



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

(21) BR 102019014123-9 A2



(22) Data do Depósito: 08/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) **Título:** USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE PORTULACA PILOSA PARA ATIVIDADE LARVICIDA

(51) **Int. Cl.:** A01N 65/42; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 65/42.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS.

(72) **Inventor(es):** ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; DANIEL TARCISO MARTINS PEREIRA; IVONE ANTONIA DE SOUZA; KEYLA EMANUELLE RAMOS DA SILVA; STÉFANI FERREIRA DE OLIVEIRA; RÔMULO CARLOS DANTAS DA CRUZ; MARIA RAIMUNDA MAGALHÃES MENDES; RAÍRA JUSTINO DE OLIVEIRA COSTA; NIÉDJA FELICIANO DE FRANÇA; MARCILENE SOUZA DA SILVA; EMANUELLE MARIA DA SILVA.

(57) **Resumo:** USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE PORTULACA PILOSA PARA ATIVIDADE LARVICIDA. A presente patente de invenção refere-se ao uso da solução à base do extrato etanólico de Portulaca pilosa para atividade larvicida. Foi verificada a presença de taninos condensados, catequinas, flavonas, saponinas, flavonóides e chalconas no Extrato Etanólico de Portulaca pilosa (EEPP). A solução contendo o EEPP foi testada e causou 60% de mortalidade de larvas de terceiro e quarto instar de *Ae. aegypti*, após 24 horas de exposição. Foi realizado o teste de toxicidade aguda (Dose Letal 50) da solução contendo o EEPP, e foi constatado que, apesar de alguns sinais clínicos comportamentais apresentados, não apresentou toxicidade aguda na dose testada, não havendo morte dos camundongos testados. O extrato etanólico de *P. pilosa*, na faixa de concentração avaliada, demonstra atividade inseticida sobre larvas de *Ae. aegypti*.

USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA

01. A presente invenção refere-se ao uso da solução à base do extrato etanólico de *Portulaca pilosa* para atividade larvicida.

02. *Portulaca pilosa*, conhecida popularmente como “amor crescido” apresenta ampla distribuição na América tropical e subtropical, sendo encontrada principalmente na região norte do Brasil.

03. *P. pilosa* possui um amplo espectro de propriedades farmacológicas, que estão associadas com seus diversos constituintes químicos, incluindo flavonóides, alcalóides, polissacarídeos, ácidos graxos, terpenóides, esteróis, proteínas, vitaminas e minerais.

04. Dentre os problemas de saúde pública que acometem a população humana, têm apresentado destaque a dengue, zika e chikungunya, cujo principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*. Para a redução da densidade populacional desse vetor, recomenda-se o controle integrado com o uso de inseticidas.

05. Uma alternativa aos inseticidas sintéticos, com menor impacto ambiental e elevada taxa de biodegradabilidade são os inseticidas de origem vegetal. Dessa forma, faz-se necessário buscar inseticidas alternativos que possam contribuir no controle desse vetor.

06. A invenção possui como finalidade apresentar uma solução à base do extrato etanólico de *P. pilosa* com atividade larvicida.

07. Para obtenção do extrato etanólico de *P. pilosa*, o material vegetal fresco, após a limpeza foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar (35 - 45°). O material vegetal foi triturado e armazenado em sacos de papel. A extração foi realizada por percolação fracionada por 2 -5 dias, utilizando solvente etanol 80-98%.

08. O extrato foi submetido a um evaporador rotatório e, em seguida, levado à estufa com circulação de ar (35 - 45°). O extrato seco foi armazenado em um recipiente de vidro e acondicionado em a uma temperatura de $-4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, até a realização dos ensaios biológicos e da análise química.

09. Para a realização da análise química do Extrato Etanólico de *Portulaca pilosa* (EEPP), a prospecção fitoquímica foi realizada segundo a metodologia descrita por Matos (2001). O EEPP foi analisado através de ensaios cromatográficos usuais em tubos de ensaio, utilizando-se reagentes convencionais para a detecção de grupos fenólicos específicos.

10. Inicialmente, preparou-se uma solução-estoque, a partir do extrato bruto de *Portulaca pilosa*. A clorofila da amostra foi retirada com o auxílio do solvente clorofórmio, em seguida a amostra foi diluída em metanol 70% até completar o volume de 50 mL. A solução-estoque foi padronizada para pH 4. Todos os ensaios na análise fitoquímica foram realizados a partir da solução-estoque e os resultados baseados na mudança de coloração após a reação, quando comparados com o branco.

11. Os ensaios foram realizados para fenóis, taninos, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, saponinas, flavonóides, antocianidinas e chalconas. Foi verificada a presença de taninos condensados, catequinas, flavonas, saponinas, flavonóides e chalconas no EEPP.

12. Para avaliação da atividade larvicida do EEPP, foram utilizadas larvas de *Ae. aegypti* entre o terceiro e quarto instar (4 a 5 dias de vida) oriundas de uma colônia de terceira geração, a partir de ovos da linhagem *Rockefeller*. Para a realização dos ensaios biológicos, foi utilizada a metodologia adaptada de World Health Organization (1970).

13. Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada, com temperatura média de 27 °C e umidade média de 70%. Para o ensaio larvicida foram utilizadas 30 larvas por repetição, totalizando 120 larvas por tratamento. As larvas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e postas em recipientes semi acrílico (6,5 cm de altura x 5,0 cm de largura). As larvas foram expostas às concentrações na faixa de 1,0 - 2,5 mg/mL do EEPP. Para realização do bioensaio o EEPP foi solubilizado com uma solução de Tween 80 e água deionizada na faixa de 2 a 5 %, essa mesma proporção foi utilizada para a obtenção da solução estoque do grupo controle. As observações da mortalidade das larvas foram feitas em sete intervalos na faixa de 30min a 24h, após o início do experimento.

14. A solução contendo o EEPP na faixa de concentração de 1,5 - 2,0 mg/mL induziu a morte em 60% das larvas de *Ae. aegypti* testadas com 24h de exposição, apresentando um índice de mortalidade moderada, considerando a baixa concentração de extrato utilizado. Alguns estudos de outros inseticidas relatam índice de mortalidade na faixa de 60% quando utilizada concentração acima de 10 mg/mL de extrato.

15. Foi realizada a avaliação da atividade toxicológica aguda (Dose Letal 50) da solução contendo o EEPP, segundo a metodologia preconizada pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD), adotando-se o guia OECD 423/2001, o qual recomenda a utilização de fêmeas adultas de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

16. Inicialmente três animais foram submetidos à administração da dose máxima preconizada de 2000mg/kg da solução à base de EEPP, como não foi observado morte após a administração, deu-se andamento na metodologia. Foi utilizado também três animais no grupo controle, que receberam a formulação de Tween 80 e água deionizada na faixa de 2 a 5 %, sem o EEPP.

17. As administrações das soluções do grupo controle e do grupo tratado à base de EEPP foram feitas por gavagem e a observação individual nas duas primeiras horas após receberem a dose inicial do tratamento, e periodicamente durante 14 dias. Os sinais clínicos observados foram às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

18. Os animais foram privados da alimentação por duas horas antes do início do procedimento experimental e por mais duas horas após a administração, por via oral, da solução à base de EEPP. A água foi *ad libitum* até o término do experimento. Ao final do 14º dia de observação, os animais foram anestesiados e eutanasiados.

19. Os sinais clínicos observados relacionados às diversas reações comportamentais com o Sistema Nervoso Central (SNC) com efeitos estimulantes foram andar em círculo, estereotipia e aumento da função cardíaca e para os efeitos depressores ambulação diminuída e prostração.

20. Os sinais clínicos observados relacionados às diversas reações comportamentais com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) foram diurese, piloereção, refluxo, espasmo e edema do focinho. Quanto a outros sinais foi observado fotofobia, inversão de marcha e isolamento. Apesar da observação desses sinais clínicos relacionados a reações comportamentais não houve morte dos animais, indicando que a solução contendo o EEPP não apresenta toxicidade. Os animais do grupo controle manifestaram sinais clínicos semelhantes ao do grupo tratado e também não houve mortalidade.

21. Desta forma, a solução contendo o EEPP na faixa de concentração testada, apresenta promissor efeito larvicida, com potencial ação para o controle deste vetor e não apresenta toxicidade a mamíferos.

REIVINDICAÇÕES

1. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, caracterizado por conter extrato etanólico de *Portulaca pilosa*.
2. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo efeito larvicida do extrato de *P. pilosa* em larvas de *Aedes aegypti*.
3. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por conter uma solução à base de *P. pilosa*, tween 80 na faixa de 2 a 5% e água destilada, utilizado no teste de avaliação da atividade larvicida.
4. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela solução contendo o extrato etanólico à base de *P. pilosa* apresentar eficiência na faixa de concentração de 1,5 - 2,0 mg/mL, induzindo a morte em até 60% das larvas, no período de 24 horas.
5. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado pela solução contendo o extrato etanólico à base de *P. pilosaa* não apresentar toxicidade aguda para a espécie humana, não havendo morte dos camundongos testados.
6. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado pela solução contendo o extrato etanólico à base de *P. pilosa* ser uma alternativa para uso em programas de controle vetorial de *A. aegypti*.
7. **USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizado pela solução contendo o extrato etanólico à base de *P. pilosa* ter base aquosa, não conter aromatizador, apresentar elevada taxa de biodegradabilidade e ser menos prejudicial à saúde humana.

8. USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, caracterizado pela solução contendo o extrato etanólico à base de *P. pilosa* ser uma alternativa aos inseticidas sintéticos e tem menor impacto ambiental por ser de origem vegetal.

RESUMO**USO DA SOLUÇÃO À BASE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PORTULACA PILOSA* PARA ATIVIDADE LARVICIDA**

A presente patente de invenção refere-se ao uso da solução à base do extrato etanólico de *Portulaca pilosa* para atividade larvicida. Foi verificada a presença de taninos condensados, catequinas, flavonas, saponinas, flavonóides e chalconas no Extrato Etanólico de *Portulaca pilosa* (EEPP). A solução contendo o EEPP foi testada e causou 60% de mortalidade de larvas de terceiro e quarto instar de *Ae. aegypti*, após 24 horas de exposição. Foi realizado o teste de toxicidade aguda (Dose Letal 50) da solução contendo o EEPP, e foi constatado que, apesar de alguns sinais clínicos comportamentais apresentados, não apresentou toxicidade aguda na dose testada, não havendo morte dos camundongos testados. O extrato etanólico de *P. pilosa*, na faixa de concentração avaliada, demonstra atividade inseticida sobre larvas de *Ae. aegypti*.