



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

(21) BR 102020015619-5 A2



(22) Data do Depósito: 30/07/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 08/02/2022

(54) **Título:** FORMULAÇÃO À BASE DE GERMACRENO-D-4-OL PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO AEDES AEGYPTI

(51) **Int. Cl.:** A01N 31/06; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 31/06.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA; JARDIM BOTÂNICO DO RECIFE.

(72) **Inventor(es):** BHEATRIZ NUNES DE LIMA ALBUQUERQUE; MARCELO FELIPE RODRIGUES DA SILVA; AFONSO CORDEIRO AGRA NETO; CAMILA SOLEDADE DE LIRA PIMENTEL; SUYANA KAROLYNE LINO DA ROCHA; DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO À BASE DE GERMACRENO-D4-OL PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO AEDES AEGYPTI. A presente invenção trata da formulação a base do composto germacreno-D-4-ol como deterrente de oviposição, com o objetivo de inibir a oviposição da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. A formulação objeto da presente invenção, compreende as concentrações de 5, 10 e 50 ppm de germacreno-D-4-ol, utilizando 1 mL de acetona em todas as concentrações e água destilada. O composto germacreno-D-4-ol foi isolado do extrato hexânico obtido das folhas de *Piper corcovadensis* utilizando a técnica de cromatografia em coluna com a fase estacionária de sílica gel e a fase móvel 98% hexano e 2% acetato de etila e foi identificado pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-H1 e C13) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa. A formulação foi testada nas concentrações de 5,10 e 50 ppm e todas elas, apresentaram atividade deterrente de oviposição. Foi constatado que quanto menor a concentração utilizada do composto germacreno-D4-ol, maior foi sua atividade deterrente de oviposição. A formulação à base do composto germacreno-D-4-ol mostrou-se ser uma boa alternativa para combater a disseminação do mosquito e consequentemente as doenças transmitidas por ele.



**FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO
MOSQUITO *Aedes aegypti***

[001] A presente invenção refere-se à formulação a base do composto germacreno-D-4-ol, em diversas concentrações, como deterrente de oviposição contra o mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) visando inibir que as fêmeas grávidas do inseto depositem seus ovos em sítios de oviposição.

[002] O mosquito *Aedes aegypti* tem espaço em pesquisas por ser um inseto de importância sanitária trazendo uma preocupação de saúde global, pelo fato da sua rápida disseminação geográfica e por ser o vetor responsável por transmitir as doenças Zika, Dengue, Chikungunya e Febre amarela (LETA et al. International Journal of Infectious Diseases (67): 25-35. 2018).

[003] Uma das alternativas para prevenir estas doenças é controlar o mosquito vetor na tentativa de deter a transmissão das enfermidades causadas por ele.

[004] O *Aedes aegypti* vem desenvolvendo resistência a inseticidas químicos sintéticos. Alguns desses inseticidas afetam negativamente o meio ambiente e danificam os sistemas biológicos (REEGAN et al. Osong Public Health Res Perspect 6(1): 64-69. 2015). Por isso, se faz necessário a busca de novos inseticidas naturais para diminuir a proliferação deste mosquito.

[005] Diversos extratos e óleos essenciais derivados de plantas, provocam efeitos sobre os insetos como a repelência, inibição de oviposição, alterações no desenvolvimento e morte do mosquito (MACIEL et al. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 12(1): 105-112. 2010), além de serem favoráveis ao meio ambiente, facilmente biodegradáveis, de baixo custo, não possuem efeitos negativos nos organismos não-alvos e apresentam diferentes modos de ação (Soonwera e Phasomkusolsil, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 7(11): 967-978. 2017).

[006] As espécies do gênero *Piper* spp. apresentam uma grande variedade de compostos bioativos, destacando-se suas atividades antifúngica (MORANDIM et al. *Phytochemical Analysis* 16(4): 282-286. 2005), larvicida (KANIS et al. *Industrial Crops and Products* (50): 816-820. 2013), antidepressiva (XIE et al. *Fitoterapia* (82): 1086-1092. 2011) e antitumoral (BEZERRA et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (48): 453- 463. 2013).

