



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

(21) BR 102018068708-5 A2



(22) Data do Depósito: 14/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/03/2020

(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPLEXO MG-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS E PRODUTO OBTIDO

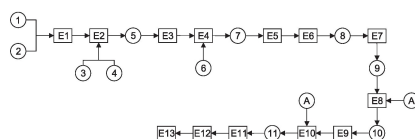
(51) **Int. Cl.:** A01N 59/06; A01N 43/48; C07D 247/00; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 59/06; A01N 43/48; C07D 247/00.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO".

(72) **Inventor(es):** ELDEVAN DOS SANTOS SILVA; HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS; IZONETE CRISTINA GUILOSKI; LEONARDO DE CASTRO E SOUZA; JOÃO BATISTA FERNANDES; MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA; MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL; ODAIR CORREA BUENO; ROSE MARIA CARLOS.

(57) **Resumo:** Refere-se ao processo de obtenção (Fig.1) de um de complexo de baixa toxicidade com potencial pesticida e fungicida para controle de pragas, obtido a partir do processamento do ácido isovanílico (4) e do íon metálico Mg(II), na forma de acetato de magnésio (2), que ao formarem um complexo metálico orgânico (11), possuem a capacidade de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbionte, ao ser adicionado a iscas atrativas. O complexo metálico orgânico (11), com potencial inseticida proposto apresenta excelente estabilidade em solução, estabilidade térmica, hidrossolubilidade para diferentes valores de pH (3-10) e alto rendimento sintético.



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPLEXO Mg-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS E PRODUTO OBTIDO

BREVE DESCRIÇÃO

[001] Trata a presente solicitação de patentes de invenção de um inédito “**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPLEXO Mg-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS E PRODUTO OBTIDO**” que se refere ao processo de obtenção de um de complexo de baixa toxicidade com potencial pesticida e fungicida para controle de pragas, obtido a partir do processamento de ácido isovanílico e do íon metálico Mg(II), que ao formarem um complexo metálico orgânico, possuem capacidade de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote quando adicionado a iscas atrativas.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à seção de necessidades humanas, ao setor de agricultura; mais especificamente ao campo de atividade de compostos químicos ou preparações biocidas, por descrever um processo de obtenção um complexo metálico orgânico com potencial inseticida, o complexo Mg-isofenólico, com ausência de toxicidade e capaz de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e de seu fungo simbiote quando adicionado a iscas atrativas.

CONVENCIMENTO

[003] Pesticidas são estratégias utilizadas para garantir o abastecimento de alimentos para a população mundial. Contudo, o seu uso impõe restrições devido à alta toxicidade para o meio ambiente. Baseado nisso, foi desenvolvido o complexo Mg-isofenólico, onde buscou-se explorar o seu potencial inseticida e fungicida bem como o impacto ambiental gerado no ambiente aquático e terrestre. A presente invenção é enquadrada no campo sintético, onde utiliza-se um produto natural (ácido isovanílico) e o íon metálico Mg(II), formando um complexo metálico orgânico com ausência de toxicidade e capaz de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote quando adicionado a iscas atrativas.

[004] A síntese de compostos metálicos coordenados a produtos naturais (flavonóides e isofenólico) é algo recorrente para o controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e insetos pragas, sendo de grande interesse em pesquisas acadêmicas e tecnológicas (nº da patente: 7,208,519. Pesticidal compounds and compositions. Inventor: Ninkov; Dusan (Orange City, IA), Abril 24, 2007) e nº da patente: BR1020120313804A2. Processo de preparação de complexos metálicos de hesperidina e hesperitina, complexos metálicos e composições inseticidas para o controle de insetos pragas urbanas, agricultura e da silvicultura. Inventor: Rose Maria Carlos et al., 05 de dezembro de 2014). Sendo as matérias descritas nos pedidos de patentes apontados, utilizadas no controle das formigas cortadeiras (saúvas, quenquêns e *Atta sexdens rubropilosa*) as quais constituem as principais pragas das áreas de reflorestamento brasileiro e representam mais de 75% dos custos e do tempo gasto no controle de pragas florestais. Esses resultados têm levado a novas estratégias sintéticas utilizando complexos de Mg(II) com baixa toxicidade para o meio aquático e terrestre no controle e/ou combate das formigas cortadeiras a fim de aumentar a produção agrícola e reduzir os impactos ambientais.

