



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

(21) BR 102020015624-1 A2



(22) Data do Depósito: 30/07/2020

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

(54) **Título:** FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA LAURENCIA DENDROIDEA COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS.

(51) **Int. Cl.:** A01N 65/03; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 65/03.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA.

(72) **Inventor(es):** SUYANA KAROLYNE LINO DA ROCHA; DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO; KAMILA DE ANDRADE DUTRA; BHEATRIZ NUNES DE LIMA ALBUQUERQUE; CAMILA SOLEDADE DE LIRA PIMENTEL; JULIANE BERNARDI VASCONCELOS; MARCELO FELIPE RODRIGUES DA SILVA.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS. A presente invenção se trata da formulação do óleo essencial da alga *Laurencia dendroidea*, visando o controle do mosquito vetor *Aedes aegypti* obtido pela técnica de hidrodestilação. O óleo essencial hidrodestilado, derivado de *L. dendroidea* mostrou atividade larvicida significativa, com CL50 de 19,05 ppm (17,81-20,25). Esta mesma alga mostrou efeito de impedimento de oviposição significativo ($p < 0,05$) para o óleo essencial hidrodestilado a 15 e 20 ppm. Com isso, o uso desta formulação para o desenvolvimento de estratégias de controle que otimizam a alocação de recursos para reduzir a presença do *A. aegypti* por meio da interrupção do seu ciclo de vida são imprescindíveis para o manejo dessa praga.

Composto ¹	IR ²	I. <i>Aedes aegypti</i> HD	
		IR ³	%
2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	905	-	-
Silphiperfol-2-ene	1326	1328	0,50
Silphiperfol-6-ene	1377	1380	2,43
Pentadecane	1500	-	-
Tetradecanal	1509	1514	0,74
Silphiperfolan-7-beta-ol	1519	1523	42,40
Z-Dihydroagarofuran	1519	-	-
N1	-	1562	29,73
Tetradecanal	1611	-	-
Acenol beta	1646	-	-
8-Hydrodecene	1680	-	-
Heptadecane	1700	-	-
Pentadecanal	1716	1718	2,82
Cuparonal	1751	-	-
Hexahydrofarnesyl Acetone	1843	1845	1,79
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	1847	-	-
1-Nonadecene	1895	-	-

Figura 1

FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS.

[001] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de formulação à base de óleo essencial extraído da macroalga marinha *Laurencia dendroidea* J. Agardh visando o controle do vetor mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).

[002] No ano de 2019 foram registrados no Brasil cerca de 273.193 casos prováveis de dengue, 15.352 casos prováveis de febre de chikungunya e 2.344 casos prováveis de febre pelo vírus Zika. Dengue, Chikungunya, e Zika com seus respectivos vírus sorotipo DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4; CHIKV e ZIKV embora sejam doenças de agente etiológico viral pertencente a vírus diferentes, estão estreitamente ligadas entre si, pois estão veiculadas ao mesmo agente transmissor, o mosquito *A. aegypti*, de acordo com o Ministério da Saúde.

[003] O Brasil foi surpreendido por uma avassaladora epidemia do vírus Zika, com três prováveis fatores diferenciais para a situação ser tão grave: total de pessoas afetadas e velocidade de disseminação do vírus, gravidade das manifestações, incluindo a microcefalia nos filhos de mães acometidas durante a gravidez e o desenvolvimento de sequelas neurológicas em parte das pessoas que adoeceram (Valle et al. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, jun., 2016).

[004] Com base nessas informações, e além da falta de uma vacina eficaz, atualmente, os programas de controle de doenças como dengue, Zika e Chikungunya dependem quase exclusivamente dos esforços de controle do mosquito *A. aegypti*.

[005] Esses programas de controle vêm se mostrando promissores a partir do uso em conjunto dos diferentes métodos de controle, compreendendo o controle ambiental ou físico, o químico e o biológico, além de novas metodologias como a manipulação genética do vetor e o uso de bactérias endossimbiontes.

(Dutra, H.L., et al. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. PLoS neglected tropical diseases. v.9, e0003689, 2015.).

[006] O controle social, não menos importante, também é uma forma de intervenção e combate sendo alcançado através da eliminação dos criadouros potenciais, da aplicação de larvicidas em depósitos de água para consumo e o uso de inseticidas para combater as formas adultas durante a fase de transmissão (Gupta & Reddy. Fight against dengue in India: progresses and challenges. Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-013-3342-2,2013).