[007] O composto germacreno-D-4-ol está presente no óleo essencial de algumas espécies do gênero *Piper*, como nas folhas de *Piper hispidinervum* (SAUTER et al. *Industrial Crops and Products* (40): 292-295. 2012), nas inflorescências de *Piper aduncum* (VALADARES et al. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(3): 2691-2699. 2018), nas folhas de *Piper madeiranum* (ASSIS et al. *Journal of Essential Oil Research* 37-41. 2013) e nas folhas de *Piper amalago* (SANTOS et al. *Latin American Journal of Pharmacy* 35(8): 1883-9. 2016). Também se pode encontrar o germacreno-D-4-ol presente na composição química do óleo essencial de outras espécies de plantas como nas inflorescências, nas folhas e nos frutos de *Amorpha canescens Pursh* (LIS et al. *Journal of Oleo Science* 63(12): 1269-1274. 2014) e nas folhas de *Verbesina macrophylla* (BEZERRA et al. *Plant Biology* 20(3): 433-443. 2018). O germacreno-D-4-ol também pode ser obtido em extrato de plantas, como nas folhas de *Artemisia arborescens* (MARONGIU et al. *Natural Product Research* 20(5): 421-428. 2006).

[008] Atualmente, não existe no mercado nenhum produto deterrente de oviposição frente ao mosquito *Aedes aegypti* obtido a partir da formulação a base do composto Germacrene-D-4-ol.

[009] Com o intuito de solucionar tais problemas desenvolveu-se a presente invenção, a qual apresenta a formulação à base do composto germacreno-D-4-ol como deterrente de oviposição, em várias concentrações. Ela pode ser usada em sítios de oviposição para inibir que fêmeas grávidas do *Aedes aegypti* depositem seus ovos, podendo assim contribuir no controle da disseminação do mosquito. Este produto poderá ser usado na indústria de inseticidas e de repelentes.

[0010] O composto germacreno-D-4-ol foi isolado a partir do extrato hexânico das folhas frescas de *Piper corcovadensis* utilizando a técnica de cromatografia em coluna com a fase estacionária de sílica em gel e a fase móvel 98% hexano e 2% de acetato de etila.

[0011] Depois de isolado, o composto germacreno-D-4-ol, foi submetido à identificação pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN- H^1 e RMN- C^{13}) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (SILVA et al. *Experimental Parasitology* (165): 64–70. 2016).

[0012] A formulação objeto da presente invenção, compreende as concentrações de 5, 10 e 50 ppm de germacreno-D-4-ol, utilizando 1 mL de acetona em todas as concentrações e água destilada.

[0013] Para a realização do bioensaio de oviposição (Figura 1), dez fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* foram colocadas em uma gaiola com dimensão de 33 cm × 21 cm × 30 cm, contendo dois copos plásticos inseridos em cantos diagonalmente opostos da gaiola. Um dos copos continha a formulação a base do germacreno-D-4-ol e o outro um controle de acetona, ambos com 25 mL. A formulação foi testada nas concentrações de 5, 10 e 50 ppm, utilizando 1 mL de acetona como co-solvente. Para a preparação da solução controle foi utilizado apenas à mesma quantidade de acetona e água destilada. O papel de filtro foi colocado sobre a superfície interna de cada copo proporcionando um suporte para oviposição. As gaiolas foram mantidas a $28 \pm 1^\circ C$ e 70 ± 5 % de umidade relativa, durante 16 h no escuro. A resposta de oviposição foi determinada por contagem do número de ovos postos nos papéis de filtro (Figura 2). Cada experimento foi repetido oito vezes. Para análise dos dados, foi utilizado o Teste-t-Student, no qual valores de $p < 0,05$ foram considerados para representar diferenças significativas entre os valores médios (Navarro et al. *Journal of Applied Entomology*, 127(1): 46–50. 2003).

[0014] Os testes comportamentais realizados mostraram que a formulação a base do composto germacreno-D-4-ol apresenta atividade deterrente de oviposição para as fêmeas grávidas do *A. aegypti* nas concentrações de 5; 10 e 50 ppm. Na figura 3, é

observado o gráfico com as concentrações testadas da formulação, confirmando que o composto foi significativamente ativo nessas concentrações, apresentando um menor número de ovos deixados nos recipientes contendo as soluções de teste em comparação com a solução controle.

[0015] Nas soluções com formulação de concentrações de 10 e 50 ppm de germacreno-D-4-ol, as fêmeas grávidas de *A. aegypti* depositaram em torno de 65% dos ovos nos recipientes que continham a solução controle em relação a solução teste, mostrando que não houve diferença significativa entre as duas concentrações. Na solução de concentração de 5 ppm de germacreno-D-4-ol, as fêmeas grávidas de *A. aegypti* tiveram preferência em cerca de 76% dos ovos depositados nos recipientes que continham a solução controle em relação aos recipientes que continham a solução com o composto testado, tornando evidente que quanto menor a concentração do composto germacreno-D-4-ol, maior a atividade deterrente de oviposição da formulação.

