



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019001388-5 A2



(22) Data do Depósito: 23/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) **Título:** PRODUTO A BASE DO BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CROTON ARGYROPHYLLUS E CROTON TETRADENIUS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS E SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO

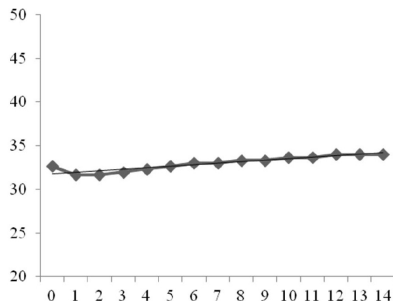
(51) **Int. Cl.:** A01N 65/18; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 65/18.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB.

(72) **Inventor(es):** RÔMULO CARLOS DANTAS DA CRUZ; KARINE DA SILVA CARVALHO; IVONE ANTÔNIA DE SOUZA; SANDRA LÚCIA DA CUNHA E SILVA; JANE SHEILA HIGINO; SIMONE ANDRADE GUALBERTO; RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA; ANTÔNIO CORREIA FREIRE.

(57) **Resumo:** presente invenção trata de um produto natural a base do blend obtido da associação dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* (velame falso) e *Croton tetradenius* (velame do campo), a ser utilizado para o controle de mosquitos, incluindo *Aedes aegypti*, transmissor de arbovírus de grande impacto na saúde pública mundial. Este produto natural pode ter diferentes formulações, sendo preferencialmente, mas não limitada, de gel-creme, onde o blend é incorporado ao polímero formador de gel, tensoativo e água destilada. A invenção também se refere a um processo de preparo do blend, sendo inicialmente obtidos os óleos essenciais isolados a partir das folhas submetidas à secagem, de cada planta, por hidrodestilação. Posteriormente, estes óleos são unidos para formar o blend, na proporção preferencial de 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*. Este blend apresenta-se tóxico às larvas de *Ae. aegypti*, ocasionando 100,0% de mortalidade, ao mesmo tempo que é seguro para uso oral em animais (5.000 mg kg⁻¹, classificado como atóxico sobre *Mus musculus*).



RELATÓRIO DESCRITIVO

PRODUTO A BASE DO BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton argyrophyllus* E *Croton tetradenius* PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS E SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃOCampo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se à obtenção e processo de preparação do produto natural a base do blend obtido da associação dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* (velame falso) e *Croton tetradenius* (velame do campo), que pode ser utilizado para o controle de mosquitos, ao mesmo tempo, que é seguro a mamíferos.

[002] São descritos os métodos de preparação de um blend na proporção preferencial de 3:7 de óleos essenciais obtidos das folhas de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius* tóxico aos mosquitos vetores, incluindo *Ae. aegypti*.

Antecedentes da invenção

[003] *Aedes aegypti* possui grande importância em saúde pública por transmitir arbovírus que causam doenças, tais como a dengue, febre amarela, chikungunya e zika. Neste sentido, diversas medidas de controle têm sido adotadas em programas integrados de controle de vetores, os quais visam reduzir a densidade populacional deste mosquito de forma que não ocasione danos à saúde humana. Entre estas medidas, se tem a utilização de inseticidas que ao serem aplicados diretamente no criadouro podem eliminar as formas imaturas consistindo no tratamento focal, ou ainda, podem ser dispersos no ar, tratamento espacial, que visa combater as formas adultas. Como exemplo do uso destes inseticidas químicos, se destaca o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que durante a década de 50 foi amplamente utilizado e eficaz. Todavia, a utilização destes inseticidas, principalmente de forma indiscriminada, resultou na seleção de populações de insetos resistentes, além de outros efeitos indesejáveis, como danos ecológicos e amplo espectro de ação, afetando organismos não-alvos.

Desta forma, torna-se urgente a busca por novas alternativas de controle, a exemplo de inseticidas de origem botânica que apresentam várias vantagens, pois são biodegradáveis, causam baixa toxicidade a organismos não-alvo, além de, possivelmente retardarem o processo de seleção de insetos resistentes, sobretudo quando preparado em forma de blend, que é resultante da associação de óleos essenciais obtidos das plantas.