[007] Com o intuito de solucionar tais problemas, o produto aqui desenvolvido tem a finalidade de reduzir os sítios de oviposição do *A. aegypti*. A formulação reduzirá o número de focos de criação, minimizará a oviposição dos insetos vetores no ambiente urbano, reduzindo, assim, os casos de enfermidades ligadas a este vetor. Este produto será um aliado das vigilâncias epidemiológica, entomológica e ambiental e um nicho de mercado para as indústrias de inseticidas e repelentes.

[008] O uso de formulação à base de óleo essencial extraído de plantas terrestres na produção de repelentes e inseticidas contra o *A. aegypti*, e outras pragas agrícolas, como as descritas nas patentes BR 102016012050-0 A2, PI 0602027-5 A e BR102013033764-1 A2, já são conhecidos. O uso de óleo essencial no combate ao vetor mosquito *A. aegypti*, tem recebido atenção especial ultimamente, devido a sua variedade de compostos com atividades biológicas diversas, entre elas a de deterrente de oviposição. Desta forma, o uso de óleos essenciais no combate ao mosquito vetor da dengue mostrou-se como uma alternativa econômica e logisticamente viável.

[009] A busca por produtos de origem natural que possam substituir os inseticidas comuns é de grande relevância, visto que são menos agressivos ao meio ambiente.

[010] Nesse contexto, o interesse em produtos naturais marinhos para esse fim vem crescendo bastante, devido à elevada biodiversidade encontrada na costa brasileira e pela variedade de metabólitos presentes em sua composição (Gyawali; Ibrahim. Natural products as antimicrobial agents. Food Control, v. 46, p. 412–429, dez.2014). Muitos metabólitos secundários são encontrados em vários grupos de organismos marinhos, contudo, com maior frequência em cianobactérias e nos representantes de Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyceae (algas pardas).

[011] Dentre esses organismos, as algas vermelhas pertencentes ao "Complexo *Laurencia*", o qual atualmente abrange seis gêneros, dentre eles *Laurencia*, *Chondrophyucus*, *Laurenciella*, *Palisada*, *Osmundea* e *Yuzurua*, destacam-se por serem fontes de terpenos, somando cerca de 205 exemplares dessas classes de compostos, com diversas atividades biológicas reportadas na literatura.

[012] Além disso, extratos de algas marinhas tropicais mostraram-se eficientes contra mosquitos, sem efeitos deletérios ao ambiente, tornando os compostos bioativos de algas marinhas modelos promissores para novos inseticidas sintéticos (Bianco, E.M. et al. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). Industrial Crops and Products, v. 43, p. 270-5, 2013.)

[013] A invenção em questão trata-se da metodologia de formulação do óleo essencial extraído da Rhodophyta *Laurencia dendroidea* (Ceramiales), uma vez que há na literatura atividade biológica com extrato desta espécie e também com o elatol, um sesquiterpeno isolado de *L. dendroidea*, com potencial de atividade larvicida frente a larvas de *A. aegypti*. (Bianco, E.M. et al. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). Industrial Crops and Products, v. 43, p. 270-5, 2013.)

[014] O processo de obtenção da formulação, inicia-se com a coleta manual da alga *L. dendroidea*, em maré baixa (0,2 m de altura) nos recifes de arenito. Este procedimento foi realizado na costa do Estado de Pernambuco (Boa Viagem 08°07'S; 34°53'W). Após coleta, o material foi separado e armazenado em sacos plásticos devidamente etiquetados e fechados. A autenticação da espécie foi realizada no departamento de

Oceanografia da UFPE e um voucher de cada espécime depositado no Herbário UFP – Geraldo Mariz do Departamento de Botânica do Centro de Biociências da UFPE, sob os números UFP86818 a UFP86823.

[015] Posteriormente, as algas foram limpas e trituradas e em seguida colocadas em aparelho de Clevenger para realização da hidrodestilação sob 100 °C. Após extração, o óleo foi disperso num sistema isotrópico formado por água destilada e acetona, resultando na formulação.

[016] A identificação do óleo essencial foi realizada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0,25 µm espessura da película). 1 µL da solução (1000 µg/mL) do óleo essencial preparada em hexano foi analisada em split 1:20, co-eluída do mesmo volume de mistura de padrões de hidrocarbonetos C8-C30 (Sigma-Aldrich®).