[005] Pesquisas realizadas por Gonçalves (1961; 1967) mostraram a existência de vinte espécies de formigas no Brasil e nove subespécies do gênero *Acromyrmex* e, segundo Zanetti et al. (2005), sendo dez espécies e três sub-espécies de *Atta*. Sendo que as cortadeiras do gênero *Atta sexdens rubropilosa* saúva-limão, distribuem-se nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Paraná.

[006] Os danos causados por formigas cortadeiras em pequenas plantações, pastagens, culturas vegetais e de frutas provocam grandes prejuízos na produção agrícola brasileira. Estudos realizados por Naccarata (1983) já apontavam uma redução de 14% no volume da madeira com a presença de cinco saúveiros por hectare em plantios de *Pinus*. Mendes Filho (1979) e Freitas (1988) apontaram que em espécies como a *Eucalyptus grandis*, que sofria uma desfolha de 100% das árvores, poderia reduzir a produção de madeira em até 80% ou levar a morte das árvores.

[007] Estudos de 1999 realizados por Forti e Pretto mostraram que uma colônia de formiga cortadeira adulta pode consumir até 1,0 tonelada de matéria vegetal fresca por ano. Diante disso, é necessária uma média de 86 árvores de eucalipto e 161 árvores de Pinus por ano para o abastecimento do formigueiro. Os danos com formigas cortadeiras em áreas de reflorestamento representam até 75% dos custos e tempo dedicado ao manejo destas pragas em florestas, e cerca de 30% dos gastos com a cultura até o final do ciclo (Forti; Pretto, 1999). Sendo esses custos na ordem de 21 bilhões de reais anuais (Derrogação para uso de Deltametrina, Fenitrothion, Fipronil e Sulfuramida em florestas certificadas FSC® no Brasil. Documentos Técnicos IPEF, v.4, n.4, p.1-38, fev. 2016).

[008] O desenvolvimento de novos agrotóxicos (inseticidas e fungicidas) que visam o controle de formigas cortadeiras tem sido um desafio tecnológico para a ciência moderna, visto que a produção de alimentos está diretamente ligada ao controle dessas pragas. Além disso, os novos inseticidas precisarão de excelente eficiência no controle e combate das formigas, baixo custo financeiro e operacional, baixa toxicidade para o meio aquático e animais, preparo simples, alto rendimento sintético, utilizar reagentes de baixo custo e abundantes, ser hidrossolúvel e estável tanto no meio básico quanto no meio ácido. Além de ser estável às variações climáticas, deve possuir mecanismo de ação tóxica lenta frente às formigas cortadeiras, ou seja, não deve apresentar toxicidade letal nos 5 primeiros dias de ingestão para que todos os indivíduos da colônia sejam contaminados. (Francisco Roberto de Azevedo, Francisco das Chagas Oliveira Freire. Tecnologia de Aplicação de Defensivos Agrícolas. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2006, pg14. e Jerson V. C. Guedes et al.. Sistemas de aplicação e inseticidas no controle de *Anticarsia gemmatilis* na soja. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental v.16, n.8, p.910–914, 2012).

[009] Com o propósito de suprir essas dificuldades tecnológicas, foi desenvolvido um complexo Mg-isofenólico com potencial inseticida, com objetivo de desenvolver uma molécula com a presença de um produto natural e um composto polipiridinico unidos por ligações covalentes a um mesmo íon metálico central (M), que apresenta a característica de um fertilizante natural de baixa toxicidade e com excelente eficiência

coordenado ao íon magnésio(II). O inseticida proposto apresenta excelente estabilidade em solução, estabilidade térmica, hidrossolubilidade para diferentes valores de pH (3-10) e alto rendimento sintético.

[010] Especificamente, o inseticida proposto refere-se de um complexo de metal-orgânico, *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃OO⁻), onde M= Mg(II), phen = 1,10-fenantrolina e iso= íon isovanilato. Sendo o complexo capaz de atuar como inseticida e fungicida para as formigas cortadeiras *Atta Sexden* e seu fungo simbionte quando adicionado às iscas.