[004] Dentro desse contexto, diversas plantas do gênero *Croton*, endêmicas do bioma Caatinga, tem sido promissoras quanto ao potencial inseticida, principalmente a partir de seus óleos essenciais (CARVALHO et al., 2016; CRUZ et al., 2017). Os óleos essenciais obtidos de folhas de *Croton nepetaefolius*, *Croton argyrophyloides* e *Croton sonderianus* ocasionaram 100% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, após 24 horas de exposição (Moraes et al., 2006). A atividade inseticida sobre *Ae. aegypti* de óleos essenciais de *Croton pulegioides* e *Croton heliotropiifolius* (DÓRIA et al., 2010), *Croton regelianus* (TORRES et al., 2008) e *Croton rhamnifolioides* (SANTOS et al., 2014) também já foram comprovadas. O óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri* apresentou uma atividade inibitória da oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti* (MORAIS et al., 2006; SOUZA et al., 2010).

[005] Inseticidas botânicos ou repelentes a base de *Croton* que atuem no controle de insetos ou impedindo o contato homem-vetor, respectivamente vêm sendo produzidos a fim de obter produtos mais seletivos e biodegradáveis. Dentre estes, desenvolveram-se o inseticida botânico, através da patente “*Botanical pesticide for urban greening projects and preparation method of botanical pesticide*”, sob o número CN 106490077, o qual tem como princípio ativo o extrato aquoso de *Croton tiglium*, sendo este produto eficaz para o controle de insetos-pragas que vivem em áreas urbanas. A patente “Velas contendo óleos essenciais de espécies do gênero *Croton* com atividade repelente contra mosquitos” (BR 102012010452-0 A2), estabelece a produção de velas repelentes, para proteção pessoal contra mosquitos vetores, incluindo *Aedes aegypti*. Quatro espécies de *Croton* (*Croton zehntneri*, *Croton sonderianus*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides*) são utilizadas como princípio ativo destas velas repelentes.

[006] A partir de óleos essenciais podem ser preparados os blends os quais também podem apresentar atividade inseticida. Os blends caracterizam-se por um conjunto de substâncias bioativas com moléculas químicas maiores e/ou menores e formas estruturais diversificadas. A união destes metabólitos poderá facilitar interações que possam aumentar ou diminuir determinadas atividades biológicas, em relação ao subproduto isolado (DIAS; MORAIS, 2014), demonstrando assim a importância da complexidade química existente em um blend. Quando se observa a potencialização de uma determinada bioatividade, a exemplo da atividade inseticida, sustenta-se a ideia em utilizar produtos naturais com um maior nível de complexidade (WALIWITIYA et al., 2009; DIAS; MORAIS, 2014), o qual poderá dificultar ainda mais o processo de seleção de insetos resistentes, em função da diversidade das substâncias químicas que podem apresentar mais de um modo de ação no mosquito-alvo.

[007] Há diversos documentos relativos ao processo de preparação de produtos naturais destinados ao controle de mosquitos vetores, embora nenhum destes descreva sobre a produção de inseticida que contenha o blend obtido a partir de óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*, para o controle de mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*. Diferentes formulações a base deste blend podem ser realizadas, sendo a preferencial, mas não limitante, em gel-creme que contem, o blend, polímero formador de gel, tensoativo e água destilada. A patente "Composição larvicida à base de produtos naturais e seu uso" (PI0304485-8) descreve um produto a ser utilizado para o controle de larvas de insetos. Neste caso, a formulação envolve uma composição à base do limoneno, componente químico presente no óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja), associado à lactato de etila, etanol, um tensoativo alimentício e água. No entanto, o tensoativo usado é derivado de reações de esterificação de carboidratos e ácidos graxos que, além de possuir alto custo de produção poderá também aumentar a quantidade de matérias orgânicas na água favorecendo, assim, uma possível alimentação de larvas do mosquito, e consequentemente o não combate ao vetor.

Produto natural a base do blend de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, alvo desse pedido de patente, pode ser formulado em gel-creme, onde este blend é incorporado ao gel-base que possui a trietanolamina como tensoativo. Este tensoativo, além de possuir um baixo custo, atua no balanço do potencial hidrogeniônico da solução, e não apresenta riscos de produzir camada orgânica na água.

