



* B R 1 0 2 0 2 2 0 1 0 9 8 4 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022010984-2 A2

(22) Data do Depósito: 03/06/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
19/12/2023

(54) **Título:** EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE AEDES AEGYPTI

(51) **Int. Cl.:** A01N 43/30; A01N 43/40; A01N 25/04; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 43/30; A01N 43/40; A01N 25/04; A01P 7/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA - IFPB.

(72) **Inventor(es):** ALEXANDRE JOSÉ DA SILVA GÓES; MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA; IVONE ANTÔNIA DE SOUZA; RÔMULO CARLOS DANTAS DA CRUZ; KARINE DA SILVA CARVALHO; MARCILENE SOUZA DA SILVA.

(57) **Resumo:** EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*. A presente patente de invenção descreve o uso da emulsão à base de uma amida de cadeia carbônica saturada, derivada da piperina, para o controle de mosquitos, prioritariamente o *Aedes aegypti*. O composto sintético foi obtido a partir da piperina, por meio de redução catalítica sob atmosfera de hidrogênio por seis horas. O óleo amarelado obtido foi testado e ocasionou 100% de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*, após 8 horas de exposição na concentração avaliada apresentando-se como um potente inseticida. Paralelamente, esse composto após a administração da dose de 300 mg.kg⁻¹ em camundongos não demonstrou efeitos tóxicos relevantes, sendo, portanto, seguro na concentração avaliada em mamíferos.



Figura 1

EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*

Campo da invenção

[001] A presente patente de invenção descreve o uso da emulsão à base de uma amida de cadeia carbônica saturada, derivada da piperina, para o controle de mosquitos, prioritariamente o *Aedes aegypti*.

Fundamentos da invenção

[002] A emulsão à base da tetrahidropiperina, demonstrou ser um produto de grande utilidade pública devido aos resultados obtidos. Para obtenção do princípio ativo, o isolamento do seu precursor, a piperina, se deu por um método simples e de baixo custo, em poucas horas obtivemos 8,5g com rendimento de 2,65% do produto puro. Ao realizarmos a síntese, para obtenção da tetrahidropiperina, também realizamos reação simples para sua obtenção, com rendimento de 80%. A baixa solubilidade em água de diversos compostos promissores para o controle e combate ao *Ae. aegypti*, principalmente os sintéticos, é um problema técnico existente para os pesquisadores. Sabendo disso, a presente invenção possibilita o uso da emulsão à base da tetrahidropiperina para o controle das larvas do *Ae. aegypti*, podendo ser uma excelente formulação aplicável em água potável. Os estudos preliminares de toxicidade aguda, foi capaz de rastrear a dose de segurança desta formulação em mamíferos, quando avaliadas, utilizando fêmeas adultas de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta o esquema de síntese para obtenção da tetrahidropiperina 2, a partir da piperina 1.

A Figura 2 ilustra a mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas a emulsão à base de piperina 1 (barras azuis) e do seu derivado tetrahidropiperina 2 (barras vermelhas) após oito horas de exposição.

A Figura 3 ilustra a mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas a emulsão à base de piperina 1 (barras azuis) e do seu derivado tetrahidropiperina 2 (barras vermelhas) após 24 horas de exposição.

Descrição da invenção

[003] A presente invenção refere-se a emulsão à base da tetrahidropiperina 2, derivado da piperina 1 (Figura 1), na qual foi isolada dos frutos secos da *Piper nigrum* com atividade larvicida.

[004] A pimenta do reino (*P. nigrum*), pertence à família Piperaceae e é uma das especiarias mais utilizadas em todo o mundo, tanto como condimento quanto por seus efeitos terapêuticos. Diversos estudos demonstram que essa planta apresenta propriedades farmacológicas, tais como: anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, anticâncer, imunomodulatório, dentre outras (UI HAQ et al., 2020).

[005] Investigações fitoquímicas realizadas nas últimas décadas, revelaram que esta especiaria possui diversos metabólitos e que se distribuem em diferentes classes, entre elas, amidas/alcaloides, propenilfenalinas, dentre outras (BOMTEMPO, 2007; BONG et al., 2010, UI HAQ et al., 2020).

[006] A piperina (1-piperoil-piperidina) 1 é uma amida natural presente em diferentes espécies do gênero Piper, sendo mais abundante nos frutos de *P. nigrum*, além de ser a substância mais abundante na pimenta do reino, apresentando concentração de 3-7% (ROMÃO et al., 2008).

[007] A situação entomológica enfrentada no Brasil, em relação as arboviroses causadas pelo *Aedes aegypti*, é um grave problema de saúde pública. Diante disso a forma mais eficaz de prevenção dessas doenças é o controle populacional do mosquito.

