



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022019856-0 A2

(22) Data do Depósito: 30/09/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
16/04/2024

(54) Título: FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO AEDES AEGYPTI.

(51) Int. Cl.: A01N 35/06; A01N 43/22; A01P 7/04.

(52) CPC: A01N 35/06; A01N 43/22.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (UFRPE); FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ.

(72) Inventor(es): ANA CARLA DA SILVA; DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO; JÚLIO CÉSAR RIBEIRO DE OLIVEIRA FARIAS DE AGUIAR; CLAUDIO AUGUSTO GOMES DA CÂMARA; MARCILIO MARTINS DE MORAES; ANDRÉ MESQUITA MARQUES; MARIA RAQUEL FIGUEIREDO.

(57) Resumo: FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)- TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO AEDES AEGYPTI. A presente invenção consiste na formulação de uma microemulsão constituída por dois sesquiterpenos, Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, isolados do óleo essencial das folhas da Eugenia uniflora (pitangueira) para o controle populacional do Aedes aegypti, um dos mais importantes vetores de arboviroses. O óleo essencial foi obtido por meio do processo de hidrodestilação, que gerou como resíduo o hidrolato e extrato aquoso. Os compostos majoritários do óleo essencial foram isolados por meio da técnica de cromatografia em contracorrente (CCC), a identificação do óleo essencial e dos compostos isolados foi feita por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (CG-DIC). A presente formulação é capaz de reduzir 50% da população das larvas em concentrações que variam de 36 ppm à 77,8 ppm para os diferentes produtos testados. A inibição da oviposição das fêmeas grávidas observada para o óleo essencial foi de 70% em uma concentração de 9,0 ppm e 79% em 36 ppm. Enquanto que para o composto isolado Epóxido de (...).



FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti*.

Campo da invenção

[001] A presente invenção consiste na formulação de uma microemulsão a base dos sesquiterpenos Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona obtidos a partir do óleo essencial das folhas da *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), popularmente conhecida como pitangueira, por meio da técnica de hidrodestilação e isolados através da técnica de cromatografia em contracorrente para o controle populacional do *Aedes aegypti*, principal vetor de importantes arboviroses de interesse global na área da saúde.

[002] Essa microemulsão é capaz de impedir que o ciclo de reprodução do mosquito vetor chegue a fase adulta, uma vez que atua impedindo a postura de ovos de fêmeas grávidas e provoca também a mortalidade larval. Por meio desse invento é possível diminuir e eliminar focos de reprodução do *Aedes aegypti* no meio ambiente e auxiliar no controle vetorial e, conseqüentemente, evitar doenças como dengue, zika e chikungunya que exercem grande impacto no sistema público de saúde. Portanto, a presente formulação constituída pela Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona tem aplicação como inseticida e pode também ser aplicada nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além disso, os resíduos da hidrodestilação para obtenção do óleo essencial utilizado na presente formulação, isto é, o extrato aquoso e hidrolato, por apresentarem atividade deterrente de oviposição e atividade larvicida extremamente pronunciadas podem também ter aplicações nas áreas já citadas.

Fundamentos da invenção

[003] Doenças arbovirais epidêmicas transmitidas pelo *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) exercem importante impacto no sistema de saúde global. Diante da emergência do vírus zika, ameaça de propagação global da febre amarela –somadas à reemergência da dengue e chikungunya – diversas frentes de pesquisas foram impulsionadas contemplando desde o desenvolvimento de vacinas a diferentes formas de controle do vetor (WILDER-SMITH et al., 2017).

[004] Ao passo que ainda não há vacinas para a maioria das doenças arbovirais supracitadas – com exceção da vacina para febre amarela que já se encontra consolidada mundialmente (THOMAS, 2015) e, em caráter ainda incipiente, a potencial vacina da dengue (IZMIRLY et al., 2020) – o controle vetorial por meio de inseticidas somado a redução da fonte larval, bem como o engajamento comunitário para gerenciamento de habitats se constituem, atualmente, como as principais estratégias de prevenção e mitigação dessas doenças (MOYES et al., 2017).

[005] Atualmente, o uso de inseticidas sintéticos representa um dos recursos mais utilizados para o combate ao *Ae. aegypti*. Sendo que os mais empregados pertencem ao grupo dos organofosforados, carbamatos ou piretróides (BRAGA; VALLE, 2007). Uma preocupação recorrente nesse cenário é o desenvolvimento de resistência do mosquito frente aos químicos sintéticos. A resistência larval a piretróides, por exemplo, é bem estabelecida na literatura (AMELIA-YAP et al., 2019). Além disso, o número limitado de novos inseticidas comercializados para enfrentamento ao vetor também é uma importante fonte de preocupação (SMITH; KASAI; SCOTT, 2016). Esses aspectos encorajam cada vez mais estudos em busca de alternativas frente à problemática.

[006] Assim, substâncias oriundas de produtos naturais constituem-se alternativas relevantes para combater a proliferação do mosquito, ao se alinharem as características consideradas ideais para inseticidas, tais como a ausência de toxicidade frente ao homem e aos animais e não ser cumulativas no sistema adiposo de ambos; além de

apresentarem outras características desejáveis como a fácil obtenção, manipulação, aplicação e viabilidade econômica (VIEGAS, 2003).

[007] Na literatura é crescente o número de estudos que reportam o potencial bioativo de substâncias naturais. Dentre as classes de substâncias com atividade biológica conhecida, os terpenos, oriundos de matrizes vegetais tais como as plantas, representam uma das mais importantes. O óleo essencial (OE) e demais produtos obtidos das folhas da *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), popularmente conhecida como pitangueira, apresentam em sua composição química diferentes terpenos que conferem a essa planta um vasto potencial bioativo.

[008] A popularidade da *E. uniflora* se reflete no grande número de trabalhos que, entre outros aspectos, buscam compreender as suas possíveis atividades biológicas. Na pesquisa realizada por Sviech *al.* (2018) foi descrita a atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial da *E. uniflora* para o quimiotipo representado pelos seguintes constituintes químicos: Germacrona (13,57 %), espatulenol (7,48 %), Curzereno (5,31 %), α -cadinol (4,70 %), shyobunono (4,16 %), β e γ -elemeno (6,15 % no total), cis-jasmona (2,91 %) e cubenol (2,92 %). O OE extraído das folhas da pitangueira apresenta diferentes perfis químicos (quimiotipos) a depender do local de coleta, método de extração, entre outros fatores e pode resultar também em diferentes atividades biológicas associadas a um determinado quimiotipo.

[009] Figueiredo *et al.* (2019) avaliaram o potencial biológico do OE obtido de cinco espécies (E5) de *E. uniflora*, classificados em quatro quimiotipos e correlacionaram com a atividade citotóxica e antioxidante. A saber, o quimiotipo 1 (E1-E2) foi composto por selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (32,6-43,1%) e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (21,7-30,4%) como componentes majoritários; quimiotipo II (E3) apresentou selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (18,1%), epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (16,0%) e óxido cariofileno (18,1%); para o quimiotipo III (E4) curzereno (50,6%), germacreno B (5,2%) e germacrona (4,5%); e, por fim, para o quimiotipo IV (E5) germacreno B (18,4%), curzereno (13,4%) e (E)-cariofileno (9,1%) foram os constituintes principais. A correlação observada foi que as espécies E3 e E4 apresentam uma significativa

atividade antioxidante, enquanto que as espécies E2 e E4 apresentaram atividade citotóxica, para as espécies E3 e E5 não foi observado atividade citotóxica.

[010] Efeitos antinoceptivo e hipotérmico do óleo da pitangueira e de seus componentes majoritários foram estudados por Amorim *et al.* (2009). Os compostos majoritários atractilona e 3-furanoeudesmeno foram isolados por cromatografia em coluna. Os resultados apresentados no estudo sugerem que o efeito antinoceptivo (avaliado por meio do teste de constrição abdominal em camundongos induzida por ácido acético) do óleo bruto foi menor (48%) que o observado para a mistura dos majoritários (70%) na mesma dose. Ao avaliarem a capacidade do OE e da mistura dos majoritários em reduzir a temperatura do corpo, foi observado que ambos apresentaram efeito hipotérmico, diminuindo significativamente a temperatura corporal normal em até três horas.

[011] Diante da grande diversidade de quimiotipos existentes para a *E. Uniflora* o conhecimento da composição química de uma espécie de planta associada a uma determinada atividade biológica é essencial. Famuyiwa e Adebajo (2012) reportaram a atividade larvicida das folhas da *E. uniflora* para o extrato metanólico, frações e subfrações. Contudo, no trabalho supracitado não foram elucidadas as substâncias associadas a tal efeito. Além disso, não há invenção para formulação larvicida a base do óleo essencial *Eugenia uniflora*. Há formulações larvicidas frente ao *Ae. aegypti* descritas para óleo essencial de outras espécies de plantas, por exemplo *Citrus sinensis* (laranjeira), como pode ser vista na patente sob número de registro BR1020166012240. Há também formulação larvicida a base de óleo essencial para a planta *Croton blanchetianus* mostrada na patente BR102019021720.