[008] A patente PI0602039-9 "Extrato aquoso purificado de seus derivados com atividade inseticida sobre larvas de mosquitos de importância à saúde pública: pernilongos (Diptera: Culicidae) e borrachudos (Diptera: Simuliidae)", apresenta um extrato aquoso purificado com propriedade inseticida, que possui como princípios ativos, componentes da casca da árvore de *Aceda meamsii* (acácia-negra), os taninos ou ainda, taninos modificados, e complexados com diferentes metais, sais éteres, ésteres e metais alcalinos e metais alcalinos terrosos. Esta patente apresenta como vantagem um método mais simples que é a obtenção de extratos aquosos, todavia a utilização de óleos essenciais pode ser mais eficaz, visto que estes possuem compostos bioativos lipossolúveis o que facilita seu modo de ação no mosquito-alvo, ao atravessar facilmente as membranas biológicas que são constituídas por bicamada de fosfolípidios. A patente internacional "*Pesticidal compositions containing isopropyl myristate and analogs of same as a synergist for plant essential oils*" (US 2007009870 A1), também descreve a composição de inseticidas, que podem ser em forma de gel contendo uma mistura de óleos essenciais de vegetais como ingredientes ativos, além da adição de substâncias químicas sinergistas. Contudo, a adição de substâncias sinergistas, aumenta o custo das formulações inseticidas, que diferente do presente pedido de patente já possui na própria mistura de seus óleos essenciais a ação sinérgica sem necessitar, portanto, da adição destas substâncias químicas.

[009] As patentes nacionais (PI 1013475-1 A2, BR 102012030893-2 A2) e a internacional (US 6623766 B1) tratam de produtos naturais com propriedades inseticidas a partir de óleos essenciais de plantas, isolados ou em blend, que se apresentam em formas de emulsão.

Todavia, deve-se ter cautela durante o processo de tais formulações, haja vista que uma emulsão poderá ser mais instável termodinamicamente, retornando ao estado original óleo/água e, portanto, resultar na perda da sua solubilidade em água. A obtenção do blend de óleos essenciais das espécies de *Croton*, alvo do presente pedido patente, poderá ter diferentes formulações, tais como gel, gel-creme, emulsão, entre outras. A formulação em gel-creme, a qual poderá ser caracterizada pela inserção do blend de óleos essenciais em um polímero que forma gel, tem como vantagem a garantia de uma maior estabilidade e, conseqüentemente, garantia da sua solubilidade no meio aquoso, com a liberação dos componentes ativos do blend, os quais são tóxicos às larvas de mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*.

[010] Assim, este pedido trata da obtenção e preparação de um blend formado pela associação de óleos essenciais de duas plantas (*C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*). Este blend que possui atividade inseticida poderá ser aplicado diretamente em depósitos de água que atuam como criadouros de mosquitos (filtros de água, tanques, piscinas, caixas d'água, etc.), ocasionando mortalidade das larvas de mosquitos, através do tratamento focal. Este invento possui aplicabilidade no âmbito industrial mediante a sua demanda e o processo de produção ser pouco oneroso. A obtenção deste blend é uma novidade absoluta visto que, o mesmo nunca foi popularmente ou cientificamente divulgada visando, assim, proporcionar uma inovação tecnológica voltada para geração de novos produtos naturais com atividade inseticida.

[011] A invenção possui diversas vantagens, sendo este blend de origem natural, seguro a mamíferos, biodegradável e de baixo impacto ambiental. A aplicação direta de blends de óleos essenciais no meio aquático, quando da sua utilização como inseticida, por exemplo, se torna inviável, diante da sua baixa solubilidade, volatilização e oxidação de substâncias bioativas. Assim, a aplicação do blend formado por óleos essenciais em diferentes formulações, incluindo de gel-creme garante a solubilidade e eficácia dos constituintes inseticidas deste blend.

Além disso, o blend na proporção de 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, apresenta uma maior atividade larvicida e redução da toxicidade aguda sobre animais, em relação aos óleos essenciais isolados de *Croton*, o que ressalta a propriedade inseticida e segura deste blend nesta proporção.

[012] A utilização do blend a partir de dois vegetais também favorece a valorização de mais de uma espécie botânica, o que é essencial para a conservação da biodiversidade, sobretudo da Caatinga, bioma que se encontra criticamente ameaçado e ao mesmo tempo abriga diversas plantas com propriedades medicinais. A extração destes recursos vegetais, a partir das folhas, sem a destruição completa das plantas poderá proporcionar ainda, uma fonte de renda para famílias do entorno, ocasionando assim um impacto positivo no âmbito social do referente pedido de patente de invenção.

[013] A seguir serão apresentadas as figuras que compreendem avaliação toxicológica do blend de óleos essenciais de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* sobre camundongos e o mosquito *Ae. aegypti*, bem como o processo de preparação deste blend.

[014] Figura 1. Apresenta o peso médio (eixo das ordenadas) em relação ao período de observação de 14 dias (eixo das abscissas) dos camundongos administrados via oral (VO) com o blend na proporção 3:7 dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*, na dose de 2000 mg kg⁻¹ (a) e o grupo controle (b).

