



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

(21) BR 102020013253-9 A2



(22) Data do Depósito: 27/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 11/01/2022

(54) **Título:** EMULSÃO À BASE DE EUTERPE OLERACEA MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA

(51) **Int. Cl.:** A01N 65/40; A01N 25/04; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 65/40; A01N 25/04.

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

(72) **Inventor(es):** PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; LARISSA ARAÚJO ROLIM; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; IVONE ANTONIA DE SOUZA; KEYLA EMANUELLE RAMOS DE HOLANDA; STÉFANI FERREIRA DE OLIVEIRA; RÔMULO CARLOS DANTAS DA CRUZ; RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA; NIÉDJA FELICIANO DE FRANÇA; MARCILENE SOUZA DA SILVA; EMANUELLE MARIA DA SILVA.

(57) **Resumo:** EMULSÃO À BASE DE Euterpe oleracea MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA. A presente patente de invenção refere-se ao uso da emulsão à base de Euterpe oleracea para atividade larvicida. A emulsão contendo o óleo de E. oleracea, tween 80 e água destilada foi testada e levou a 100% 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 emulsão contendo óleo de E. oleracea, e foi constatado que, apesar de alguns sinais clínicos comportamentais apresentados, não apresentou toxicidade aguda na dose testada, não havendo morte dos camundongos testados. A emulsão contendo o óleo de E. oleracea, na faixa de concentração avaliada, demonstra atividade inseticida sobre larvas de Ae. aegypti.

RELATÓRIO DESCRITIVO

EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA

01. A presente invenção refere-se ao uso da emulsão à base do óleo de *Euterpe oleracea* Mart. com atividade larvicida.

02. *E. oleracea*, conhecida popularmente como “açai” ou “açazeiro”, é predominantemente encontrada na Amazônia, no norte do Brasil. Nos últimos anos, o seu fruto vem sendo exportado para países como Estados Unidos e Alemanha, tanto para consumo alimentício quanto para pesquisa (GARZON et al., 2017; ROGEZ, 2000).

03. O perfil fitoquímico do óleo de *E. oleracea* apresenta os seguintes compostos: 2,4-Decadienal; Ácido Dodecanóico; Ácido Mirístico; Ácido Hexadecanóico, metil éster; Ácido Pentadecanóico; 6-Pentadecen-1-ol; Ácido 6-Octadecanóico; Escaleno e Cholest -5-em-3ol, 6 nitro-acetato (éster), 3 (beta).

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.

3. 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.

4. A presente invenção se refere a uma emulsão à base do óleo de *E. oleracea* com atividade larvicida.

5. Para obtenção do óleo de *E. oleracea*, o material vegetal fresco, após a limpeza com água corrente, foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar (35 - 45°C). O material vegetal foi triturado utilizando moinho de facas. A extração foi realizada por ultrassom, no tempo de 2 horas, utilizando como solvente hexano.

6. O extrato foi submetido a um evaporador rotatório. O óleo 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.
7. Para a realização do perfil fitoquímico do óleo de *E. oleracea*, a análise foi realizada usando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa equipado com uma coluna capilar (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25mm filme espesso). O hélio foi usado como gás de transporte a uma taxa de fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão de 5,8 psi. O programa de temperatura do forno foi de 70°C (4 min) a 280°C (15 min) seguido por $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a 290°C , com a temperatura do injetor a 280°C , interface a 280°C e fonte de íons a 220°C . Um microlitro da solução de amostra em hexano foi injetado com uma razão de *split* 1:5. Os espectros de massa foram obtidos em uma faixa de varredura de 40-500 u.m.a e uma energia de impacto de elétrons de 70 eV. A identificação dos compostos foi realizada comparando os valores com os dados da biblioteca.
8. A emulsão foi preparada por meio do processo de homogeneização do óleo de *E. oleracea* como insumo farmacêutico ativo, na faixa de concentração de 0,25 – 7,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,4 mL tween 80 e água q.s.p para o volume de 1 mL.
9. Para avaliação da atividade larvicida da emulsão à base de *E. oleracea*, 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).
10. 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 semiacrílico (6,5 cm de altura x 5,0 cm de largura). As larvas foram expostas à emulsão contendo óleo de açaí na faixa de concentração de 0,25 – 7,5 mg/mL , 0,4 mL tween 80 e água q.s.p para o volume de 1 mL. As observações da mortalidade das larvas foram feitas em sete intervalos na faixa de 30min a 24h, após o início do experimento.

11. Foi realizada a avaliação da atividade toxicológica aguda (Dose Letal 50) da emulsão à base de *E. oleracea*, 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*).