[012] Em relação à atividade deterrente de oviposição frente as fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, foi relatada atividade deterrente para a espécie da *Eugenia uniflora* cujo quimiotipo é representado pelo Curzereno como substância majoritária, conforme descrita na patente de registro BR1020190105542. No entanto, a composição química dessa formulação a base de óleo essencial da pitangueira difere completamente da apresentada na presente invenção. Além disso, a patente por nós aqui elaborada, diz

respeito principalmente a uma microemulsão baseada nos compostos majoritários isolados do óleo essencial da *E. uniflora* do quimiotipo representado pelos constituintes Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (SE) e Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (EPXSE).

[013] Em diferentes trabalhos a deterrência de óleo essencial frente ao *A. aegypti* é pontuada. Para outra espécie de *Eugenia*, a *E. jambolana*, foi avaliada a resposta de oviposição nas concentrações: 20 ppm (18,8% e IAO = -0,10); 40 ppm (15,5 % e IAO = -0,08); 60 ppm (27,7% e IAO = -0,10); 80 ppm (61% e IAO = -0,40); 100 ppm (83,3% e IAO = -0,71); cuja atividade deterrente aumentou em função do aumento da concentração (PRATHIBHA; RAGHAVENDRA; VIJAYAN, 2014). Ao comparar a deterrência da *E. uniflora* com a da *E. jambolana*, frente ao *Ae. aegypti*, por exemplo, os nossos resultados sugerem maior potencial deterrente da espécie *E. uniflora*, em concentrações significativamente menores, em relação a espécie *E. jambolana*.

[014] A inédita atividade larvicida e deterrente de oviposição observada para o óleo essencial, compostos majoritários (Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona) e subprodutos da hidrodestilação (hidrolato e extrato aquoso), obtidos das folhas da *E. uniflora*, representa uma importante alternativa aos químicos sintéticos tradicionais comumente empregados no combate ao mosquito vetor de arboviroses (*Aedes aegypti*). Uma vez que a formulação da microemulsão larvicida, a base de óleo essencial, apresenta concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀) abaixo de 50 ppm, de acordo com os parâmetros estabelecidos na literatura (CHENG et al., 2003), a presente formulação é considerada altamente ativa.

[015] Além disso, os expressivos resultados de deterrência de oviposição, observados na presente invenção, com base no índice de atividade de oviposição – IAO (KRAMER; MULLA, 1979), situa a formulação como significativa na inibição da postura de ovos e, portanto, uma importante estratégia para interromper o ciclo de desenvolvimento do mosquito na sua fase mais precoce (deposição dos ovos). Em conjunto (atividade deterrente e larvicida), a presente formulação além de impedir que as fêmeas de *Aedes aegypti* grávidas depositem seus ovos, atua matando as

larvas remanescentes da oviposição. Com isso, apresenta dupla função no combate ao vetor.

[016] O desenvolvimento de resistência aos químicos sintéticos é uma preocupação recorrente nas medidas de combate ao vetor. Assim, a presente invenção se difere dos inseticidas químicos tradicionais pelo fato de formulações a base de óleo essencial apresentarem uma matriz química complexa constituída por diferentes substâncias químicas; as quais podem apresentar diferentes mecanismos de ação frente as larvas e, portanto, atuar de diferentes modos, dificultando assim o desenvolvimento da resistência.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 ilustra um sistema de hidrodestilação com aparato tipo Clevenger.

A Figura 2 mostra o cromatograma do óleo essencial da *Eugenia uniflora* por CG.

A Figura 3 mostra o cromatograma da Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

A Figura 4 mostra o cromatograma da Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

A Figura 5 mostra os testes larvicidas de *Aedes aegypti*.

A Figura 6 mostra as gaiolas com copos de teste e controle para a oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* grávidas.

A Figura 7 mostra o esquema da distribuição dos copos contendo a microemulsão teste e o controle.

A Figura 8 mostra os ovos depositados nos bioensaios e ilustra também a sua contagem.

A Figura 9 mostra as Informações estáticas para a atividade larvicida do óleo essencial.

A Figura 10 traz informações estáticas para a atividade larvicida do hidrolato.

A Figura 11 traz informações estáticas para a atividade larvicida do extrato aquoso.

A Figura 12 traz informações estáticas para a atividade larvicida do composto isolado Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

A Figura 13 traz informações estáticas para a atividade larvícida do composto isolado Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

A Figura 14 mostra as respostas de oviposição de fêmeas grávidas do *A aegypti* para OE da *E. uniflora* (*P < 0,05).

A Figura 15 mostra a resposta de oviposição de fêmeas grávidas do *A aegypti* para os compostos isolados .

A Figura 16 mostra a resposta de oviposição de fêmeas grávidas do *A aegypti* para hidrolato e extrato aquoso.

A Figura 17 mostra a estrutura química dos compostos isolados.

A Figura 18 mostra a atividade larvícida dos produtos da *E. uniflora* frente ao *A. aegypti*.

A Figura 19 mostra o índice de atividade de oviposição IAO para todos os produtos testados.

A Figura 20 mostra a Composição química do óleo essencial da *Eugenia uniflora*.

Descrição da invenção

[017] A partir da presente invenção na qual foi desenvolvida uma formulação a base dos compostos majoritários Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (SE) e Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (EPXSE) presentes no óleo essencial extraído das folhas da *Eugenia uniflora*, é constituído um produto que atua tanto como deterrente de oviposição ao impedir a deposição de ovos de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* bem como larvícida ao causar a mortalidade larval.

Exemplos de concretizações da invenção – Obtenção e extração do óleo essencial

[018] O desenvolvimento da presente invenção ocorreu a partir da coleta das folhas da *Eugenia Uniflora* (284,2 g), em Recife-PE, latitude: 08° 05' 56"; longitude: 34° 95' 26". O voucher desta espécie foi depositado no herbário da Universidade Federal de Pernambuco UFP-Geraldo Mariz, sob n° de registro 88633 e identificada pelo

botânico J. R. Maciel. Em seguida, o material vegetal foi triturado e submetido a hidrodestilação com 2,5 litros de água destilada por 3h utilizando um aparato do tipo Clevenger (Figura 1). Feito isso, foram obtidos: hidrolato, extrato aquoso (sub produtos da hidrodestilação) e o óleo essencial (OE). Este último foi seco usando sulfato de sódio anidro, transferido para um vial e mantido sob refrigeração à -20°C juntamente com os produtos secundários da hidrodestilação para posterior utilização nos testes biológicos. O rendimento percentual do óleo essencial (0,62%) foi calculado pela razão da massa obtida do óleo essencial e da massa das folhas frescas.

Exemplos de concretizações da invenção – caracterização do óleo essencial

[019] Os constituintes do óleo essencial foram caracterizados por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), Agilent Technologies (PaloAlto, CA, EUA), série 5975C, detector quadrupolo Agilent e coluna capilar de sílica fundida, apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm; espessura do filme 0,25 µm). A quantificação foi feita por cromatografia gasosa acoplada à detector de ionização de chama (DIC), coluna apolar VB-5 (Thermo trace GC ultra, 60 m x 0.25 mm; espessura do filme 0.25 µm), fase móvel foi o nitrogênio (gás de arraste) e condições de temperatura iguais as reportadas para a CG-EM. Assim, amostras do óleo essencial (1µL) foram injetadas em triplicata e o percentual dos constituintes químicos foram obtidos a partir das áreas relativas dos picos no cromatograma, conforme apresentado na Figura 2 e na Figura 20.

Exemplos de concretizações da invenção – Isolamento dos compostos majoritários SE e EPXSE.

[020] O isolamento dos sesquiterpenos majoritários (Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona) foi feito utilizando o método de cromatografia em contracorrente (CCC) modelo Quattro HT-Prep (AECS, Bridgend, Reino unido) equipado com duas bobinas individuais de 124mL. Os cromatogramas de ambos compostos isolados são mostrados nas Figuras 3 e 4.

[021] Basicamente o processo em CCC incluiu a combinação de quatro diferentes sistemas de solventes: hexano/ACN (1:1); hexano/metanol (1:1); hexano/ACN/acetato de etila (1:1:0.4); hexano/ACN/etanol (1:1:0.5). Para avaliar a melhor combinação de solventes para promover a separação dos compostos majoritários do óleo essencial da *Eugenia uniflora* foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD) e posteriormente foi avaliado o coeficiente de partição (K), a partir do qual foi possível definir o sistema de solventes composto por hexano/ACN (1:1) como o mais adequado conforme descrito por Marques *et al* (2018) e os dois majoritários (Figura 17) foram separados com bom rendimento e alta pureza.

Exemplos de concretizações da invenção – Realização dos bioensaios larvicidas

[022] As atividades biológicas foram realizadas com os mosquitos *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) provenientes da colônia mantida no laboratório de ecologia química da Universidade Federal de Pernambuco (LEQ-UFPE), em $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$. Os bioensaios larvicidas foram feitos com base na adaptação feita por Navarro *et al.* (2003) do método estabelecido pela organização mundial da saúde (OMS) para testes larvicidas com mosquitos.

[023] Inicialmente foi preparada uma solução estoque (microemulsão) na concentração de 100 ppm utilizando 5 mg do óleo essencial, 4 gotas de tween (co-solvente surfactante) e 50 ml de água destilada para a realização de um teste preliminar em 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm, cujo objetivo foi estabelecer a faixa de concentração na qual o óleo essencial apresentava atividade larvicida. Uma vez conhecida a faixa de atividade larvicida (concentrações que apresentaram mortalidade de 20% a 80% no preliminar) foi feito o bioensaio para o óleo essencial para as concentrações 20, 30, 40, 50 e 60 ppm. Similarmente foram preparadas as microemulsões para os compostos isolados

Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (pureza $\geq 95\%$) e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (pureza $\geq 97\%$) nas concentrações de 40, 50, 55, 60 e 88 ppm e 40, 45, 50, 55 e 60 ppm respectivamente.