[008] Por anos, o controle das populações de *Ae. aegypti* foi feito pelo uso de inseticidas sintéticos, porém o uso indiscriminado e rotineiro, tem selecionado populações de mosquitos resistentes, além de intoxicação em seres humanos e negativo impacto ambiental. Dessa forma, com o crescimento dessas arboviroses no

Brasil, se faz necessário a descoberta de novos compostos bioativos de origem natural, que possam ser usados como larvicidas.

[009] Diante do exposto, a presente invenção refere-se a emulsão à base da tetrahidropiperina, derivado da amida natural isolada dos frutos secos da *P. nigrum* com atividade larvicida.

[0010] Para a obtenção da piperina 1 pura, aplicamos um novo método de extração e purificação simultânea utilizando o aparelho Góes. Desse modo, os frutos secos da *P. nigrum* foram triturados e resultou em um pó ao qual foi submetido a extração e purificação pelo método Góes, e à medida que o extrato foi surgindo, houve a separação do produto através da coluna de sílica, retida na parte inferior do aparelho. Durante 8 horas, utilizando 320 g da pimenta do reino triturada, 80 g de gel de sílica e 600 mL de eluente, obtivemos 8,5 g do composto puro, com rendimento de 2,65%.

[0011] Após a obtenção da piperina pura 1, realizamos a reação de hidrogenação catalítica para a formação da tetrahidropiperina 2 (Figura 1). Em um balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL, foram adicionados 200 mg (4,58 mmol) da piperina em 20 mL de acetato de etila, e ainda sobre esta solução adicionamos 0,08 g de Pd/C10% como catalisador. A suspensão foi mantida agitada à temperatura ambiente, por alguns minutos e posteriormente vedamos o balão com um septo. Foi removido o ar presente no balão através de uma agulha, ao qual continha hidrogênio por intermédio de um sistema fixado ao septo. O sistema reacional permaneceu por 6 horas sob atmosfera de hidrogênio com agitação magnética. Após o término da reação, ao qual foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), filtrou-se através de papel de filtro, para remoção do catalisador. Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o óleo amarelado obtido foi purificado por coluna de sílica gel, utilizando um sistema eluente hexano / acetato de etila (70/30), resultando em um rendimento de 80%.

[0012] O composto sintetizado 2, foi submetido a análises espectrométricas para confirmação de sua estrutura química, utilizando RMN ^1H e ^{13}C e IV.

[0013] A emulsão foi preparada por meio de homogeneização do composto como insumo farmacêutico ativo, em uma concentração de 0,7-0,02 mM, 0,4 mL de tween 80 e água q.s.p para o volume de 1 mL.

[0014] Para avaliação da atividade larvicida da emulsão, a emulsão à base da tetrahidropiperina, foram utilizadas larvas de *Ae. aegypti* entre o terceiro e quarto instar da linhagem *Rockefeller*. Para a realização dos ensaios biológicos, foi utilizada a metodologia adaptada de World Health Organization (2005).

[0015] Os ensaios larvicidas foram realizados utilizando 20 larvas por repetição, completando 60 larvas por tratamento e totalizando 360 para cada bioensaio. As larvas foram coletadas com o auxílio de pipeta Pasteur, coadas e postas em recipientes semi acrílicos (6,5 cm de altura x 5,0 cm de largura) contendo em cada recipiente 20 mL de água destilada. As larvas foram expostas aos dois compostos, piperina 1 e seu derivado 2, separadamente, preparados em diferentes concentrações (Inserir o alcance das concentrações). Os compostos foram solubilizados, separadamente, com uma solução de Polysorbate (Tween 80) e água destilada para o volume de 1 mL. As observações da mortalidade larval foram realizadas em sete intervalos entre 1 e 24 horas, após o início dos experimentos.

[0016] Paralelamente, foi realizada a avaliação da atividade toxicológica aguda (Dose Letal 50) da emulsão à base da tetrahidropiperina, segundo a metodologia preconizada pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development-OECD), adotando-se o guia OECD 423/2001, para determinar o grau de toxicidade desse produto frente aos mamíferos. Para tanto foram utilizadas fêmeas adultas de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*). O teste de toxicidade aguda foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE, registrado com o nº 0078/2021.

[0017] A administração da emulsão no grupo controle e no grupo tratado à base da tetrahidropiperina, foi feita por gavagem e a observação individual foi realizada nas duas primeiras horas após receberem a dose inicial do tratamento, periodicamente durante 14 dias, e ao final do 14º dia de observação, os animais foram anestesiados e eutanasiados.

[0018] Salienta-se que necessitou do jejum dos animais por duas horas antes do início do procedimento experimental e por mais duas horas após a administração. A água foi ad libitum até o término do experimento. 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).