[017] A temperatura do CG foi ajustada em 40 °C por 2 min, sendo então elevada em 4 °C min⁻¹ até alcançar 230 °C e mantida nesta temperatura por 5 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 7,364 psi. A interface do EM foi definida em 260 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan s⁻¹ com faixa de varredura de m/z 30-350.

[018] A identificação do óleo essencial foi realizada através do cálculo dos índices de Retenção (IR) de cada componente dos óleos essenciais, segundo a equação de Van den Dool & Kratz (1963).

[019] Os componentes do óleo foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção (IR) e posteriormente confirmados por comparação dos respectivos espectros de massa segundo a literatura (MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition e com os descritos por Adams (2009)). Na figura 1 encontramos a identificação do óleo essencial com seus índices de retenção e a porcentagem em massa de cada composto.

[020] Os majoritários do óleo essencial hidrodestilado são: silphiperfolan-7-β-ol (42,40%) e (-)-7-epi-silphiperfolan-6 β-ol, sendo o segundo majoritário por sua vez possível

identificar realizando o fracionamento por cromatografia em camada delgada (CCD) e CG-EM para verificação da pureza das frações.

[021] Primeiramente foram realizados ensaios preliminares para verificar o efeito larvicida da formulação à base de óleo essencial, determinando-se as respectivas faixas de concentração. Assim, uma solução estoque de 500 ppm foi preparada diluindo 50 mg do material em co-solvente, neste caso acetona, completado a um volume de 100 mL de água destilada.

[022] A partir desse estoque, por meio de diluição com água destilada, foram preparadas soluções nas concentrações 10, 50, 100 e 500 ppm. Os ensaios foram realizados em triplicata e para cada ensaio um controle negativo foi preparado com água destilada contendo a mesma quantidade do co-solvente utilizado na solução. Vinte larvas no quarto estágio inicial (L4) do mosquito *A. aegypti* foram introduzidas em 20 mL de cada solução em copinhos de plástico descartáveis (50 mL), na figura 2 podemos observar como foi realizado o teste larvicida.

[023] As soluções contendo as larvas foram monitoradas, contando-se o número de larvas mortas/vivas 24 e 48h após o início da exposição à solução contendo o óleo essencial. Para obtenção da concentração letal (CL50) da atividade larvicida foi seguida a mesma metodologia descrita para o bioensaio preliminar, porém, desta vez, na faixa de concentração de atividade para cada produto e os valores de CL50 foram calculados pela análise Probit usando o software StatPlus 2008. A razão de toxicidade foi determinada pelo quociente da alga de maior CL50 pelas demais.

[024] O bioensaio larvicida do óleo de *L. dendroidea* alcançou resultado de dose-mortalidade, assumindo o modelo de Probit com valores de CL50 de 19,05 (17,81 – 20,25) ppm, como podemos observar na figura 3.

[025] Nenhuma mortalidade foi observada em qualquer um dos ensaios de controle, indicando que a quantidade de solvente usado para solubilizar a amostra foi menor do que a necessária para causar danos às larvas.

[026] O bioensaio larvicida do óleo essencial da alga *L. dendroidea* mostrou resultado promissor, verificando baixa concentração para alcançar a mortalidade, demonstrando ser ativo para interrupção do ciclo de vida na fase aquática do mosquito *A. aegypti*.

[027] A CL50 do bioensaio larvicida foi usado como parâmetro para a concentração no teste de deterrência de oviposição, deste mesmo óleo essencial, preparou-se uma solução estoque de 20 ppm pesando-se 2 mg do material e diluindo-o em 1,4 mL de acetona, completando com água destilada até um volume de 100 mL, em seguida foi preparada a solução controle com 1,4 mL de acetona completando-o com água destilada até um volume de 100 mL.

[028] Dez fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram colocadas em uma gaiola de bioensaio (33cm×21cm×30cm) contendo dois copos de 50 mL, um com a solução controle e o outro com a solução do teste contendo papéis de filtro quadrados (lado= 7 cm) colocados sobre a superfície interna de cada copinho para fornecer um suporte para oviposição das fêmeas, conforme figura 4 ilustrando o bioensaio de oviposição. O volume total de cada solução nos copinhos foi de 25 mL. Os copos foram dispostos na diagonal nas gaiolas e de maneira alternada. Além desta concentração, outros dois testes de oviposição foram realizados nas concentrações de 5 e 15 ppm seguindo o mesmo roteiro de preparo da solução e montagem do ensaio.