[024] Enquanto que os subprodutos da hidrodestilação, hidrolato e extrato aquoso, foram diluídos em água destilada para fornecer concentrações de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% (v/v) e 30, 40, 60, 70 e 80 % (v/v) respectivamente, em um volume final de 20 ml. Os bioensaios larvicidas foram feitos utilizando larvas no estágio larval L4. Foram distribuídas 20 larvas, por copo, em cada concentração citada, em um volume final de 20 ml. Todos os testes foram realizados em triplicatas com controle positivo (Temefós a 1ppm) e negativo (água destilada e tween) conforme ilustrado na Figura 5.

[025] A mortalidade das larvas foi avaliada em 48 horas a partir da exposição das larvas nas soluções testadas. Para ser considerada morta a larva não deveria subir à superfície e apresentar ausência de movimento quando estimuladas (WHO, 2005). A determinação da concentração letal para 50% das larvas CL_{50} foi calculada por meio da análise Probit e software Statplus2009 com um intervalo de confiança de 95% e associados a uma faixa de concentração letal máxima e mínima (LCL-UCL) conforme e mostrado na Figura 18.

[026] Na literatura são apontados parâmetros para avaliar o potencial larvicida de óleo essencial frente as larvas do *A. aegypti* no quarto estágio larval (L4). De acordo com Cheng *et al.* (2003), OE com $CL_{50} > 100$ ppm é considerado não ativo; $CL_{50} < 100$ ppm considerado ativo e $CL_{50} < 50$ ppm apresenta alta atividade larvicida.

[027] O valor da CL_{50} observado para a microemulsão do óleo essencial foi de $35,9 \pm 1,02$ ppm (34,3-37,6); para o composto isolado Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona $41,2 \pm 1,06$ ppm (32,4-45,1) e Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona $77,8 \pm 1,06$ ppm (71,1-89,3); enquanto que para o extrato aquoso foi de $51,4 \pm$

1,04 % (47,4-55,5) e hidrolato $53,0 \pm 1,02$ % (50,7-55,2). Portanto, todos os produtos naturais oriundos das folhas da *Eugenia uniflora* foram considerados larvicidas. Contudo, a atividade mais notável foi observada para microemulsão do óleo essencial e do composto isolado Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona que podem ser considerados altamente ativos. Para o controle negativo com Tween não foi observada mortalidade larval e no controle positivo com temefós a mortalidade foi de 100% na concentração testada (1 ppm). Nas figuras 9,10, 11, 12 e 13, são mostrados os gráficos nos quais é possível observar a curva de sobrevivência larval calculada no programa estatístico Probit, além do erro padrão, intervalo de confiança e demais informações estatísticas para todos os produtos aqui apresentados.

Exemplos de concretizações da invenção – Realização dos bioensaios de oviposição

[028] Os bioensaios de oviposição foram realizados a partir da preparação de soluções (microemulsões) nas concentrações 36, 18, 9 e 3,6 ppm do óleo essencial, utilizando 4 gotas de tween (como co-solvente surfactante para auxiliar a solubilizar o óleo) e água destilada até atingir um volume final de 250 ml (o controle foi feito nas mesmas condições). Similarmente, para os compostos majoritários do OE, Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, foram utilizadas soluções nas concentrações de 3,6 ppm e 3,6 e 0,72 ppm respectivamente. O hidrolato e extrato aquoso foram diluídos em água destilada para uma concentração de 53% e 51% (v/v).

[029] Cada bioensaio, na respectiva concentração, foi replicado por 8 vezes. Para tal, 80 fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* foram distribuídas em 8 gaiolas (10 fêmeas por gaiola) medindo 33 x 21 x 30 cm. Foram colocados 25 mL da solução teste e do controle (nas mesmas condições experimentais) em copos de vidro com papel filtro em forma de cone para coletar os ovos. Os copos contendo a solução teste e o controle foram numerados de 1 a 8 e dispostos aos pares em cada gaiola em posição diagonal de forma oposta e alternada,

conforme mostrado nas Figuras 6 e 7. As gaiolas com as soluções e as fêmeas grávidas foram mantidas em um ambiente em 28 ± 1 °C, humidade relativa de $70 \pm 5\%$, em ausência de luz por 16 horas. Transcorridas 16 horas do início do bioensaio, os copos foram retirados e os ovos depositados em cada copo foram contados (conforme ilustrado na Figura 8).

[030] As repostas de oviposição do teste e controle foram analisadas por meio do teste t de Student com $P < 0,05$ (NAVARRO et al., 2003) por meio de software estatístico MINITAB release 14. Adicionalmente, foi considerado o índice de atividade de oviposição - IAO (KRAMER; MULLA, 1979) calculado pela fórmula:

$$IAO = \frac{NT - NC}{NT + NC}$$

[031] Em que NT = o número total de ovos depositados na solução teste e NC = o número total de ovos depositados no controle. Basicamente, o IAO desenvolvido por Kramer e Mulla (1979) analisa a resposta comportamental de fêmeas de mosquitos grávidas em depositar os ovos em sítios de oviposição constituído por determinadas substâncias químicas (SHAALAN; CANYON, 2018). Assim, os valores do índice devem estar dentro do intervalo de +1 a -1. Sendo que valores positivos indicam preferência pela solução teste ao invés do controle (atraente). E valores negativos preferência pelo controle ao teste (deterrente). Valores muito próximos a 0 indica neutralidade (KRAMER; MULLA, 1979; SHAALAN; CANYON, 2018).

[032] De modo geral, os resultados apresentados na presente invenção indicam a preferência majoritária das fêmeas do *A. aegypti* pela solução controle quando comparada a solução teste que contém a microemulsão do óleo essencial, compostos isolados e demais produtos extraídos das folhas da *E. uniflora* (figura 19).

[033] Assim, nota-se que para o OE à 36 ppm (concentração baseada na LC_{50} do bioensaio larvicida) o percentual de ovos depositados no controle foi significativamente maior, 79% ($p = 0,000$; IAO = -0,57), que o observado para o teste. Ao passo que a concentração foi progressivamente diminuída a atividade deterrente se manteve de forma bastante pronunciada em 18 ppm com 76% ($p = 0,001$; IAO = -0,52) e em 9 ppm com 70% ($p = 0,008$; -0,40); quando a maior concentração (36 ppm) foi diminuída a 10x do seu valor, correspondente a 3,6 ppm, a atividade deterrente não foi mais observada ($p = 0,549$; IAO = -0,08). Para o bioensaio com o branco ($p = 0,590$; IAO = -0,08) é possível observar que fatores externos não interferem nas respostas observadas, ver Figura 14.

[034] A resposta de oviposição para os compostos isolados do OE da *E. uniflora*, por cromatografia em contracorrente, foram avaliadas nas concentrações 3,6 e 0,72 ppm para EPXSE e 3,6 ppm para SE. Na figura 15, observa-se que em 3,6 ppm (concentração baseada na mínima testada para o óleo essencial) o percentual relativo à quantidade de ovos depositados no controle, 68% ($p = 0,013$ e IAO = -0,36), foi maior se comparado ao teste contendo EPXSE. Quando a concentração é diminuída à 0,72 ppm a atividade deterrente não é mais significativa, 60% ($p < 0,242$ e IAO = -0,20).

[035] Para a SE (ver figura 15), em 3,6 ppm não houve diferença significativa no percentual do número de ovos depositados no teste e controle ($p = 0,781$ e IAO = -0,05), e portanto, nessa concentração o composto não apresenta atividade deterrente. Os dados sugerem que o composto epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona contribui significativamente para a atividade deterrente do óleo essencial. Assim, os compostos SE e EXPSE, obtidos por meio da técnica de cromatografia contracorrente, tiveram suas atividades biológicas frente ao *A. aegypti* avaliadas pela primeira vez. Para o composto EPXSE o seu grande potencial observado o situa como um possível candidato no combate ao vetor e o principal bioativo da microemulsão descrita nessa invenção.

[036] A atividade deterrente de oviposição observada tanto para o hidrolato quanto para o extrato aquoso (ver figura 16) foi significativamente mais pronunciada do que a observada para o OE da mesma planta, em concentrações proporcionais as CL_{50} obtidas nos bioensaios larvicidas. Para o hidrolato em 53% (v/v), o percentual de ovos depositados no controle foi de 99% ($p = 0,000$ e $IAO = -0,97$); similarmente, o extrato aquoso em 51% (v/v) apresentou percentual de 97% ($p = 0,000$ e $IAO = -0,95$) indicando preferência majoritária para o depósito de ovos no controle em relação ao teste. É possível considerar que o aumento na concentração para o extrato aquoso e hidrolato propiciou uma maior reposta nos receptores olfativos presentes nas antenas das fêmeas do *A. aegypti* causando forte repelência do sítio de oviposição contendo a solução teste, assim como observada para a microemulsão do óleo essencial e composto isolado EPXSE.