[015] Figura 2. Apresenta o percentual de mortalidade de larvas entre o terceiro e quarto instar de *Ae. aegypti* (eixo das ordenadas) em relação ao tempo de exposição ao gel-creme do blend na proporção 3:7 dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius* (eixo das abscissas).

[016] Figura 3. Descreve o processo de preparação do blend na proporção preferencial de 3:7 dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*, que possui atividade inseticida. A primeira etapa consiste na secagem das folhas de cada planta (*C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*) (1A e 2B). Após a secagem individual das folhas de cada vegetal, estas são trituradas separadamente (2A e 2B).

Na sequência, realiza-se o processo de hidrodestilação através do aparelho de Clevenger modificado de cada material vegetal individualmente (3A e 3B), e consequentemente a extração dos óleos essenciais de cada vegetal, isoladamente (4A e 4B). Posteriormente, realiza-se a formação do blend que consiste na união dos óleos essenciais individuais na proporção preferencial de 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* para uso como inseticida sobre mosquitos, incluindo *Aedes aegypti* (5 e 6).

Descrição da invenção

[017] A obtenção e o processo de preparação do blend a partir da associação dos óleos essenciais de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* inicia-se com a coleta das folhas destas plantas, que posteriormente, são submetidas à secagem para posterior extração dos óleos essenciais de cada vegetal isoladamente. Em seguida, os óleos essenciais são misturados em uma proporção preferencial de 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, para formar o blend que se apresenta tóxico a insetos. Após obtenção do blend, diferentes formulações a base deste podem ser feitas, incluindo gel-creme, onde inicialmente se prepara um gel-base, contendo polímero formador de gel, tensoativo e água destilada como dispersante. Depois, a este gel-base se mistura o blend, tornando-se gel-creme por ação dos óleos essenciais, o qual se mantém tóxico a insetos.

Etapa 1 - Extração e rendimento dos óleos essenciais

[018] Para a extração dos óleos essenciais das folhas das espécies de *Croton* logo após a coleta no período matutino, estas foram submetidas à secagem por 12 horas, através de estufa de circulação de ar regulada a 40 °C e 50 °C, para *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, respectivamente. Os óleos essenciais para cada vegetal foram obtidos separadamente por hidrodestilação, a partir de 100,0 g de folhas em 1,5 L de água deionizada, através do aparelho de Clevenger modificado, durante 3 horas a 100 °C. Os óleos essenciais obtidos foram desidratados pela adição de sulfato de sódio anidro. Os óleos essenciais foram obtidos com um rendimento de 0,48% e de 2,73%, para *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, respectivamente. Desta forma, o método de extração foi adequado e reprodutível para a obtenção destes óleos essenciais.

Etapa 2 - Preparação do blend a partir dos óleos essenciais

[019] Diferentes proporções do blend na concentração de 0,3 mg mL⁻¹ foram preparadas a fim de identificar aquela com uma melhor atividade larvícida sobre mosquitos, além de apresentar segurança quanto ao uso para mamíferos, uma vez que muitos dos depósitos que atuam como criadouros para as fases imaturas de mosquitos, contêm água potável. Cada proporção foi preparada a partir de: 9,5:0,5 8:2; 7:3; 3:7; 2:8 e 0,5:9,5 (v/v) de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, respectivamente.

Etapa 3 - Atividade larvícida do blend

[020] Para avaliar o potencial inseticida das diferentes proporções do blend de óleos essenciais de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* e eleger aquela com uma maior atividade, foram realizados bioensaios. Nos bioensaios foram utilizadas 30 larvas entre terceiro e quarto instar de *Ae. aegypti* por repetição, totalizando 180 larvas por tratamento. As larvas foram colocadas em recipientes semi acrílico (6,5 cm x 5,0 cm), contendo água deionizada. Cada proporção do blend foi solubilizada com uma solução de Tween 80 e água deionizada (1,8%), e essa mesma proporção foi utilizada para a obtenção das soluções estoque do grupo controle. O blend formado na proporção de 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* apresentou uma melhor atividade larvícida sobre *Ae. aegypti* em condições de laboratório, apresentando diferença significativa em todos os períodos de observação, quando comparado ao blend produzido com as demais proporções (Tabela 1). Após 8 horas de exposição, o blend 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* ocasionou uma mortalidade superior a 50% das larvas de *Ae. aegypti*, o que não ocorre quando o blend é preparado com as demais proporções. O mesmo após 24 horas ocasionou 96,9% de mortalidade larval, sendo significativamente mais tóxico às larvas (Tabela 1). A mortalidade das larvas foi diretamente proporcional ao tempo de exposição, na proporção 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*, respectivamente ($\hat{y} = 19,9x - 23,2$ e $R^2 = 0,97$). Portanto, o blend nesta proporção apresenta a melhor atividade larvícida.