[0019] Inicialmente, três animais foram submetidos à administração da dose máxima preconizada de 2000 mg.kg⁻¹ da emulsão à base da tetrahidropiperina. Nesta dose, houve morte logo após a administração. Desse modo, seguimos a metodologia da OECD, administrando a dose de 300 mg.kg⁻¹.

[0020] Na dose de 300 mg.kg⁻¹ da emulsão à base da tetrahidropiperina não houve óbito, sendo então a dose de segurança. Por este motivo, a referente invenção refere-se a tetrahidropiperina que se apresentou menos tóxica, quando comparado a piperina. Pelo qual a literatura relata que a piperina não apresenta efeitos tóxicos na dose de 100 mg.kg⁻¹ (UI HAQ et al., 2020).

[0021] A emulsão à base da tetrahidropiperina, na concentração de 0,7 mM induziu a mortalidade de 100% das larvas de *Ae. aegypti* testadas após 8 horas de exposição (Figura 2). Diferentemente da piperina 1, que induziu a mortalidade em 100% das larvas após 24 horas de exposição nas concentrações de 0,7-0,35 mM (Figura 3).

[0022] Os sinais clínicos observados na dose de segurança da emulsão à base da tetrahidropiperina 2 relacionados às diversas reações comportamentais com o Sistema Nervoso Central (SNC), relacionados aos efeitos estimulantes foram agitação, saltos, postura de ataque, aumento da frequência cardíaca, movimento de vibrissas, expansão do pavilhão auricular, refluxo e para os efeitos depressores fotofobia, diminuição da resposta ao toque e sedação.

[0023] Os sinais clínicos observados relacionados às reações comportamentais com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) foram defecação normal, diurese e piloereção. Quanto aos outros sinais, foi observada autolimpeza e escalar. Diante das observações, mesmo havendo esses sinais clínicos, não houve mortalidade dos animais, indicando que a emulsão à base da tetrahidropiperina 2, não apresenta toxicidade. Os animais do

grupo controle manifestaram sinais clínicos semelhantes ao do grupo tratado e não houve mortalidade.

[0024] Diante do exposto, a emulsão à base da tetrahidropiperina 2, na faixa da concentração testada, apresenta efeito larvicida promissor, com potencial e ação para o controle deste vetor e não apresenta toxicidade significativa a mamíferos.

Exemplos de concretizações da invenção

[0025] Apesar da piperina ser um agente nutracêutico, seu uso requer moderação, pois estudos de toxicidade subaguda revelaram que a piperina, não apresenta efeitos tóxicos na dose de 100 mg.kg⁻¹, diferentemente do seu derivado, a tetrahidropiperina que é o insumo farmacêutico ativo desta emulsão. A tetrahidropiperina, quando administrada na dose de 300 mg.kg⁻¹ não apresentou óbitos e ausência de sinais relevantes, para ser caracterizada uma substância tóxica nesta dose. Por isso, foi caracterizada como a dose de segurança.

[0026] Quanto aos ensaios larvicidas, podemos notar que a tetrahidropiperina em 8h na concentração de 0,7mM foi capaz de induzir a morte de 100% das larvas. Comparativamente, nesta mesma concentração a piperina só induziu a morte com 24h de exposição, ou seja, o seu derivado é potencialmente mais ativo. Observando o tempo de 24h de exposição das larvas a emulsão a base da tetrahidropiperina, nota-se que tanto a piperina quanto o seu derivado induzem a morte de 100% das larvas nas concentrações de 0,35 e 0,70 mM. No entanto, a tetrahidropiperina consegue ser mais ativa que a piperina na dose de 0,17 mM, induzindo a morte de 95% das larvas do *Aedes aegypti*. Diante do exposto, podemos predizer que o composto da presente invenção é mais eficaz contra as larvas do *Aedes aegypti*, assim como mais seguro para uso envolvendo a população.

REIVINDICAÇÕES

1. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, caracterizado por conter tetrahidropiperina, utilizando-a como ingrediente ativo, para uso como inseticida.
2. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, caracterizado por ser formulado de acordo com a reivindicação 1 como emulsão a partir da incorporação da tetrahidropiperina associadas a um ou mais ingredientes aceitáveis para o preparo de inseticidas, mais especificamente, tween 80, e água destilada.
3. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, caracterizado por ser formulado de acordo com a reivindicação 1, para o controle e combate ao mosquito *Ae. aegypti*.
4. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, de acordo a reivindicação 2, caracterizado pode ser utilizado na faixa de concentração de 0,7 e 0,02 mM.
5. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por obter o composto semissintético 2, preferencialmente utilizando o Pd/C10%, porém não limitante.
6. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de extração utilizando a pimenta do reino triturada, gel de sílica e qualquer sistema eluente no aparelho Góes durante oito horas.
7. EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por apresentar a fórmula de (C 17 H 23 N O 3); 5- (1,3-benzodioxol-5-il) -1-piperidin-1-ilpentan-1-ona; 5- (1,3-benzodioxol-5-il) -1-piperidin-1-ilpentan-1-ona; 5- (Benzo [d] [1,3] dioxol-5-il) -1-