[037] Diante do exposto, a presente formulação constituída pela microemulsão dos compostos majoritários isolados do óleo essencial da *Eugenia uniflora* se mostra uma alternativa segura ao meio ambiente e ao homem e apresenta contribuição notável para conter a proliferação do *Aedes aegypti* responsável pela transmissão de arboviroses que anualmente exercem grande impacto no sistema de saúde público brasileiro. Em conjunto a atividade deterrente e larvicida, na presente formulação, apresenta dupla função no combate ao vetor e pode incrementar o rol de produtos químicos sintéticos e outras formas de manejo do mosquito utilizados nos dias de hoje, com a vantagem de exercer pouco impacto ambiental.

Referências bibliográficas

- [038] Adams, R. P., (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. Carol Stream: Allured publishing corporation.
- [039] Albuquerque, B. N. de L., Felipe, M., Da, R., Cristina, P., Da, B., Soledade, C., Pimentel, D. L., Cordeiro, A., Neto, A., Maria, P., Paiva, G., Gabriel, M., Gomes, M., Ferreira, E., Silva-júnior, D., Maria, D., & Navarro, F. (2022). Oviposition deterrence , larvicidal activity and docking of β -germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*. *Industrial Crops & Products*.
- [040] Amelia-Yap, Z. H. et al. (2019). Pyrethroids use: Threats on Metabolic-Mediated Resistance Mechanisms in the Primary Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 56(3), 811–816.
- [041] AMORIM, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.
- [042] Bezerra-Silva, P. C., Dutra, K. A., Santos, G. K. N., Silva, R. C. S., Iulek, J., Milet-Pinheiro, P., & Navarro, D. M. A. F. (2016). Evaluation of the activity of the essential oil from an ornamental flower against *aedes aegypti*: Electrophysiology, molecular dynamics and behavioral assays. *PLoS ONE*, 11(2), 1–15.
- [043] Braga, I. A.; Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 279–293.
- [044] Cheng, S. S. et al. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89(1) 99–102.
- [045] Da Silva, A. G. et al. (2015). Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 18 (6), 1441–1447.
- [046] Da Silva, R. C. S. et al. (2015). (E)-Caryophyllene and α -humulene: *Aedes aegypti* oviposition deterrents elucidated by gas chromatography electrophysiological assay of *commiphora leptophloeos* leaf oil. *PLoS ONE*, 10(12),1–14.
- [047] Famuyiwa, F. G.; Adebajo, A. C. (2012). Larvicidal properties of *Eugenia uniflora* leaves. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 3(10),400–405.

- [048] Figueiredo, P. L. B. et al. (2019). Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 232, 30–38.
- [049] Izmirly, A. M. et al. (2020). Challenges in Dengue Vaccines Development: Pre-existing Infections and Cross-Reactivity. *Frontiers in Immunology*, 11, 1–15.
- [50] Kramer, W. L.; Mulla, M. S. (1979). Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: Oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. *Environmental Entomology*, 8 (6) 1111–1117.
- [051] Marques, A. M. et al. (2018). Isolation of two major sesquiterpenes from the leaf essential oil of *Eugenia uniflora* by preparative-scale high-speed countercurrent chromatography. *Separation Science Plus*, 7, 785–792.
- [052] Moyes, C. L. et al. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major aedes vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15 (7).
- [053] Navarro, D. M. A. F., De Oliveira, P. E. S., Potting, R. P. J., Brito, A. C., Fital, S. J. F., & Goulart Sant'Ana, A. E. (2003). The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 127(1), 46–50.
- [054] Prathibha, K. P., Raghavendra, B. S., & Vijayan, V. A. (2014). Larvicidal, ovicidal, and oviposition-deterrent activities of four plant extracts against three mosquito species. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(10), 6736–6743.
- [055] Shaalan, E. A. S., & Canyon, D. V. (2018). Mosquito oviposition deterrents. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10207–10217.
- [056] Smith, L. B.; Kasal, S.; S, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 1–12, 2016.
- [057] Sviech, F. et al. (2018). BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF PITANGA (*Eugenia uniflora* L.) LEAVES. *B.CEPPA*, 36(1), 28–38.
- [058] Thomas, R. (2015). Evaluating the safety and immunogenicity of yellow fever vaccines: a systematic review. *Vaccine: Development and Therapy*.
- [059] Viegas, C. (2003). Terpenes with insecticidal activity: An alternative to chemical control of insects. *Química Nova*, 26 (3), 390–400.

[060] Wilder-Smith, A., Gubler, D. J., Weaver, S. C., Monath, T. P., Heymann, D. L., & Scott, T. W. (2017). Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(3), 101–106.

REIVINDICAÇÕES

01. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* caracterizada por ser obtida a partir da hidrodestilação do óleo essencial da *Eugenia uniflora* e constituintes majoritários isolados por meio de cromatografia contracorrente.
02. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* citada na reivindicação 1, caracterizada pelo quimiotipo representado pelos constituintes químicos majoritários Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (65,83%) e Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (13,53%).
03. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* de acordo com a reivindicação 1 e 2 e caracterizada por ser constituída pelos sesquiterpenos majoritários da pintagueira e surfactante como cosolvente em meio aquoso.
04. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 caracterizada pela atividade deterrente de oviposição e atividade larvicida dos resíduos do processo de hidrodestilação para obtenção do óleo essencial (hidrolato e extrato aquoso).
05. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4 caracterizada pela alta pureza dos constituintes voláteis majoritários isolados por cromatografia em contracorrente.
06. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes*

AEGYPTI de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5 caracterizada por compreender concentrações para as atividades larvicidas de 36 ppm à 77,6 ppm para o óleo essencial, compostos isolados, hidrolato e extrato aquoso.

07. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 caracterizada por compreender concentrações para as atividades de deterrente de oviposição de 3,6 ppm à 36 ppm para composto isolado e óleo essencial.
08. FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 caracterizada por compreender concentrações de atividade deterrente de oviposição de aproximadamente 50% (v/v) para o extrato aquoso e hidrolato obtidos a partir do processo de hidrodestilação do óleo essencial da *Eugenia uniflora*.