[011] Os resultados dos ensaios in vivo realizados com a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* utilizando o complexo Mg-isofenólico, quando comparados aos resultados do inseticida comercial sulfluramida, mostrou-se mais eficiente em relação ao tempo de ação tóxica, apresentando um índice de sobrevivência de 10% após 6 dias de dieta utilizando uma concentração de 1.0 mgg⁻¹ contra 70% de extermínio do formigueiro obtido para a sulfluramida (inseticida comercial) após 6 dias de ingestão da dieta utilizando uma concentração de 0,20 mgg⁻¹. Uma das grandes vantagens do complexo Mg-isofenólico em relação ao inseticida comercial sulfluramida é a não rejeição das iscas pelo o formigueiro, o que evita o deslocamento das colônias para outras regiões. Além disso, o complexo Mg-isofenólico não propicia desequilíbrio ecológico em virtude da ausência de toxicidade.

[012] As formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* possuem uma associação mutualística entre a formiga e o fungo simbionte (*L. gongylophorus*), tal associação gera uma total dependência entre ambos, onde as formigas usam vegetais frescos para o desenvolvimento do fungo e para sua própria alimentação (DELLA LUCIA e FOWLER, 1993; FERNANDES et al., 2002). Onde o fungo se desenvolve sobre o material vegetal, produzindo hifas e gongilídeos que são considerados a principal fonte de nutrientes para as formigas, especialmente para as larvas. O fungo constitui a única fonte de alimento para essas larvas e fornecem cerca de 9% da energia necessária para as operárias das formigas (QUINLAN e CHERRETT, 1979). Um estudo utilizando o complexo Mg-isofenólico durante 30 dias como fungicida, apresentou inibição de

100% do fungo simbiote, sendo este a principal fonte de alimento para a colônia de formigas cortadeiras (BUENO et al., 2008).

[013] Além de conduzir a formiga cortadeira a uma morte lenta e inibir seu fungo simbiote, o complexo Mg-isofenólico não apresenta riscos para o meio aquático. Em estudos com o peixe zebrafish, empregando uma concentração de até $2,0 \text{ mgL}^{-1}$, não foi observada nenhuma morte ou alterações visuais após 96 horas de exposição. Esse resultado mostra claramente que o complexo Mg-isofenólico candidato a inseticida e/ou fungicida não apresenta qualquer risco para o sistema aquático. Em comparação com os inseticidas comerciais piretróide e organofosforado que mesmo em baixíssimas concentrações apresentam elevada toxicidade para o sistema aquático, conforme pode-se verificar com os respectivos valores das $DL_{50} = 0,0025\text{-}0,0058$ e $0,49\text{-}1,28 \text{ mgL}^{-1}$ após 96 horas de tratamento com Zebrafish. (Zhang, Z. Y, et al. Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Manag. Sci.* 2010, 66(1), 84–89).

[014] Outro resultado que comprova a ausência de toxicidade do complexo Mg-isofenólico vem através dos resultados dos experimentos realizados com ratos da família Wistar. Onde o complexo Mg-isofenólico foi aplicado via intraperitoneal com uso de uma dosagem de $3,0 \text{ mgKg}^{-1}$ por dia, durante 21 dias (estudo crônico) alcançando uma dosagem de $62,0 \text{ mgKg}^{-1}$. Após esse período não foram observados quaisquer sinais adversos ou toxicidade. Porém, estudo com o inseticida fipronil via administração oral apresentou uma DL_{50} igual a $50,0 \text{ mgkg}^{-1}$ nas mesmas condições experimentais (Hung et al. From Omics to Drug Metabolism and High Content Screen of Natural Product in Zebrafish: A New Model for Discovery of Neuroactive Compound. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 2012, 1-20).

[015] Os estudos comportamentais mostraram um aumento da capacidade locomotora espontânea dos ratos e uma redução no tempo de escalada no teste de natação forçada. No teste de labirinto em cruz elevado, ocorreu um aumento significativo na percentagem do tempo de permanência do rato no compartimento do braço aberto, quando comparado com os animais controle, indicando que o complexo Mg-isofenólico apresenta propriedades características de fármacos ansiolíticos. Os resultados dos

biomarcadores bioquímicos superóxido dismutase (SOD) no estriado, glutathione redutase (GSH) no córtex frontal e acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo demonstraram um aumento em suas atividades após o tratamento com o complexo Mg-isovanilato, indicando que o mesmo cruzou a barreira hematoencefálica e não apresentou qualquer toxicidade para os ratos.