Tabela 1. Percentual de mortalidade de larvas entre o terceiro e quarto instar de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes proporções do blend obtido a partir dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*.

Blend (v/v)	Mortalidade (%) ^a (h)					
	1	2	4	8	16	24
9,5:0,5 <i>C. argyrophyllus</i> e <i>C. tetradenius</i>	1,1 ^b	1,1 ^b	3,3 ^b	16,7 ^{cd}	43,9 ^c	44,9 ^c
8:2 <i>C. argyrophyllus</i> e <i>C. tetradenius</i>	1,1 ^b	1,1 ^b	6,7 ^b	18,3 ^{cd}	38,3 ^c	38,9 ^c
7:3 <i>C. argyrophyllus</i> e <i>C. tetradenius</i>	0,0 ^b	0,5 ^b	11,7 ^b	19,4 ^{cd}	39,4 ^c	70,9 ^b
3:7 <i>C. argyrophyllus</i> e <i>C. tetradenius</i>	4,4 ^a	12,2 ^a	28,3 ^a	56,7 ^a	81,7 ^a	96,9 ^a
2:8 <i>C. argyrophyllus</i> e <i>C. tetradenius</i>	0,0 ^b	2,8 ^b	12,8 ^b	37,4 ^b	65,1 ^b	80,2 ^b
0,5:9,5 <i>C. argyrophyllus</i> e <i>C. tetradenius</i>	0,0 ^b	3,3 ^b	13,3 ^b	32,8 ^{bc}	54,4 ^{bc}	69,9 ^b

^{1a}Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Etapa 4 - Constituintes químicos do blend dos óleos essenciais

[021] A análise da composição química do blend formado na proporção de 3:7 dos óleos essenciais de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* foi realizado por Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas. Esta análise identificou 30 diferentes compostos, classificados em monoterpenos e sesquiterpenos. Cânfora (20,2%), γ -terpineol (16,2), (E)-cariofileno (7,5%) e espatulenol (5,1%) foram os componentes majoritários identificados neste blend (Tabela 2).

Tabela 2. Principais constituintes químicos do blend preparado na proporção de 3:7 dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*.

Blend	(%) ^a	IRL ^b	IK ^c
Cânfora	20,2	1075	1146
γ -Terpineol	16,2	1224	1199
(E)-Cariofileno	7,5	1279	1419
Espatulenol	5,1	1393	1578

^aConstituintes listados por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms;

^bÍndices de retenção com coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; ^cÍndices de Kovats em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007).

Etapa 5 - Atividade toxicológica do blend sobre mamíferos

[022] Para avaliar a toxicidade aguda sobre mamíferos do blend *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* (3:7) foram utilizadas fêmeas de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) com idades entre 90 e 120 dias. O teste de toxicidade aguda foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (número de registro 0030/2018). Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30 cm x 13 cm x 20 cm), em condições controladas de fotoperíodo (12:12 horas, claro:escuro) e temperatura (22 ± 2 °C). A alimentação foi suspensa 12 horas antes do ensaio e a água foi liberada *ad libitum*. O blend foi solubilizado com Tween 80 e água deionizada a 1,8%, e administrado via oral, introduzido no trato digestório dos animais, através de uma cânula metálica acoplada a seringa (gavagem), com a dose de 2000 mg kg⁻¹. A mesma proporção de Tween 80 e água deionizada foi utilizada para obtenção da solução estoque do grupo controle, sem a presença do blend. Este bioensaio foi realizado seguindo a metodologia segundo a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 423/2001). A categoria toxicológica do blend foi estimada conforme o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos. Os sinais clínicos foram observados individualmente, após a administração no período de 60 minutos e, a cada 24 horas, durante 14 dias.

[023] Os sinais clínicos observados foram relacionados ao Sistema Nervoso Central (SNC) e ao Sistema Nervoso Autônomo (SNA). O peso corporal e a mortalidade dos animais também foram analisados. A relação entre o peso dos camundongos e o período de observação foi avaliada a partir do cálculo do coeficiente da correlação de Pearson, sendo a sua significância verificada pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. A toxicidade aguda em *Mus musculus* via oral com a dose de 2000 mg kg⁻¹ deste blend não ocasionou sinais clínicos de alta magnitude, e não houve mortalidade, assim como nos animais do grupo controle, em condições de laboratório.