DESENHOS

Figura 1



Figura 2

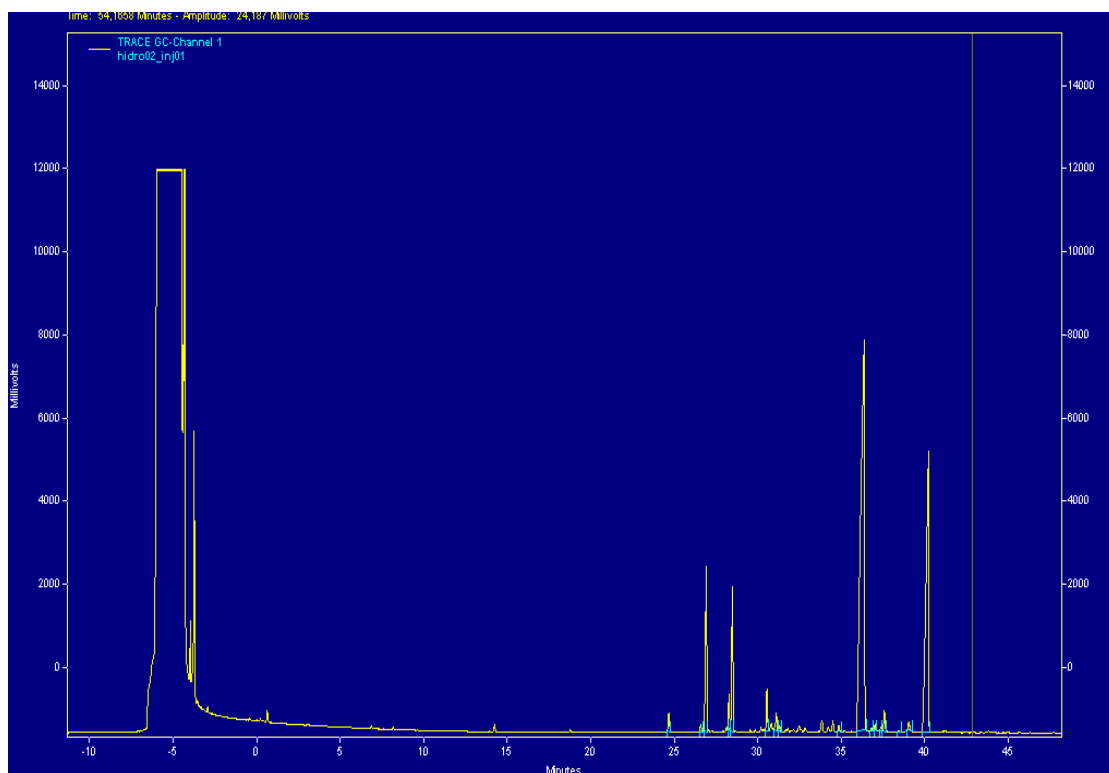


Figura 3

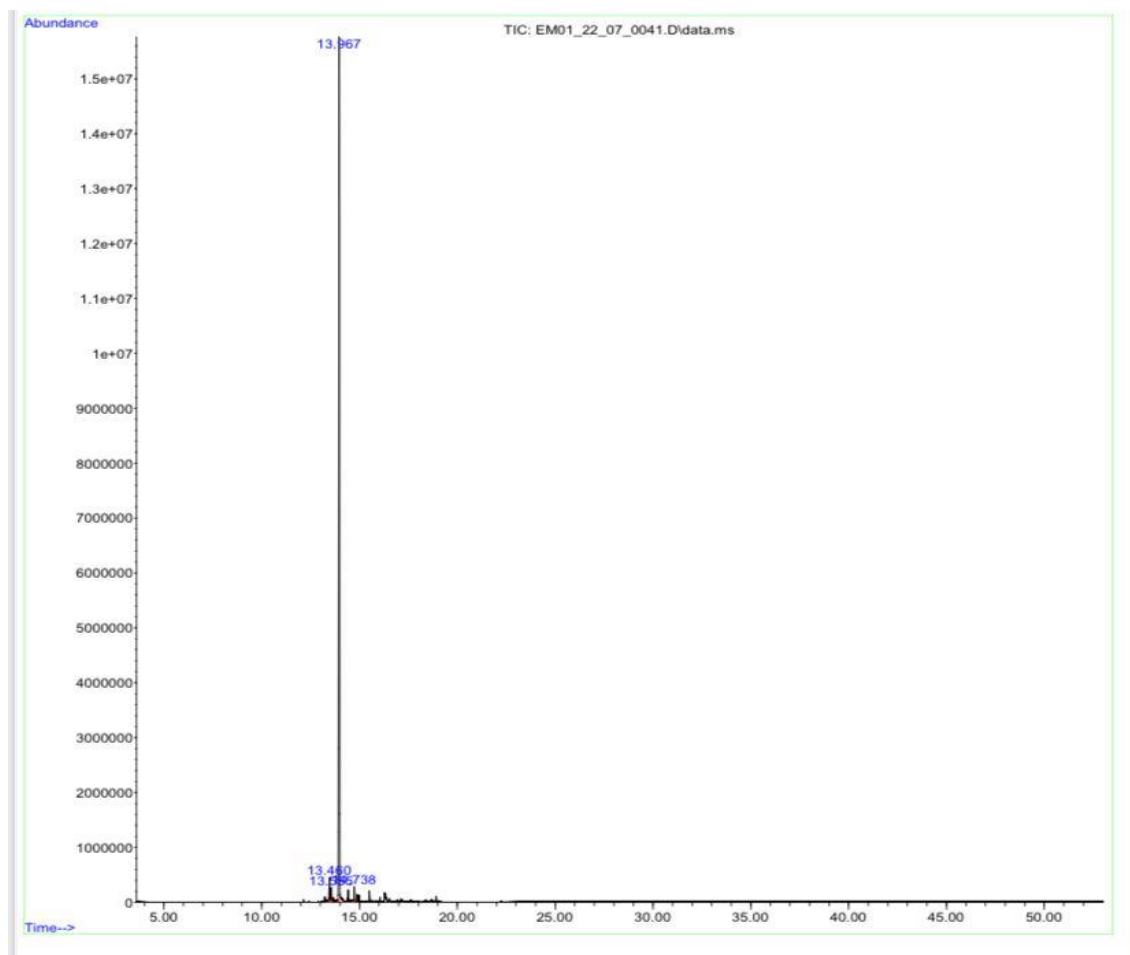


Figura 4

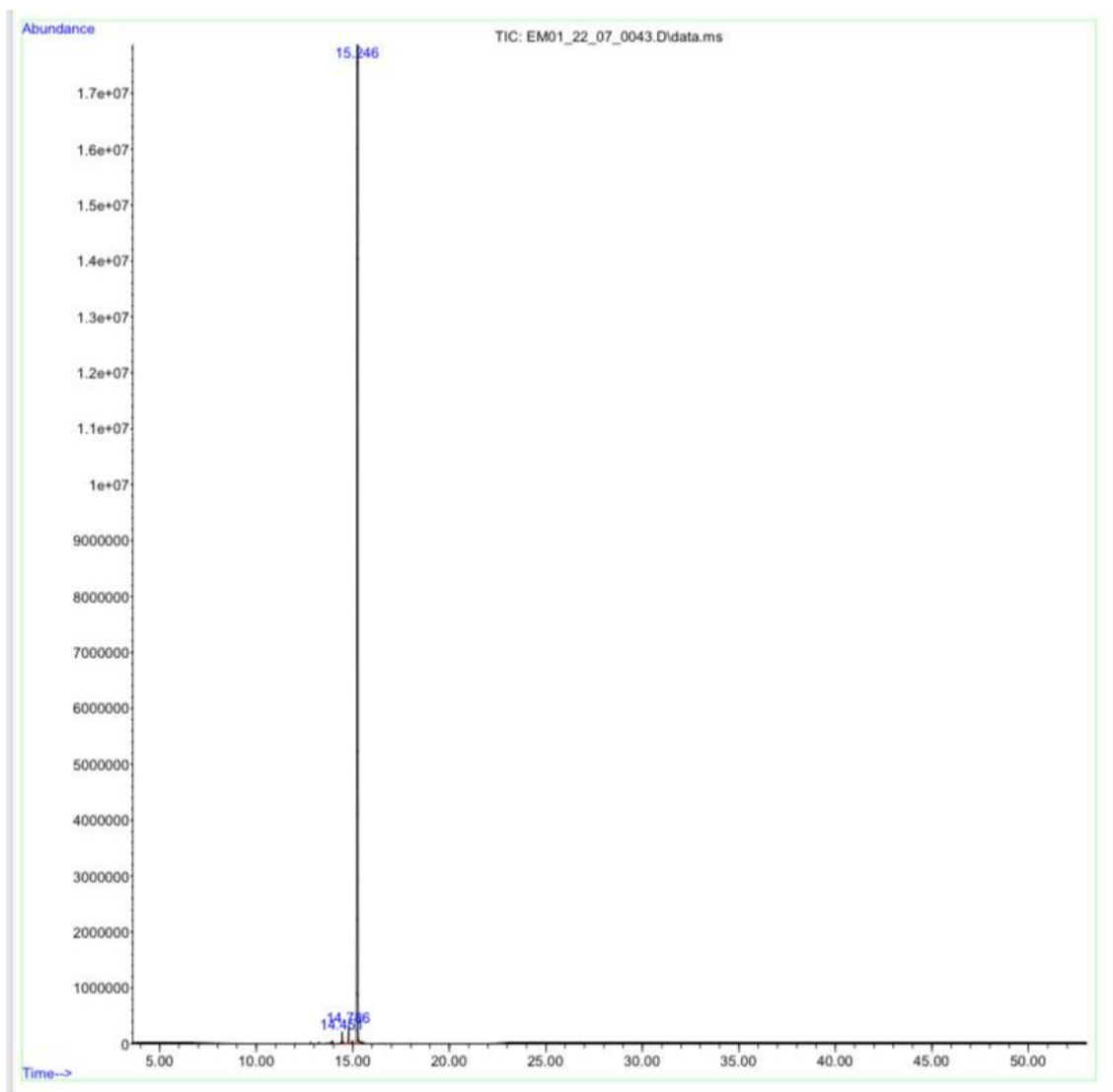


Figura 5



Figura 6



Figura 7

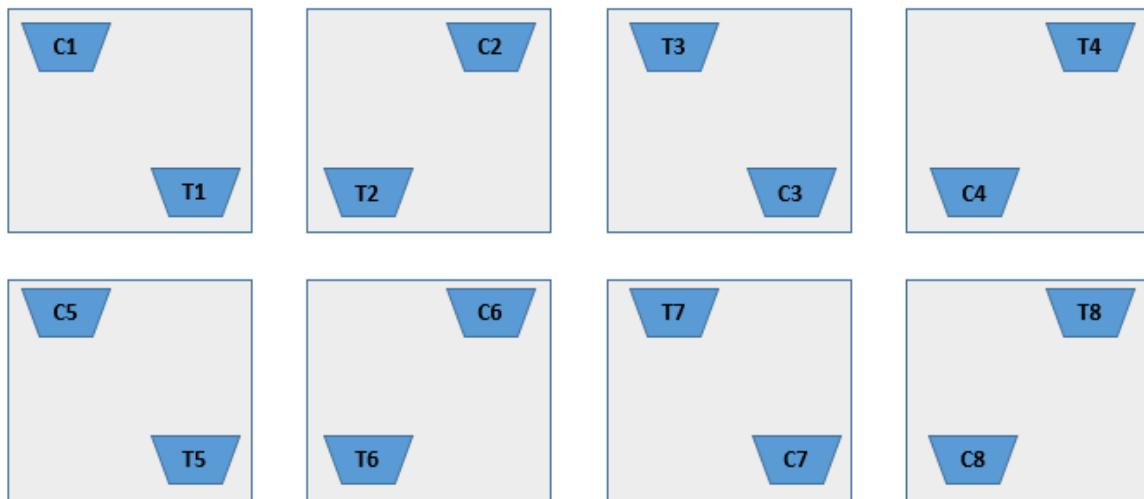


Figura 8

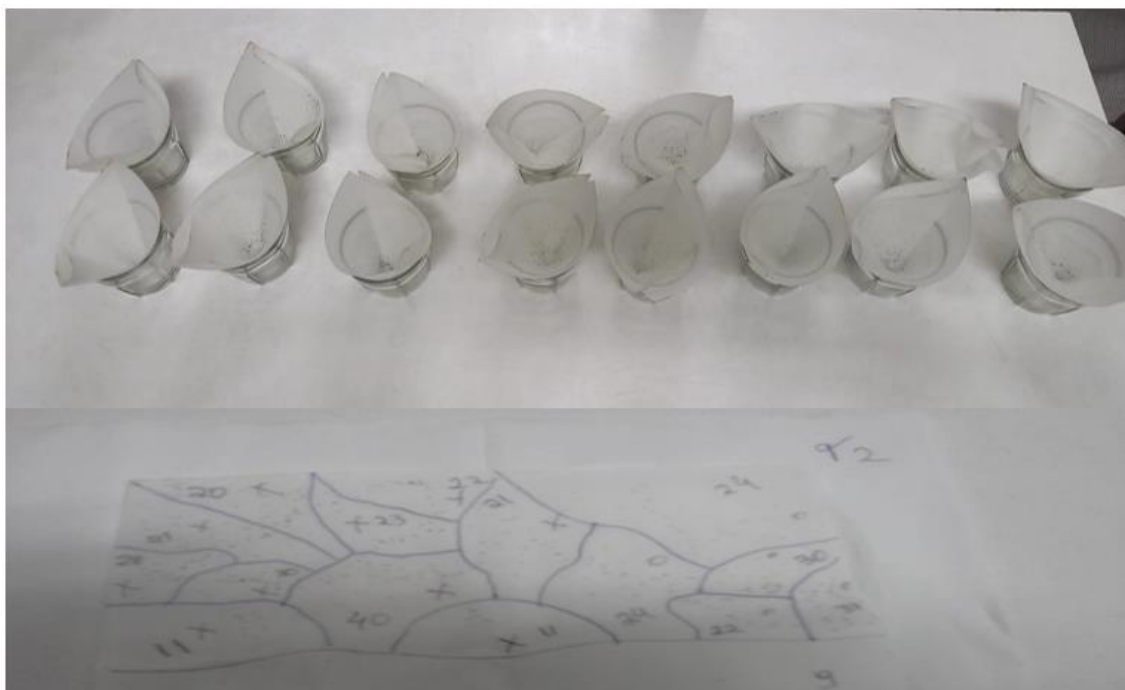


Figura 9

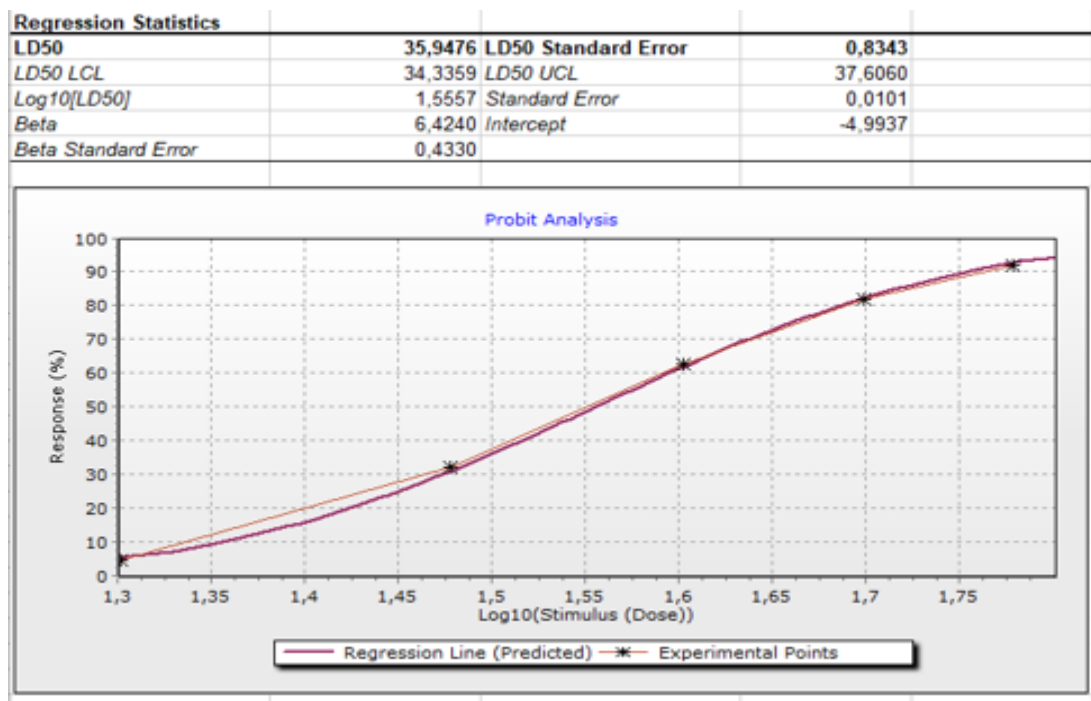


Figura 10

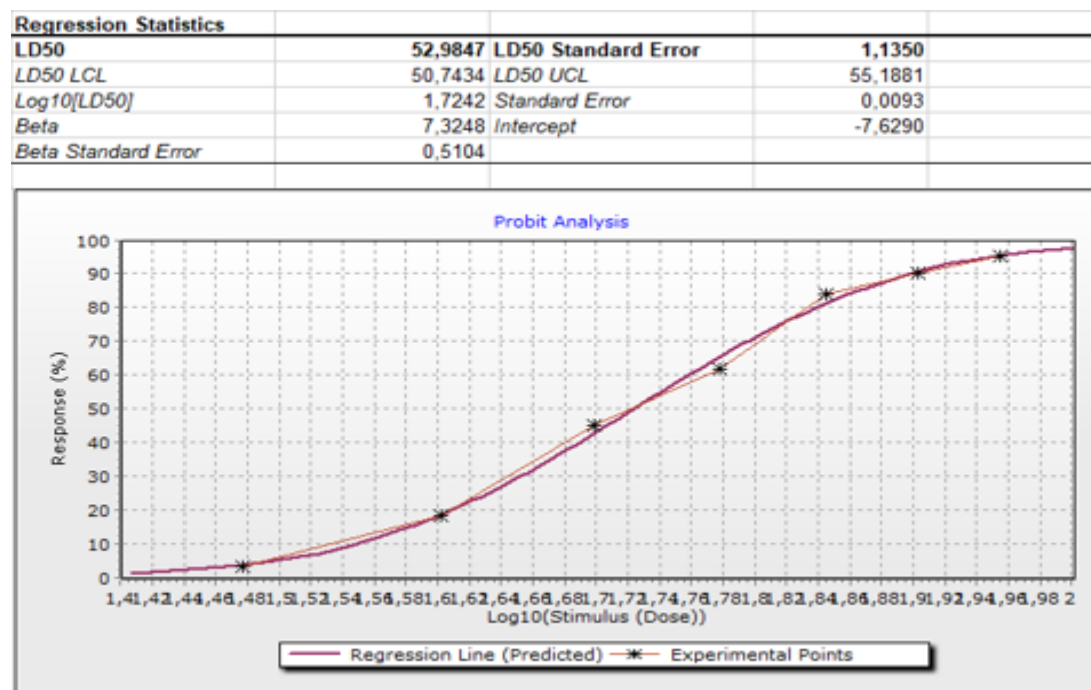


Figura 11

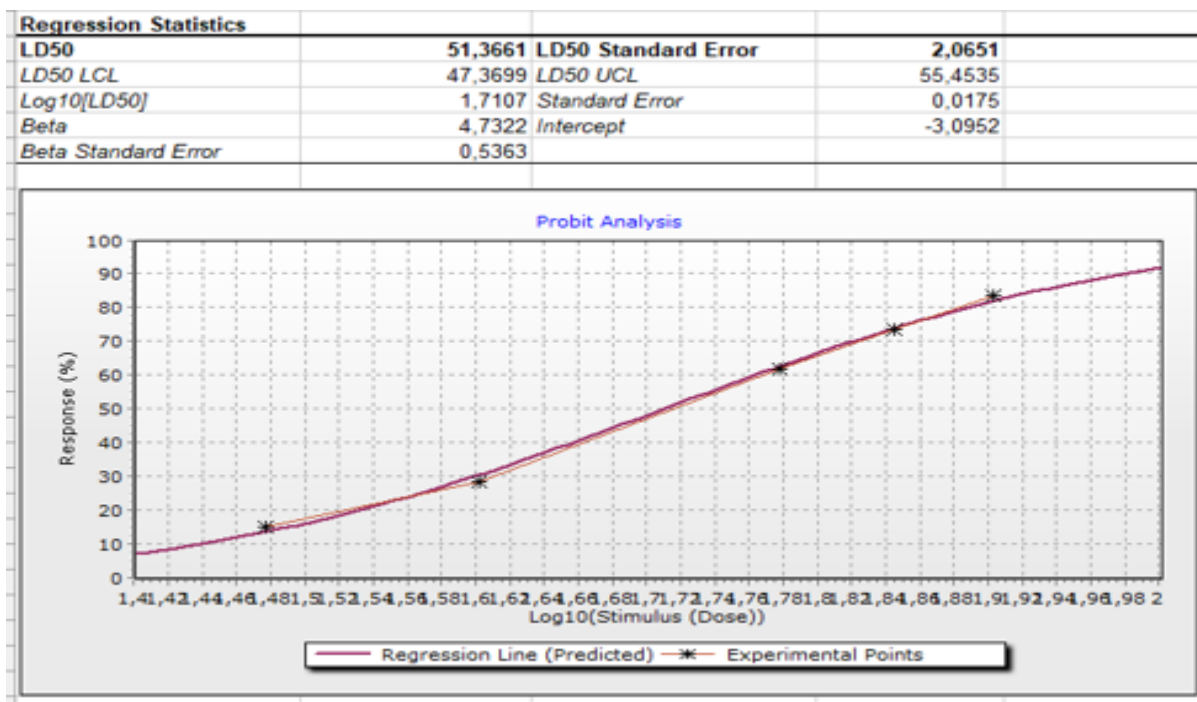


Figura 12

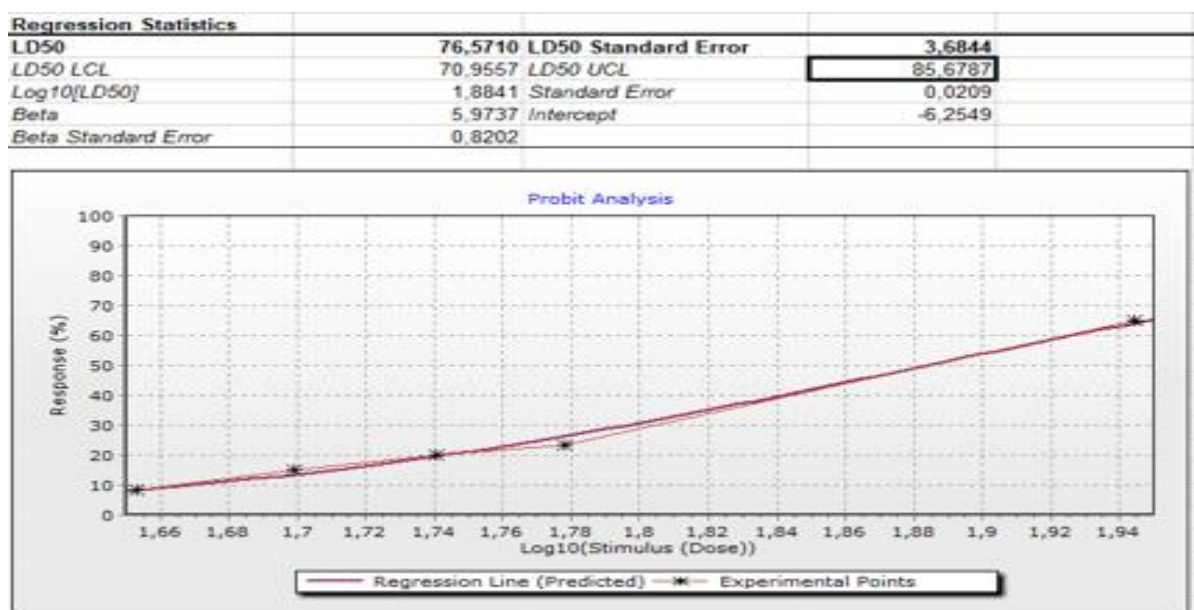


Figura 13

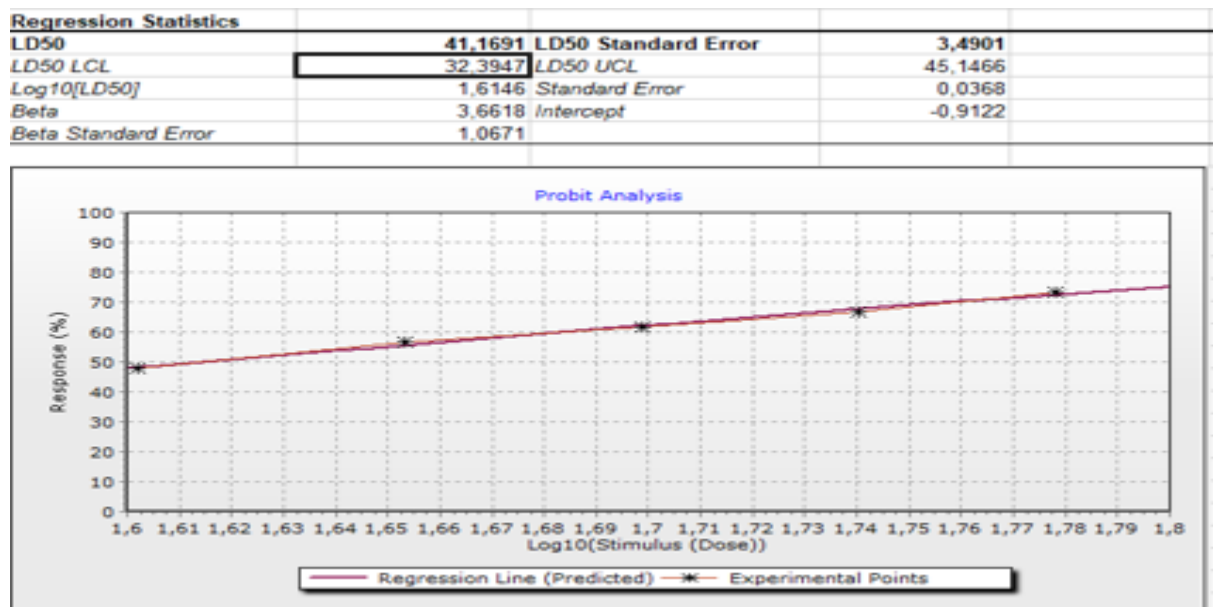


Figura 14

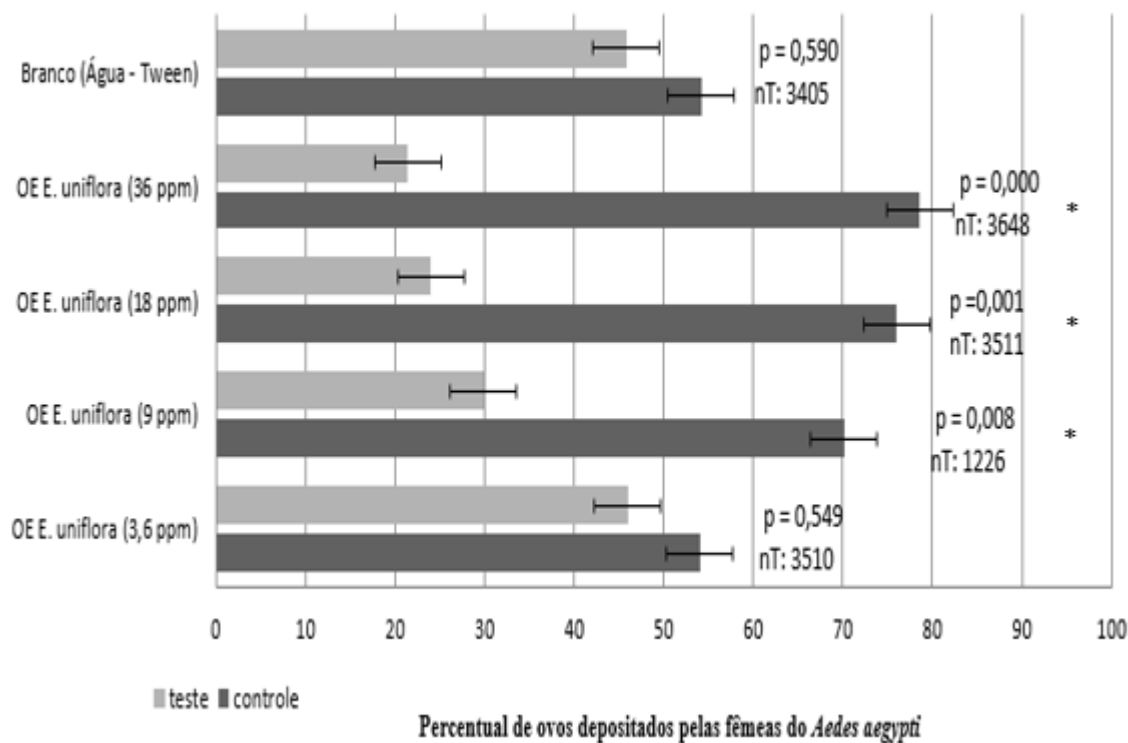


Figura 15

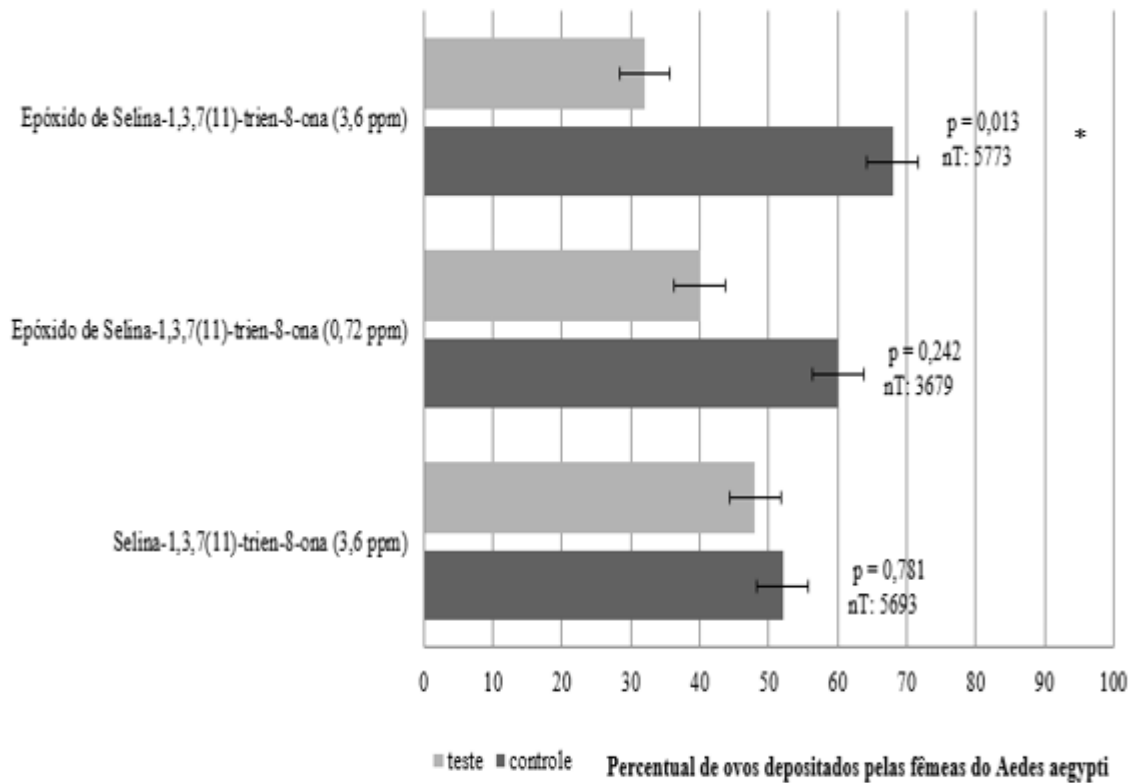


Figura 16

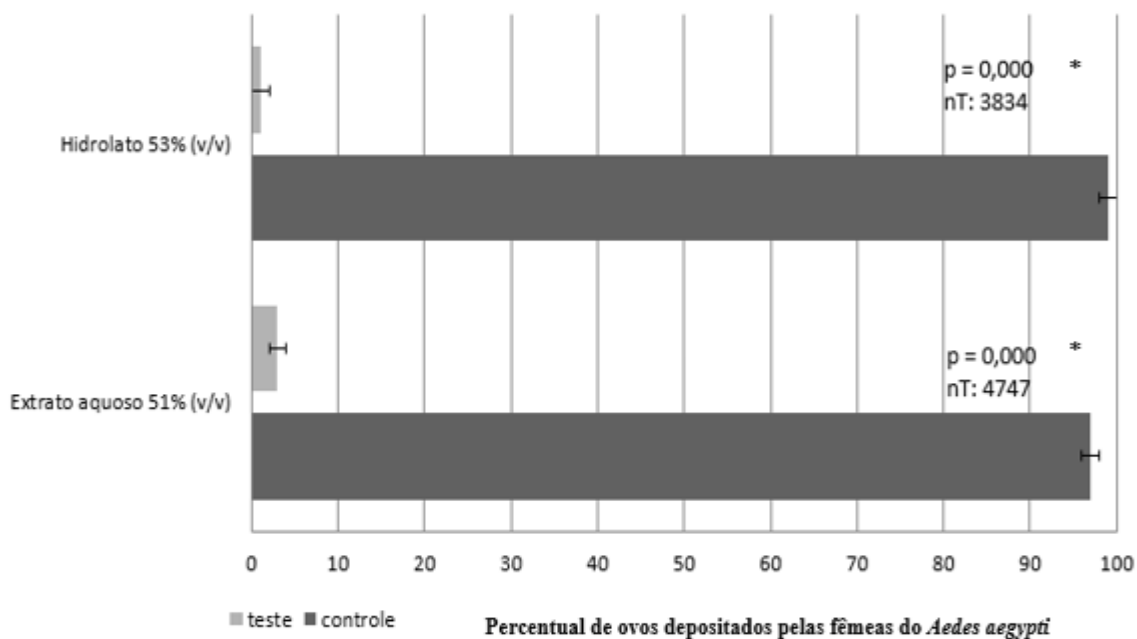


Figura 17

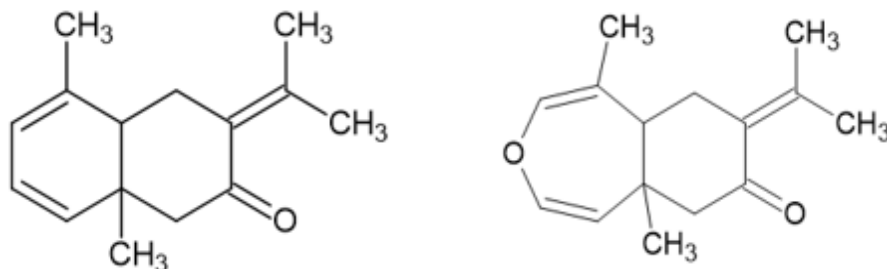


Figura 18

Produtos da <i>Eugenia uniflora</i>	N ^a	GL ^b	CL ₅₀ (95% IC) ^{c,d} (LCL-UCL) ^e	CL ₉₀ (95% IC) ^{c,d} (LCL-UCL) ^e
Óleo essencial	580	3	35,9 ± 1,02 ppm (34,3-37,6)	56,9 ± 1,04 ppm (53,2-61,8)
Extrato aquoso	300	3	51,4 ± 1,04 % (47,4-55,5)	95,8 ± 1,08 % (84,4-116,0)
Hidrolato	560	5	53,0 ± 1,02 % (50,7-55,2)	79,3 ± 1,03 % (75,0-84,9)