[016] As análises bioquímicas dos rins e do fígado mostraram um aumento da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), evidenciando mais vez que o complexo Mg-isofenólico não induz quaisquer manifestações tóxicas nesses órgãos. A redução da atividade da enzima glutathione redutase (GSH) nos rins, após o tratamento pode estar relacionada com aumento da atividade antioxidante de CAT e da SOD devido a presença do complexo Mg-isofenólico.

[017] O complexo Mg-isovanilato combina em uma mesma formulação a atividade inseticida, fungicida e antioxidante, além da presença do íon $Mg(II)$ que é um importante componente da clorofila, sendo esse até 10% da estrutura total de uma folha. (Crescimento e sintomas de deficiências de macronutrientes em plantas de carauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). Rosa de Nazaré Paes da Silva, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2006). Além disso, o íon $Mg(II)$ atua como cofator ou ativador de mais de 300 enzimas no organismo, participando dos processos de fotossíntese, respiração, síntese de compostos orgânicos, absorção iônica e trabalho mecânico, como aprofundamento e expansão da raiz. A absorção de P (na forma de $H_2PO_4^-$) é máxima na presença de Mg^{2+} , com o papel de “carregador de fósforo”, provavelmente, pela sua participação na ativação de ATPases. O magnésio também participa do metabolismo energético, da regulação dos transportadores de íons e da contração muscular e sua deficiência pode levar a um aumento da peroxidação lipídica, além da redução da atividade antioxidante. (Barbosa, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, p. 629-643. 2010. Cordova, Alfredo; NAVAS, Francisco J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. Rev. Bras. Med. Esporte, v. 6, n. 5, p. 204-208, 2000 e C. M. B. Faria; D. J Silva; A. M. S. Mendes.

Cultivo da Cebola no Nordeste. Embrapa. Sistema de produção 3. INSS 1807-0027. Versão eletrônica, nov./2007).

[018] Estudos recentes mostram que o magnésio desempenha um papel relevante no funcionamento do sistema neurotransmissor monoaminérgico. Alguns estudos têm revelado uma redução nos níveis de monoaminas quando existe uma deficiência do íon magnésio (Mg^{2+}). Há também, um decréscimo da afinidade dos receptores-alfa e beta-adrenérgicos quando ocorre a redução dos níveis de Mg^{2+} . Neste caso, o íon magnésio pode estar associado à ligação dos neurotransmissores aos receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos, alfa e beta-adrenérgicos e (Murck, 2002; Szewczyk et al. 2008; Cardoso et al., 2009).

[019] Com base nos dados e informações discutidas anteriormente, a presente invenção combina um produto natural com excelente estabilidade proporcionada pelo íon metálico Mg^{2+} coordenado. O complexo Mg-isofenólico possui a capacidade de atuar como agente tóxico para o controle e/ou combate das formigas cortadeiras *Atta sexden* quando adicionado às iscas. Além disso, não apresenta qualquer toxicidade para o meio aquático ou animal em altas concentrações. Nesse contexto, o uso do complexo Mg-isofenólico envolve um vasto campo de estudos e tem reunido muitos esforços na área de química, bioquímica, biologia e farmácia, com enfoque no tempo de ação inseticida onde buscamos minimizar desequilíbrio ambiental.

[020] De maneira geral a síntese é bastante viável, possui um mecanismo de ação lenta (100% de matança em 5 dias com 1 mgg^{-1}) para formigas cortadeiras. Os custos de produção em escala de laboratório: (1,68 US\$ por 1g do complexo Mg-isofenólico para produção de 0,5 kg de isca, contra 1,5 US\$ da sulfluramida por 3 g para produção de 1 kg de isca). Sendo que esses custos podem reduzir significativamente quando o complexo Mg-isofenólico for produzido em escala semi-industrial ou industrial.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[021] No atual estado da técnica, estão presentes algumas anterioridades que descrevem formulações a serem empregadas no combate de pragas agrícolas. No entanto, nenhuma delas descreve um complexo Mg-isofenólico, um complexo metálico orgânico com ausência de toxicidade e capacidade de atuar diretamente no controle

e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote quando adicionado a iscas, conforme o descrito no presente pedido de patente.

[022] A anterioridade BR 10 2013 024541 0, intitulada "Formulação de inseticida, processo de combate de formiga saúva e cupim, processo de aplicação e processo de atuação" refere-se a uma formulação de inseticida, processo de combate de formiga saúva e cupim, processo de aplicação e processo de atuação que associa inseticida com uma formulação com componentes obtidos a partir de produtos naturais e abundantes no campo, método de aplicação inédito e processo de atuação altamente eficaz, simples e de baixo custo.