[024] Os camundongos demonstraram somente dois sinais clínicos de intensidade moderada (ereção de cauda e piloereção). Os sinais clínicos relacionados ao SNC, tais como convulsão tônica clônica, parada cardiorrespiratória e reação de fuga foram manifestados, assim como os referentes ao SNA, por exemplo, contorções, diurese e excreção fecal, sendo estes de fraca intensidade, os quais foram similares aos manifestados pelos animais do grupo controle. Quanto ao peso corporal foi possível detectar uma redução entre o primeiro e o segundo dia de observação tanto no grupo tratado com a dose de 2000 mg kg⁻¹ (Figura 1a) como no grupo controle (Figura 1b). Esta redução possivelmente está relacionada ao período em que a alimentação foi suspensa 12 horas antes do ensaio, seguida da administração do blend. Após o segundo dia de observação, o peso dos animais submetidos à dose de 2000 mg kg⁻¹ aumentou em relação ao período de observação ($\hat{y} = 0,1x + 31,6$ e $R^2 = 0,8$) apresentando uma correlação positiva, forte ($r = 0,9$) e significativa ($p < 0,05$) (Figura 1a). O mesmo ocorreu com os animais do grupo controle, havendo um aumento de peso dos animais em relação ao período de observação ($\hat{y} = 0,1x + 34,5$ e $R^2 = 0,3$), com uma correlação positiva e forte ($r = 1$) (Figura 1b).

[025] Após estas análises, o blend de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* (3:7) administrado via oral em camundongos apresentou uma Dose Letal média (DL₅₀) estimada de 5000 mg kg⁻¹, sendo classificado na categoria 5 (ausência de toxicidade), ratificando, portanto, que o blend nesta proporção apresenta-se seguro quanto ao seu uso oral para mamíferos.

Etapa 6 - Obtenção do gel-creme inseticida

[026] O blend de óleos essenciais de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* (3:7) (v/v) ativo sobre larvas de mosquitos, bem como atóxico via oral para camundongos, foi empregado na formulação de gel-creme. Para tanto, utilizou-se o componente gelificante, o polímero acrílico espessante e formador de gel na proporção de 1%, o carbopol, e o componente tensoativo, a trietanolamina (molhante) na proporção de 1%. A trietanolamina é um tensoativo aniônico, com alta solubilidade em água e de baixo custo. A essa mistura também foi adicionada uma porção de água destilada como dispersante obtendo-se um gel translúcido.

Após homogeneização vigorosa e contínua, foi adicionado o restante da água destilada vagorosamente, homogeneizando a mistura, e finalmente adicionou-se o blend oleoso transformando o gel anteriormente translúcido em um gel-creme de cor branca e de aspecto leitoso (ver formulação abaixo).

Fórmula percentual do gel-creme

Carbopol.....1

Trietanolamina.....1

Blend de *Croton*.....0,6

H₂O_{dest}.....qsp.....100

Etapa 7 – Avaliação da atividade larvica do gel-creme

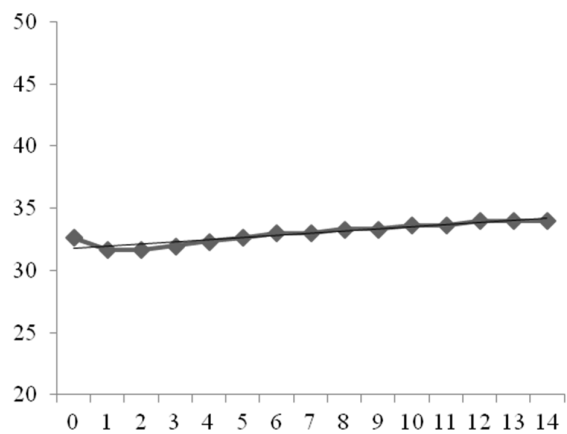
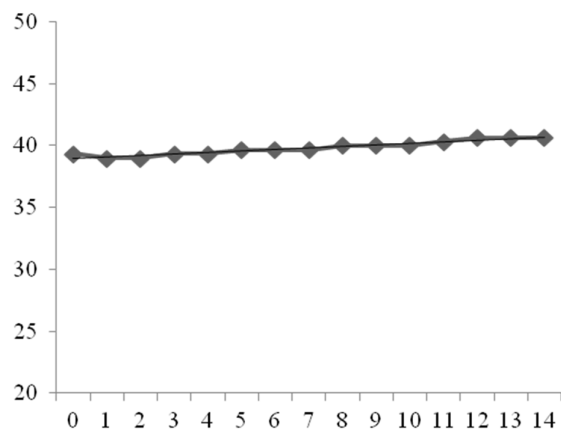
[027] A atividade larvica do gel-creme o qual tem como princípio ativo o blend de óleos essenciais *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius* (3:7) foi investigada, e a Figura 3 mostra uma visão geral desde a obtenção dos óleos essenciais até a atividade inseticida apresentada pelo blend. As larvas de *Ae. aegypti* foram expostas a 1,68 g deste gel-creme. No grupo controle, as larvas foram expostas a 1,68 g do gel não incorporado ao blend. Como resultado, foi observado mais de 90% de mortalidade larval após 12 horas de exposição, e foi alcançada a mortalidade total (100%) após 16 horas, ratificando assim o potencial inseticida deste gel-creme sobre larvas de *Ae. aegypti* (Figura 2) em condições de laboratório. Não houve mortalidade larval no grupo controle.