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	300	3	77,8 ± 1,06 ppm (71,1-89,3)	140,0 ± 1,14 ppm (114,0-201,0)
Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	340	3	41,2 ± 1,06 ppm (32,4-45,1)	92,2 ± 1,22 ppm (72,0-222,0)

^a número de larvas usadas no teste; ^b graus de liberdade; ^c concentração letal e intervalo de confiança; ^d cálculos usando o startplus; ^e concentrações letais mínimas e máximas estimadas pelo estatístico.

Figura 19

(Concentração)	IAO	Controle (%)	Teste (%)	p
Água-tween x Água-tween				
(Branco)	-0,08	54	46	0,590
Óleo essencial				
36 ppm	-0,57	79	21	0,000
18 ppm	-0,52	76	24	0,001
9 ppm	-0,40	70	30	0,008
3,6 ppm	-0,08	54	46	0,549
Extrato aquoso				
51% (v/v)	-0,95	97	3	0,000
Hidrolato				
53% (v/v)	-0,97	99	1	0,000
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona				
3,6 ppm	-0,05	52	48	0,781
Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona				
3,6 ppm	-0,36	68	32	0,013
0,72 ppm	-0,20	60	40	0,242

Figura 20

Composto	RI cal ^a .	RI lit ^b .	%	DP ^c
δ-elemeno	1334	1335	0,66	0,09
β-elemeno	1388	1389	7,21	0,84
Germacreno D	1477	1480	1,12	0,15
Biciclogermacreno	1493	1500	6,85	0,10
Germacreno B	1554	1559	1,69	0,16
