é conhecido por sua propriedade repelente contra mosquitos e apresentou LC50 de 54,7 mg / mL e LC90 de 22 88,3 mg / mL das larvas, o que mostra efeito positivo como potencial larvicida, que causou 60% de mortalidade nas larvas após 24 horas de exposição.

Busato et al. (2015), identificou que *Melia azedarach* extratos são eficientes contra *A. aegypti* larvas. Em 48 h, apresentou eficiência de 100%, quando utilizado na concentração de 500 µg / ml e 2000 µg / ml, para folhas e frutos, respectivamente. Ressaltando que extratos de diferentes partes da planta podem apresentar atividade larvicida. Extratos de *M. azedarach*, além de ter ação larvicida sobre *A. aegypti*, foram eficazes contra larvas de outros insetos.

Muitas espécies vegetais são associadas a mortalidade de larvas, pupas e o mosquito adulto. Estudos de Porto (2008), revelaram que o óleo retirado das folhas de *Anacardium humile* causou efeito tóxico na fase larval. Usando a análise por Probit, definiu-se a CL50 na concentração de 20,9ppm, próximo a concentração de 0,025% o que torna o produto um potencial larvicida, porém de elevada toxicidade. A concentração mínima capaz de produzir mortalidade (CL10) é de 4,15ppm e a toxicidade máxima (CL90) é de 39,8ppm. O óleo extraído de folhas de causa 100% de mortalidade em larvas de 4° estádio de *Aedes aegypti* nas concentrações até 0,125%, o que indicou que os ingredientes ativos estão na fase mais apolar.

É demonstrado que muitos meios podem ser usados para reduzir doenças relacionadas a *Aedes aegypti*, por meio da utilização de plantas e seus extratos, sem causar danos ao meio ambiente e à saúde humana, e *Solanum paniculatum* provou ser um desses meios.

Considerações Finais

Os resultados demostraram que as dosagens de 100, 350, 400 μ L, são as que obtiveram melhor resultado, com destaque para a dosagem de 400 μ L, que alcançou taxa de mortalidade de 100% em 24 de exposição, mesmo com queda nas horas seguintes. A dosagem de 200 μ L, demostrou ser a menos eficiente, apresentou resultado abaixo das outras dosagens, já nas primeiras 12 horas, com queda significante da taxa de mortalidade no decorrer das horas.

É importante ressaltar que o estudo dos mecanismos de resistência e controle do vetor da dengue é de grande importância, uma vez que a dengue é considerada um problema de saúde pública em diversos países.

Diante do apresentado, o desenvolvimento de ensaios clínicos e experimentais em maior escala, dosagem e tempo são necessários, para avaliar outros aspectos e assegurar o uso. Desse modo, o estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre inseticidas naturais frente ao *A. aegypti*



https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

Conflito de interesses

Os autores deste manuscrito não declaram conflito de interesse.

Referências

AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 466-472, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Vol.53 N.19: Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 19 de 2022. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no19/view

BUENO, L. Políticas públicas do esporte no Brasil: razões para o predomínio do alto rendimento. São Paulo (SP): Escola de Administração de Empresas de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas, 2008.

BUSATO, M. A.; VITORELLO, J.; LUTINSKI, J. A.; DAL MAGRO, J.; SCAPINELLO, J. Potencial larvicida de Melia azedarach L. e Ilex paraguariensis A. St.-Hil. no controle de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae). **Ciência e Natura**, 37(2), 277-282, 2015.

CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES, G.; CARPINELLA, C.; LUDUEÑA, F.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from Melia azedarach L. on Aedes aegypti (L.)(Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3066-3070, 2008

COSTA, H. S. M.; MONTE-MÓR, R. L. M. Urbanization & Environment: trends and patterns in contemporary Brazil. **Livros**, p. 125-146, 2015.

DE MEDEIROS, V. F.; XIMENES, M. F. M.; SOUZA, J. P. C. Potencial larvicida de plantas do semi-árido do nordeste do Brasil no controle de Aedes aegypti. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012

DOS SANTOS, J. S. R. **Mosquitos assassinos: arbovírus e arboviroses**. Editora Dialética, 2021.

FERREIRA, S. M. B.; SOUZA, M. D.; DA SILVA, C. A. L. Resistência das populações de Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762)(Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas



https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 21, n. 1, p. 98-116, 2022.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Dengue instrução para o pessoal de combate ao vetor.** 2001. 2-75 p.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol**. 2002; 10:100–3.

JOHANSEN, I. C.; DO CARMO, R. L.; ALVES, L. C. Desigualdade social intraurbana: implicações sobre a epidemia de dengue em Campinas, SP, em 2014. **Cadernos Metrópole**, v. 18, p. 421-440, 2016.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S.. Diagnóstico da pesquisa em biodiversdidade no Brasil. **Revista USP**, São Paulo, n.89, p.114-133, 2011.

KITTAYAPONG, P.; CHANSANG, U.; CHANSANG, C.; BHUMIRATANA, A. Community participation and appropriate technologies for dengue vector control at transmission foci in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 3, p. 538-546, 2006.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Plantarum de Estudos da Flora Nova: H. Lorenzi, 2008.

MARICATO, E. Depoimentos. **Pós. Revista do Programa de Pós-Graduação em Arquitetura e Urbanismo da FAUUSP**, n. 14, p. 10-25, 2003.

PORTO, K. R. D. A.; ROEL, A. R.; SILVA, M. M. D.; COELHO, R. M.; SCHELEDER, E. J. D.; JELLER, A. H. Atividade larvicida do óleo de Anacardium humile Saint Hill sobre Aedes aegypti (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina** Tropical, 41(6), 586-589, 2008.

ROLNIK, R; NAKANO, K. As armadilhas do pacote habitacional. **Le monde diplomatique Brasil**, v. 2, n. 20, p. 5, 2009.

ROSS, T. M. Dengue virus. Clinics in laboratory medicine, v. 30, n. 1, p. 149-160, 2010.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on Aedes aegypti larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource technology**, v. 99, n. 8, p. 3251-3255, 2008.



https://doi.org/10.48180/ambientale.v14i3.378

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; QUINTINO DA ROCHA, C.; RODRIGUES, TdS.; HAKIKO HIRUMA-LIMA, C.; VILEGAS, W. New steroidal saponins and antiulcer activity from Solanum paniculatum L. **Food Chemistry**, v. 86, p. 160-167, 2015.

WHO - World Health Organization. Atlas of Health and Climate. Geneva, 2012. Disponível em: https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241564526