[023] A anterioridade BR 10 2012 031380 4, intitulada "Processo de preparação de complexos metálicos de hesperidina e hesperitina, complexos metálicos e composições inseticidas para o controle de insetos pragas urbanos, da agricultura e da silvicultura" descreve um processo de preparação de complexos metálicos de hesperidina e hesperitina, que compreende prover os complexos $[Mn(L'-L')_m]$, onde "n" e "m" são 1 ou 2, M compreende um metal selecionado dentre Ru(II), Mg(II), Co(II/III), Cu(I/II), Mn(II/III), Fe(II/III), Zn(II) e Ca(II) e (L'-L') é um ligante polipiridínico, prover uma flavanona (L) selecionada dentre hesperidina e hesperitina desprotonada; combinar o complexo $[Mn(L'L')_m]$ e a flavanona desprotonada sob condições reacionais para obter os complexos a metais $(Mn(L)k(L'-L')_m)^{2+}$, onde "k" é 1 ou 2, precipitar os complexos por adição de compostos selecionados dentre NH_4PF_6 , $Na(CH_3COO)$ e $NaCl$, separar e lavar, obtendo os complexos metálicos $[Mn(L)k(L'L')_m] (PF_6)^-$, $[Mn(L)k(L'L')_m] [AcO]$ e $[Mn(L)k(L'L')_m] (Cl)_x$. São também descritos os complexos obtidos e as composições inseticidas à base dos complexos metálicos da invenção.

[024] A anterioridade MU8201709-3, intitulada "Isca cítrica para formigas" descreve uma isca cítrica para formigas a base de cascas de frutas cítricas, usado no setor agrícola ou mesmo em pequenos quintais e residências, sendo este destinado ao combate de formigas e com os respectivos formigueiros, protegendo a plantação ou a residência, deste animal que pode causar danos físicos e financeiros aos proprietários.

[025] O modelo de utilidade consiste-se de cascas de frutas cítricas (01), que é o alimento mais atrativo para a formiga. Devido ao seu sabor, essas passam por uma

compactação (02) deixando-as em formato de pequenos cilindros (03) de mais ou menos 2 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Esses pequenos cilindros passam em seguida por uma trituração (04), deixando-os em formato de pequenas lascas (05), sendo dessa maneira para proporcionar uma melhor adequação para a formiga carregar o mesmo. Essas lascas (05) passam por um misturador (06) onde, numa proporção de 400 kg, recebem a mistura de 30 litros de água, mais 12 kg de açúcar, mais 8 kg de sal e finalmente 200 ml de um formicida a base de fipronil.

[026] A anterioridade PI 0704711-8, intitulada "Isca atrativa em pasta para controle de formigas doceiras em meio urbano" descreve uma formulação inseticida para o extermínio de formigas, mais especificamente do gênero *Solenopsis*, conhecidas como formiga doceira, formiga brasa ou formiga lava-pés. Pode ser utilizado em diversas instalações comuns nos meios urbanos como: residências, hotéis, restaurantes, hospitais, panificadoras, instalações industriais e comerciais, depósitos, etc.

[027] A anterioridade PI9300836-8, intitulada "Inseticida de ação retardada e processo para produzir um inseticida de ação retardada" descreve um inseticida eficaz no uso contra as formigas-de-fogo (ifa) e outras pragas de insetos, consistindo em um surfactante insolúvel em óleo, preferivelmente um surfactante fluoroquímico aniônico, como ingrediente ativo. O inseticida é constituído ainda por um veículo, o qual é uma fonte de alimento para a ifa ou outro inseto. Esse veículo é impregnado com o fluorosurfactante aniônico para prover uma isca tóxica. Em uma configuração preferida, o inseticida contém 0,3 a 0,5% por peso de fluorosurfactante aniônico; e um elemento selecionado do grupo compreendendo farinha seca de milho amarelo, milho partido, trigo moído e trigo partido, numa concentração de 94,7 a 94,5% por peso, como veículo. O óleo de soja, numa concentração de 5,0% por peso, é preferivelmente aplicado como um atrativo para a formiga. O processo para a formulação do inseticida consiste em dissolver o fluorosurfactante aniônico em um solvente, tal como acetona ou metanol. As formulações são constituídas pelo ingrediente ativo (fluorosurfactante aniônico), dissolvido no solvente e então absorvido para o veículo, sendo o óleo de soja preferivelmente acrescentado como atrativo para formiga.