[0016] A formulação a base de germacreno-D-4-ol conseguiu inibir o depósito de ovos pelas fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, sendo uma boa alternativa para combater a disseminação do mosquito e conseqüentemente as doenças transmitidas por ele.

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, **caracterizada por** conter os compostos Germacreno-D-4-ol, acetona e água destilada.
2. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato que os compostos da formulação podem variar de 0,1 a 99%.
3. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada por** inibir a oviposição de mosquito preferencialmente nas concentrações de 5 a 50 ppm.
4. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, **caracterizada por** ser associado a outros compostos com ação deterrente de oviposição e inseticida, sendo naturais e/ou sintéticos.
5. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, de acordo com as reivindicações de 1 a 4, **caracterizada por** ser adjunto a qualquer tipo de material polímero ou cerâmica.
6. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** isolar o composto Germacreno-D-4-ol do extrato hexânico das folhas de *Piper corcovadensis* utilizando a técnica de cromatografia em coluna com a fase estacionária de sílica gel e a fase móvel 98% hexano e 2% acetato de etila.
7. FORMULAÇÃO À BASE DE Germacreno-D-4-ol PARA INIBIR A OVIPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por**

ser utilizada preferencialmente para inibir o depósito de ovos pelas fêmeas grávidas do mosquito *Aedes aegypti*.

DESENHOS



Figura 1



Figura 2

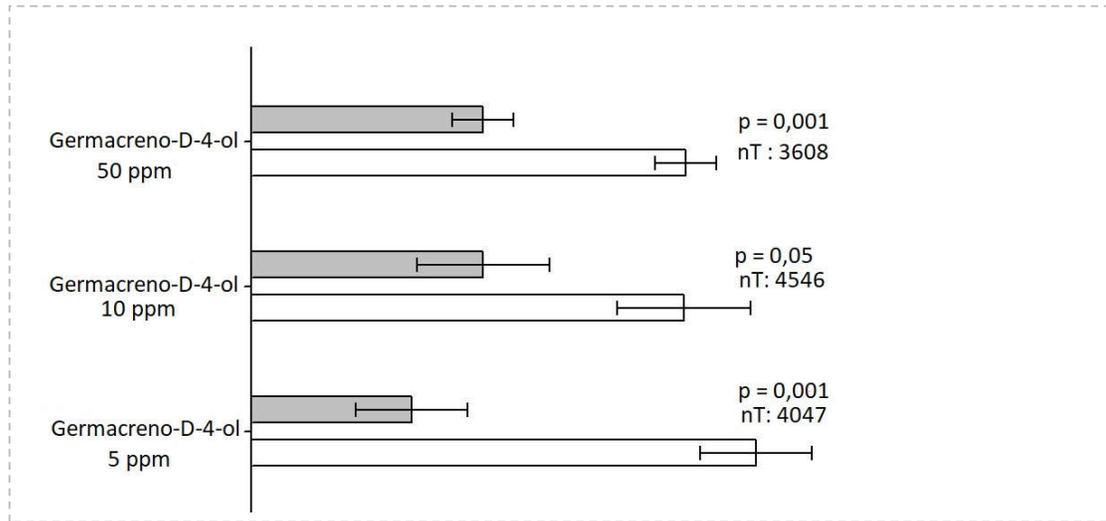


Figura 3

RESUMO**Formulação à base de germacreno-D-4-ol para inibir a oviposição do mosquito *Aedes aegypti***

A presente invenção trata da formulação a base do composto germacreno-D-4-ol como deterrente de oviposição, com o objetivo de inibir a oviposição da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. A formulação objeto da presente invenção, compreende as concentrações de 5, 10 e 50 ppm de germacreno-D-4-ol, utilizando 1 mL de acetona em todas as concentrações e água destilada. O composto germacreno-D-4-ol foi isolado do extrato hexânico obtido das folhas de *Piper corcovadensis* utilizando a técnica de cromatografia em coluna com a fase estacionária de sílica gel e a fase móvel 98% hexano e 2% acetato de etila e foi identificado pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN- H^1 e C^{13}) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa. A formulação foi testada nas concentrações de 5, 10 e 50 ppm e todas elas, apresentaram atividade deterrente de oviposição. Foi constatado que quanto menor a concentração utilizada do composto germacreno-D-4-ol, maior foi sua atividade deterrente de oviposição. A formulação à base do composto germacreno-D-4-ol mostrou-se ser uma boa alternativa para combater a disseminação do mosquito e consequentemente as doenças transmitidas por ele.