[029] Os insetos foram mantidos a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70\pm 5\%$ de umidade relativa, durante 16 h no escuro. A resposta de oviposição foi determinada a partir do número de ovos postos em cada um dos papéis de filtro.

[030] O experimento foi repetido oito vezes e os dados foram analisados utilizando o teste-t de Student, no qual valores de $p < 0,05$ foram considerados para representar diferenças significativas entre os valores médios (Navarro, D.M.A.F. et al. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). Journal of Applied Entomology, v. 127, p.46-50, 2003.)

[031] Os bioensaios foram realizados com o objetivo de verificar o comportamento das fêmeas grávidas de *A. aegypti* frente à formulação do óleo de *L. dendroidea*, uma vez que os mosquitos são submetidos ao odor provocado pelos compostos voláteis.

[032] Os bioensaios de deterrência de oviposição do óleo essencial hidrodestilado a 20 e 15 ppm derivado de *L. dendroidea* mostraram efeito de impedimento de oviposição significativo ($p < 0,05$), em que o número de ovos colocados nos papéis de filtro em copos contendo solução de teste foi significativamente menor do que nos copos dos controles, na figura 5 encontramos a resposta de oviposição de *A. aegypti* ao óleo essencial de *L. dendroidea*. Na concentração de 5 ppm, não houve resultado significativo.

[034] Com base nos resultados obtidos e com o gráfico, foi possível calcular a porcentagem de repelência efetiva para cada concentração 15 e 20 ppm, usando a seguinte fórmula (Rajkumar S, Jebanesan A. 2009 Larvicidal and oviposition activity of *Cassia obtusifolia* Linn (Family: Leguminosae) leaf extract against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Parasitol Res., 104: 337–40).

$$ER\% = \frac{NC - NT}{NC} \times 100$$

[035] Onde, ER = repelência efetiva, NC = Número de ovos no controle, NT = Número de ovos na solução.

[036] Além da porcentagem de repelência efetiva, é possível calcular também o índice de atividade de oviposição (OAI), usando a seguinte fórmula. (Kramer WL, Mulla S. 1979. Atratores de oviposição e repelentes de mosquitos: respostas à oviposição de *Culex* mosquitos a infusões orgânicas. Enviro Entomol., 8: 1111–1).

$$OAI = \frac{NT - NS}{NT + NS}$$

[037] Onde, NT = Número total de ovos na solução de teste e NS = Número total de ovos na solução controle.

[038] O índice de repelência efetiva foi de 94% e 87%, respectivamente, para as concentrações de 15 e 20 ppm de repelência. Para o índice de atividade de repelência, valores abaixo de -0,3 indicam preferência pelo controle, considerando-se repelentes e valores acima de +0,3 indicam preferência pelo teste, considerando-se atraentes. Com base nesses parâmetros, foi possível observar para as concentrações 15 e 20 ppm os seguintes resultados -0,88754 e -0,77719, respectivamente.

[039] Esses resultados demonstram que, mesmo havendo alguma possibilidade de oviposição num sítio tratado com o óleo essencial de *L. dendroidea*, este produto ainda pode ocasionar a mortalidade de 50% das larvas eclodidas para o óleo essencial, uma vez que foi testado na CL50 do bioensaio larvicida.

[040] Estes dados confirmam que esta alga demonstra ser eficaz para interrupção do ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*.

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS caracterizada por conter acetona, água e óleo essencial obtido pela hidrodestilação da alga *L. dendroidea*.
2. FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS caracterizado por se destacar, mostrando atividade significativa para o ensaio larvicida, com CL50 de 19,05 ppm (17,81-20,25); para a formulação do óleo essencial.
3. FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS caracterizado por ser uma solução estoque de 15 e 20 ppm, pesando-se 1,5 mg e 2 mg do material respectivamente e diluindo-o em 1,4% de acetona, para 98,6 % de água destilada..
4. FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS caracterizado por mostra um índice de repelência de 94% na concentração de 15 ppm e 87% na concentração de 20 ppm.
5. FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS, caracterizado pela presença de compostos promissores a partir da alga desta pesquisa como: (silphiperfolan-7- β -ol e (-)-7-epi-silfiperfolan-6 β -ol) identificados no óleo, no que diz respeito a moléculas bioativas para o sucesso da interrupção do ciclo biológico do *A. aegypti* e que podem atuar como um forte componente dentro do controle e manejo desta praga, a partir do desenvolvimento de

estratégias que otimizam a alocação de recursos, dos produtos marinhos, para reduzir a presença do *A. aegypti*.