[028] A anterioridade WO2015027308, intitulada "Complexos metálicos de naringina e naringenina e composições inseticidas para o controle de insetos pragas urbanos, da agricultura e da silvicultura" descreve complexos metálicos de naringina e naringenina, de fórmula $(M)n(L'-L')_m$, $(M)n(L)_m$, e $\text{cis}-[\text{Mn}(L)m(L'-L')_k]^{2+}$, $[\text{Mn}(L)m(L'-L')_k]$ e $[\text{Mn}(L)m(L'-L')_k]$, ligados ou não a $(\text{PF}_6)\text{X}$, $(\text{OAc})^-$ ou Cl^- como contra-íons, onde: M é um íon metálico selecionado dentre Ru(II) , Mg(II) , Co(II/III) , Cu(II/III) , Mn(II/III) , Fe(II/III) , Zn(II) e Ca(II) sob forma de haleto ou acetato; $L'-L'$ é um ligante polipiridínico selecionado dentre 2,2'-bipiridina, 1,10'-fenantrolina e derivados das mesmas; (L) é uma flavanona selecionada dentre naringina e naringenina, e "m", "n", "k" e "x" são 1 ou 2. Os complexos encontram aplicação como composições inseticidas para o controle de insetos pragas urbanos, da agricultura e da silvicultura.

[029] Ainda estão presentes no atual estado da técnica diversas anterioridades, como: US16383423 intitulada "Pesticidal composition to noxious organisms"; US7655677 intitulada "Composition and method for controlling house insect pest"; US5850707 intitulada "Insect bait"; US5575996 intitulada "Insecticide bait composition"; US5198467 intitulada "Insecticide for imported fire ants and other insect pests"; US5165929 intitulada "Fungal ant killer"; US4756118 intitulada "Method and apparatus for the destruction of imported fire ants of the genus *Solenopsis*"; CN101461364 intitulada "Poison bait for killing fire ant"; CN101331880 intitulada "*Paecilomyces javanicus* and neem compounded pesticides"; CN1947513 intitulada "Synergistic agent for killing *Formica rufa*"; CN1957707 intitulada "Condensed, multi effect aqua type insecticide and preparation method"; CN1792148 intitulada "Bait formulation for killing red ants"; DE102005022147 intitulada "Active agent combination, useful to e.g. Combat animal parasites and phytopathogenic fungus, comprises a carboxamide compound and/or at least an active agent e.g. Acetylcholine-receptor-agonist/antagonist"; CN1522571 intitulada "Ant trapping medicament"; CN1557942 intitulada "A insecticide and its application"; JP2003183102 intitulada "Insecticidal liquid agent against ant"; CN1348694 intitulada "Termite preventing pesticide"; RU2209549 intitulada "Method for control of garden ants"; JP6135809 intitulada "Stomach poisoning agent for ant comprising chironomid"; JP4342506 intitulada "Synergistic insecticidal composition";

CN205244652 intitulada "Protection against insects ant oranges and tangerines irrigation pipe way"; CN205390095 intitulada "Novel trap and kill medicine box that ant cockroach was used device"; CN1064786 intitulada "Ant killing agent"; US4891222 intitulada "Pine oil fire ant insecticide"; JP1106803 intitulada "Insecticidal composition"; JP59018822 intitulada "Ant-preventive asphalt sheet"; JP57042603 intitulada "Insecticide against ant"; JP55115876 intitulada "Isocyanuric acid ester and insecticide comprizing it"; KR20090084107 intitulada "Ant insecticide used by microencapsulation method ant trail pheromone"; US2016262388 intitulada "Bioactive peptides having insecticide activity"; TW200932108 intitulada "Composition for insecticide, and insecticide"; US2015237853 intitulada "Development of pheromone assisted techniques to improve efficacy of insecticide sprays targeting urban pest ant species"; BE849159-A intitulada "Wood preservative contg. metal corrosion inhibitor - with fungicide, insecticide and oily solvent, and does not discolour in contact with metals"; JP2009137921-A intitulada "Novel phenolic compound used as intermediate in pharmaceutical, herbicide, insecticide and microbicide, antioxidant, heat-resistant stabilizer and additive for plastic and rubber"; BE788689-A intitulada "Insecticide juvenile hormone compsn - stabilised with phenolic antioxidants and acrylonitrile or benzotriazole uv absorbentnd absorbent sheet centrally supported from nozzle"; BR 10 2012 025669 0 intitulada "Processo de combate de formiga saúva, processo de aplicação e processo de atuação e formulação de inseticida" e a anterioridade PI 0502877-9, intitulada "Processo para manipulação de formicida e inseticida".