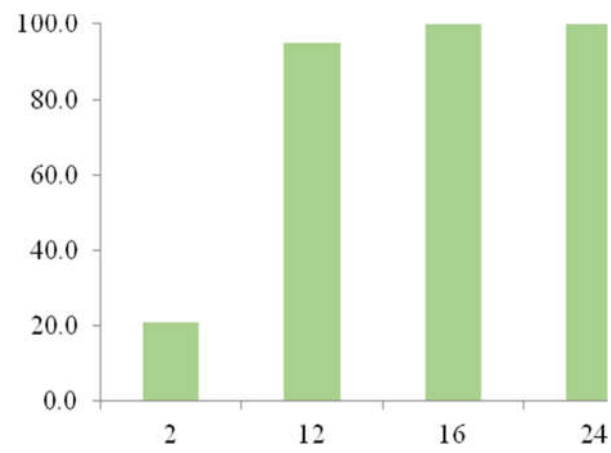
REIVINDICAÇÕES

1. Produto a base do blend de óleos essenciais, caracterizado por ser obtido da associação dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*.
2. Produto a base do blend de óleos essenciais de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser na proporção preferencial de 3:7 de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*, para uso como inseticida.
3. Produto a base do blend de óleos essenciais de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por ser formulado como gel-creme, a partir da incorporação do blend ao gel base que é composto por formador de polímero, tensoativo e água destilada.
4. Produto a base do blend de óleos essenciais de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela utilização do blend na proporção de 0,6%.
5. Produto a base do blend de óleos essenciais de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela utilização do polímero formador de gel ser o carbopol na proporção de 1%.
6. Produto a base do blend de óleos essenciais de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo tensoativo ser a trietanolamina na proporção de 1%.
7. Processo de preparo do blend obtido na reivindicação 1, caracterizado por compreender as etapas de:
 - a) Secagem em separado das folhas de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*;
 - b) Trituração em separado das folhas da etapa (a);
 - c) Hidrodestilação em separado das folhas da etapa (b) para extração de cada óleo essencial de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*, isoladamente;
 - d) União dos óleos essenciais da etapa (c) para formar o blend resultante da mistura de *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*.

8. Processo de preparo do blend de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de na etapa (a) a submissão das folhas à secagem ser em estufa com duração de 12 horas, a temperatura preferencial de 40 °C e 50 °C para *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*, respectivamente.
9. Processo de preparo do blend de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de na etapa (b) ser triturado preferencialmente de forma manual.
10. Processo de preparo do blend de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de na etapa (c) a hidrodestilação ser realizada utilizando 100 g de cada vegetal em 1,5 L de água deionizada, a 100 °C, durante 3 horas.