1. USO DA FORMULAÇÃO
2. FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS caracterizado por apresentar atividade deterrente de oviposição contra o *Aedes aegypti*

DESENHOS

Composto ¹	IR ²	<i>L. dendroidea</i> HD	
		IR ³	%
2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	905	-	-
Silphiperfol-5-ene	1326	1328	0,50
Silphiperfol-6-ene	1377	1380	2,43
Pentadecane	1500	-	-
Tridecanal	1509	1514	0,74
Silphiperfolan-7-beta-ol	1519	1523	42,40
Z-Dihydroagarofuran	1519	-	-
NI		1562	29,73
Tetradecanal	1611	-	-
Acorenol beta	1636	-	-
8-Heptadecene	1680	-	-
Heptadecane	1700	-	-
Pentadecanal	1716	1718	2,82
Cuparenal	1751	-	-
Hexahydrofarnesyl Acetone	1843	1845	1,79
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	1847	-	-
1-Nonadecene	1895	-	-

Figura 1



Figura 2

Produto da Alga 3 Ld	N¹	GL²	CL50³ (IC95%)	X²
Óleo essencial HD	420	5	19,05 (17,81 – 20,25) ppm	0,9751

Figura 3



Figura 4

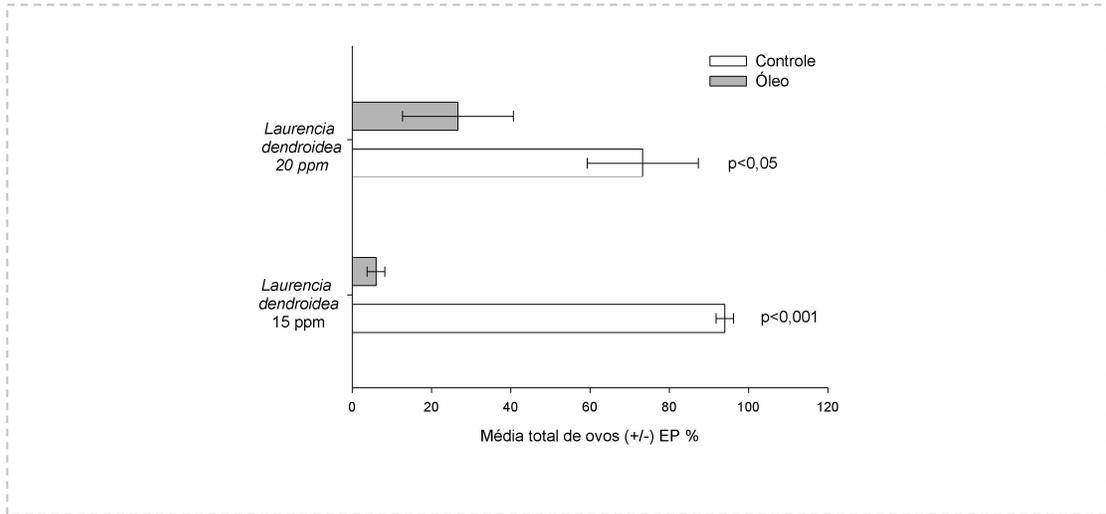


Figura 5

RESUMO**FORMULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MACROALGA MARINHA *Laurencia dendroidea* COMO DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DE MOSQUITO E USOS**

A presente invenção se trata da formulação do óleo essencial da alga *Laurencia dendroidea*, visando o controle do mosquito vetor *Aedes aegypti* obtido pela técnica de hidrodestilação. O óleo essencial hidrodestilado, derivado de *L. dendroidea* mostrou atividade larvicida significativa, com CL50 de 19,05 ppm (17,81-20,25). Esta mesma alga mostrou efeito de impedimento de oviposição significativo ($p < 0,05$) para o óleo essencial hidrodestilado a 15 e 20 ppm. Com isso, o uso desta formulação para o desenvolvimento de estratégias de controle que otimizam a alocação de recursos para reduzir a presença do *A. aegypti* por meio da interrupção do seu ciclo de vida são imprescindíveis para o manejo dessa praga.