(piperidin-1-il) pentan-1-ona; piperidina, 1- (5- (1,3-benzodioxol-5-il) -1-oxopentil); piperidina, 1- [5- (1,3-benzodioxol-5-il) -1-oxopentil]; piperidina, 1- (5- (3,4- (metilenodioxi) fenil) valeril); tetrahidropiperina e cosmoperina, para utilização no controle e combate ao mosquito *Ae. aegypti*.

DESENHOS

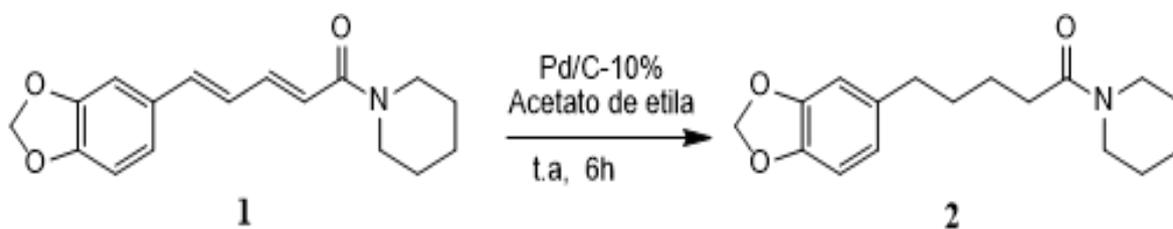


Figura 1

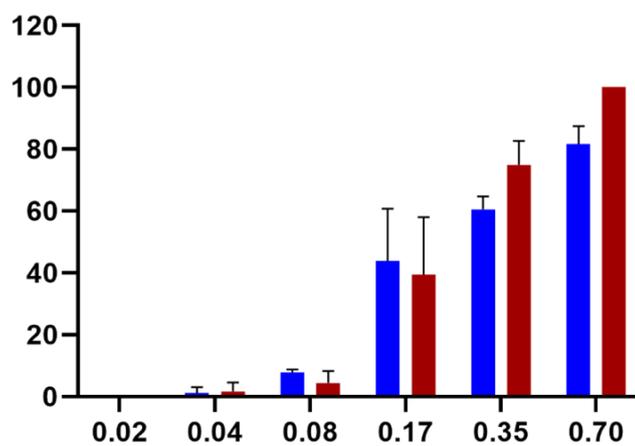


Figura 2

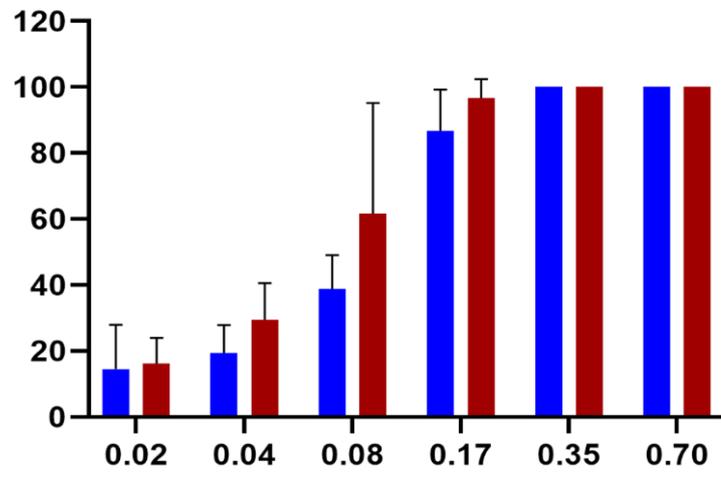


Figura 3

RESUMO**EMULSÃO À BASE DA TETRAHIDROPIPERINA PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti***

A presente patente de invenção descreve o uso da emulsão à base de uma amida de cadeia carbônica saturada, derivada da piperina, para o controle de mosquitos, prioritariamente o *Aedes aegypti*. O composto sintético foi obtido a partir da piperina, por meio de redução catalítica sob atmosfera de hidrogênio por seis horas. O óleo amarelado obtido foi testado e ocasionou 100% de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*, após 8 horas de exposição na concentração avaliada apresentando-se como um potente inseticida. Paralelamente, esse composto após a administração da dose de 300 mg.kg⁻¹ em camundongos não demonstrou efeitos tóxicos relevantes, sendo, portanto, seguro na concentração avaliada em mamíferos.