FIGURAS

**Fig. 1a****Fig. 1b**

**Fig. 2**

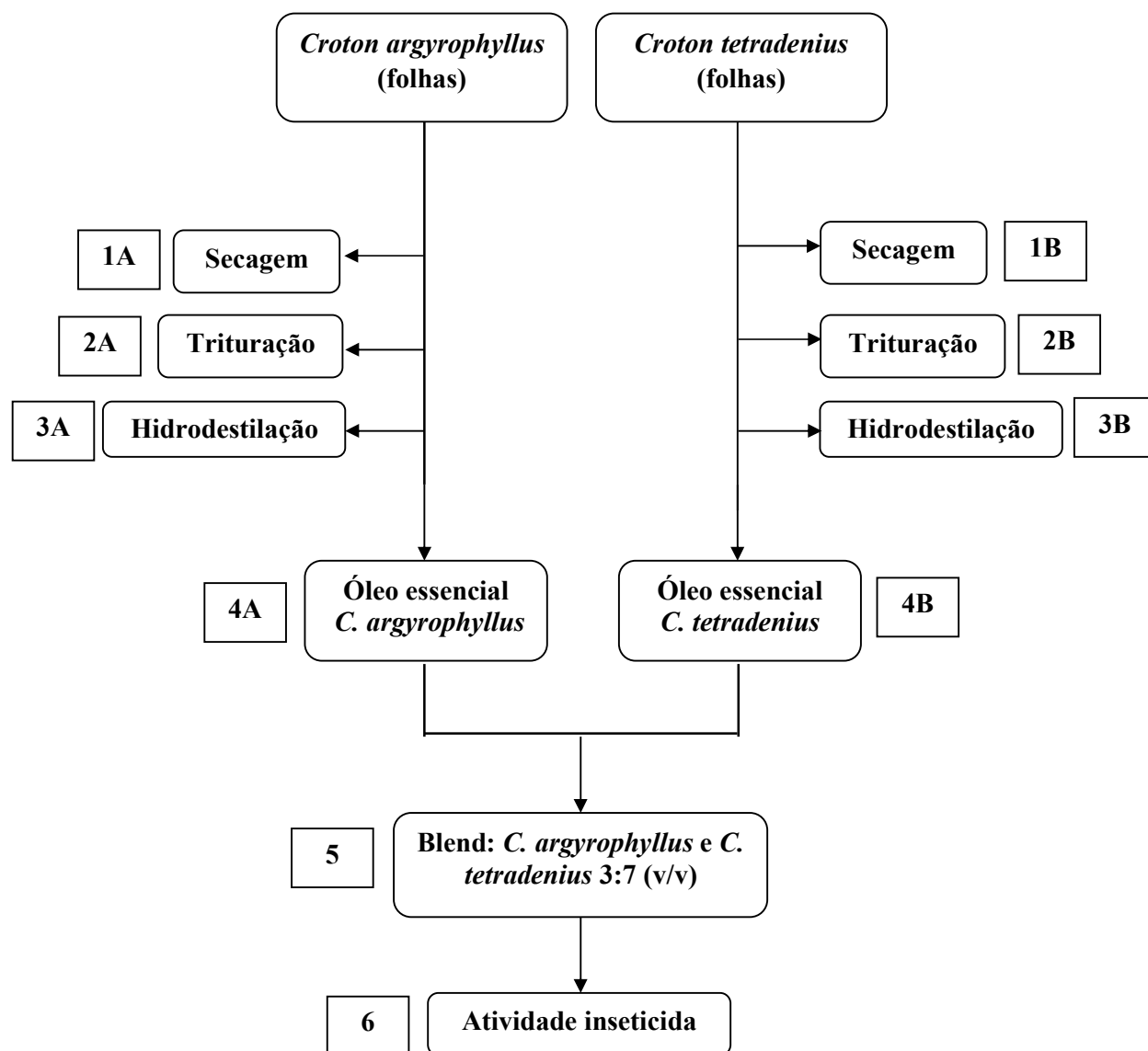


Fig. 3

RESUMO

PRODUTO A BASE DO BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton argyrophyllus* E *Croton tetradenius* PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS E SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO

A presente invenção trata de um produto natural a base do blend obtido da associação dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* (velame falso) e *Croton tetradenius* (velame do campo), a ser utilizado para o controle de mosquitos, incluindo *Aedes aegypti*, transmissor de arbovírus de grande impacto na saúde pública mundial. Este produto natural pode ter diferentes formulações, sendo preferencialmente, mas não limitada, de gel-creme, onde o blend é incorporado ao polímero formador de gel, tensoativo e água destilada. A invenção também se refere a um processo de preparo do blend, sendo inicialmente obtidos os óleos essenciais isolados a partir das folhas submetidas à secagem, de cada planta, por hidrodestilação. Posteriormente, estes óleos são unidos para formar o blend, na proporção preferencial de 3:7 de *C. argyrophyllus* e *C. tetradenius*. Este blend apresenta-se tóxico às larvas de *Ae. aegypti*, ocasionando 100,0% de mortalidade, ao mesmo tempo que é seguro para uso oral em animais (5.000 mg kg⁻¹, classificado como atóxico sobre *Mus musculus*).