Espatulenol	1574	1577	0,18	0,01
Óxido de Cariofileno	1580	1582	0,84	0,14
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1634	1632	65,83	0,54
Germacrona	1692	1693	0,72	0,19
Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1747	1746	13,53	1,21
Total			98,63	

^a Índice de retenção calculado com base nos tempos de retenção da série de n-alcanos (C9-C30); ^b Índice de retenção da literatura; Adams (2007); ^c desvio padrão da área do pico. Em negrito: constituintes majoritários.

RESUMO

FORMULAÇÃO DE UMA MICROEMULSÃO LARVICIDA E DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DA SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA E EPÓXIDO DE SELINA-1,3,7(11)-TRIEN-8-ONA APLICADA NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti*

A presente invenção consiste na formulação de uma microemulsão constituída por dois sesquiterpenos, Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, isolados do óleo essencial das folhas da *Eugenia uniflora* (pitangueira) para o controle populacional do *Aedes aegypti*, um dos mais importantes vetores de arboviroses. O óleo essencial foi obtido por meio do processo de hidrodestilação, que gerou como resíduo o hidrolato e extrato aquoso. Os compostos majoritários do óleo essencial foram isolados por meio da técnica de cromatografia em contracorrente (CCC), a identificação do óleo essencial e dos compostos isolados foi feita por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (CG-DIC). A presente formulação é capaz de reduzir 50% da população das larvas em concentrações que variam de 36 ppm à 77,8ppm para os diferentes produtos testados. A inibição da oviposição das fêmeas grávidas observada para o óleo essencial foi de 70% em uma concentração de 9,0 ppm e 79% em 36 ppm. Enquanto que para o composto isolado Epóxido de Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona a inibição foi de 68% em 3,6 ppm. Os subprodutos da hidrodestilação: hidrolato e extrato aquoso, apresentaram inibição na postura de ovos acima de 95% em uma concentração de aproximadamente 50% (v/v). Assim, os resultados obtidos demonstram notável potencial dos produtos naturais oriundos das folhas da pitangueira como candidatos para descontinuar o ciclo de reprodução do *Ae. aegypti* em alternativa aos inseticidas sintéticos existentes.