12. Inicialmente, três animais foram submetidos à administração da dose máxima preconizada de 2000 mg.kg⁻¹ da emulsão à base do óleo de *E. oleracea*, como não foi observado morte após a administração, prosseguiu-se com a metodologia. Foram utilizados também três animais no grupo controle, que receberam a formulação sem o óleo de *E. oleracea*.

13. A administração da emulsão no grupo controle e no grupo tratado à base do óleo de *E. oleracea* foi feita por gavagem e a observação individual foi realizada nas duas primeiras horas após receberem a dose inicial do tratamento, e periodicamente durante 14 dias. Os sinais clínicos observados foram as diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

14. 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 emulsão à base de *E. oleracea*. A água foi *ad libitum* até o término do experimento. Ao final do 14º dia de observação, os animais foram anestesiados e eutanasiados.

15. A emulsão contendo óleo de açaí na faixa de concentração de 0,25 – 7,5mg.mL⁻¹ induziu a morte em 100% das larvas de *Ae. aegypti* testadas com 24h de exposição, apresentando índice de mortalidade total, considerando a baixa concentração de óleo utilizado. Alguns estudos com inseticidas de origem vegetal relatam índice de mortalidade na faixa de 60% quando utilizada concentração acima de 10 mg.mL⁻¹ de extrato.

16. Os sinais clínicos observados relacionados às diversas reações comportamentais com o Sistema Nervoso Central (SNC) com efeitos estimulantes foram agitação, agressividade, aumento da frequência cardíaca, ereção de cauda, movimento de vibrissas, movimento estereotipado, piloereção e postura em garra e para os efeitos depressores fotofobia e prostração.

17. Os sinais clínicos observados relacionados às diversas reações comportamentais com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) foram contorções, defecação aumentada, diurese, espasmos musculares, excreção e reação de fuga. Quanto a outros sinais, foi observada autolimpeza, escalar e limpeza. Apesar da observação desses sinais clínicos relacionados a reações comportamentais, não houve morte dos animais, indicando que a emulsão contendo o óleo de *E. oleracea* não apresenta toxicidade. Os animais do grupo controle manifestaram sinais clínicos semelhantes ao do grupo tratado e também não houve mortalidade.

18. Desta forma, a emulsão contendo o óleo de *E. oleracea*, 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. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, caracterizado por conter óleo de *Euterpe oleracea*, como insumo farmacêutico ativo, tween 80, como emulsificante, e água destilada.
2. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, caracterizado pelo efeito larvicida do óleo de *Euterpe oleracea* em larvas de *Aedes aegypti*.
3. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processo de extração realizado por ultrassom, por 2 horas com solvente hexano.
4. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* COM MART. ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por secar o extrato hexânico de *E. oleracea* utilizando evaporação rotativa.
5. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por conter uma emulsão à base do óleo de *E. oleracea* utilizada no teste de avaliação da atividade larvicida.
6. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela emulsão à base do óleo de *E. oleracea* apresentar eficiência na faixa de concentração de 0,25 – 7,5 mg.mL⁻¹, induzindo a morte de 100% das larvas, no período de 24 horas.
7. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela emulsão à base do óleo de *E. oleracea* não apresentar toxicidade aguda.
8. **EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela emulsão à base do óleo de *E. oleracea* ser uma alternativa para uso em programas de controle vetorial de *Ae. Aegypti*.

9. EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela emulsão à base do óleo de *E. oleracea* conter uma base oleosa, sem aromatizador, apresentando uma elevada taxa de biodegradabilidade e ser menos prejudicial à saúde humana.

10. EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela emulsão à base do óleo de *E. oleracea* ser uma alternativa aos inseticidas sintéticos e tem menor impacto ambiental por ser de origem vegetal.

RESUMO**EMULSÃO À BASE DE *Euterpe oleracea* MART. COM ATIVIDADE LARVICIDA**

A presente patente de invenção refere-se ao uso da emulsão à base de *Euterpe oleracea* para atividade larvicida. A emulsão contendo o óleo de *E. oleracea*, tween 80 e água destilada foi testada e levou a 100% 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 emulsão contendo óleo de *E. oleracea*, e foi constatado que, apesar de alguns sinais clínicos comportamentais apresentados, não apresentou toxicidade aguda na dose testada, não havendo morte dos camundongos testados. A emulsão contendo o óleo de *E. oleracea*, na faixa de concentração avaliada, demonstra atividade inseticida sobre larvas de *Ae. aegypti*.