[030] Apesar do grande número de referências presentes no atual estado da técnica, os objetos descritos ainda têm sua utilização restrita devido à alta toxicidade para o meio ambiente. A fim de resolver esse problema presente no campo técnico foi desenvolvido um inseticida baseado no complexo Mg-isofenólico, objeto do presente pedido de patente, um complexo metálico orgânico com ausência de toxicidade e capaz de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e de seu fungo simbiote quando adicionado a iscas, o qual resolve o problema de restrição de uso de pesticidas devido à sua alta toxicidade.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[031] A presente invenção tem como objetivo proporcionar um complexo metálico orgânico com potencial inseticida, com ausência de toxicidade e capaz de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e de seu fungo simbiote quando adicionado a iscas.

DA INVENÇÃO

[032] A presente invenção descreve um processo de obtenção um complexo Mg-isofenólico com potencial inseticida. Assim, é descrito o processo de obtenção de uma molécula com a presença de um produto natural e um composto polipiridinico unidos por ligações covalentes a um mesmo íon metálico central (M), que apresenta a característica de um inseticida natural de baixa toxicidade e com excelente eficiência coordenado ao íon magnésio(II). O inseticida descrito apresenta excelente estabilidade em solução, estabilidade térmica, hidrossolubilidade para diferentes valores de pH (3-10) e alto rendimento sintético. Especificamente, o inseticida trata-se de um complexo de metal-orgânico, *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO⁻), onde M= Mg(II), phen = 1,10-fenantrolina e iso= íon isovanilato. Sendo o complexo capaz de atuar como inseticida e fungicida para as formigas cortadeiras *Atta Sexden* e seu fungo simbiote quando adicionado às iscas.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[033] Em suma, a presente invenção apresenta como principais vantagens:

- ✓ Dispor um complexo metálico orgânico com potencial inseticida, mais eficiente em relação ao tempo de ação tóxica, apresentando um índice de sobrevivência de 10% após 6 dias de dieta utilizando uma concentração de 1.0 mgg⁻¹ contra 70% de extermínio do formigueiro obtido para a sulfluramida (inseticida comercial) após 6 dias de ingestão da dieta utilizando uma concentração de 0,20 mgg⁻¹.
- ✓ Dispor um complexo metálico orgânico com potencial inseticida, que em relação ao inseticida comercial sulfluramida, quando adicionado às iscas não rejeitado pelo o formigueiro, o que evita o deslocamento das colônias para outras regiões.

- ✓ Dispor um complexo metálico orgânico com potencial inseticida, que não propicia desequilíbrio ecológico em virtude da ausência de toxicidade.
- ✓ Dispor um complexo metálico orgânico com potencial inseticida, com excelente estabilidade em solução, estabilidade térmica e hidrossolubilidade para diferentes valores de pH (3-10), além de alto rendimento sintético.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[034] A invenção será descrita em uma realização preferencial, assim, para melhor entendimento serão feitas referências ao fluxograma e às figuras:

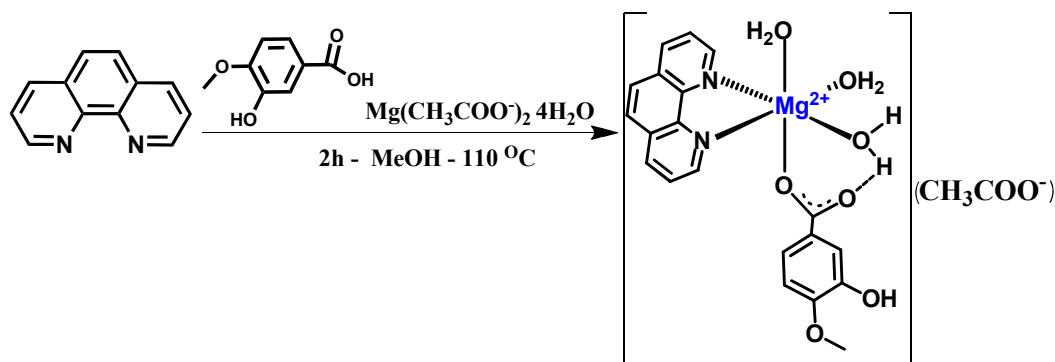
- ✓ Figura 1: Fluxograma do processo de obtenção do complexo Mg-isovanilato.
- ✓ Figura 2: Campo Aberto.
- ✓ Figura 3: Natação forçada.
- ✓ Figura 4: Labirinto em cruz elevada.
- ✓ Figura 5: Estrutura otimizada (A) e (B) Mg-isofenólico em fase gasosa (linha verde) utilizando o conjunto de bases B3LYP/LANL2DZ, experimental em Csl (linha preta) e Ácido Isovanílico livre (vermelho).
- ✓ Figura 6: Estudo da temperatura do complexo Mg-isofenólico em MeOD-d₄ à 25 ± 01 °C.
- ✓ Figura 7: RMN de H1 do complexo Mg-isofenólico (A), 1,10-fenantrolina livre (B) e ácido isovanílico livre (C) em MeOD-d₄ à 25 ± 01 °C.
- ✓ Figura 8: RMN de C13 simplificado do ácido isovanílico livre (A) Mg-isofenólico (B) em MeOD-d₄ à 25 ± 01 °C.
- ✓ Figura 9: Estudo de agregação do complexo Mg-isofenólico por RMN de ¹H em MeOD-d₄.
- ✓ Figura 10: Estudo da influência do pH em tampão fosfato (D₂O) utilizando o complexo Mg-isofenólico
- ✓ Figura 11: Estudo de estabilidade por RMN H do complexo Mg-isofenólico exposto à luz (A) e protegido da luz (B) por 120h em pH fosfato 7,4 em (D₂O).
- ✓ Figura 12: Curva potenciométrica para o ácido isovanílico Livre (A) e complexo Mg-isofenólico (B)

- ✓ Figura 13: Crescimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias de incubação com 500 µL de metanol como controle, ácido isovanílico e Mg-isofenólico.
- ✓ Figura 14: Atividades das enzimas acetilcolinesterase no cérebro (AChE) (A), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), (B, C), peroxidação lipídica (LPO) (D) e superóxido dismutase (SOD) (E) no trato digestivo do peixe Zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações do complexo Mg-isovanilato (0,20, 1,00 e 2,00 mgL⁻¹) e controle (CTR). Os dados são média ± SE, n = 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p <0,05). A atividade é expressa em µmol/min/mg de proteína. *= diferença significativa
- ✓ Figura 15: Teste de locomoção e de ansiedade em ratos machos da família de Wistar após 21 dias de exposição a 3,0 mgKg⁻¹/dia do complexo Mg-isovanilato e controle (CTR). Os resultados do controle estão representados nas áreas pontilhadas dos gráficos. Os dados são média ± SEM, n = 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p <0,05). *diferença significativa entre as amostras.
- ✓ Figura 16: Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione redutase (GSH) nas regiões do cérebro (hipocampo, estriado e córtex frontal) no fígado e nos rins dos ratos após 21 dias de exposição a 3,0 mgKg⁻¹ por dia do complexo Mg-isovanilato e controle (CTR). A atividade é expressa em µmol/min/mg de proteína. Os resultados do controle são mostrados nas áreas pontilhadas dos gráficos. Os dados são média ± SE, n= 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p <0,05). *diferença significativa entre as amostras.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[035] O processo de obtenção do complexo Mg-isofenólico (Fig 1) se dá em um balão de 3 bocas, para tanto, são adicionados (E1) a ele 25,00 mL de metanol HPLC (1) e 1,76 g (8,22 mmol) de acetato de magnésio (2) [Mg(CH₃COO)₂·4H₂O]. Em seguida, são

adicionados (E2) 1,36 g (7,54 mmol) de 1,10-fenantrolina (3) e 1,80 g (10,70 mmol) do ácido isovanílico (4), ficando o sistema (5) sob agitação (E3) constante e atmosfera de $N_{2(g)}$ por 10 minutos. Então, foram adicionados (E4) 1,488 mL (10,70 mmol) da base Trietilamina [TEA] (6). A mistura (7) reacional foi mantida sob agitação constante (E5) e temperatura de 110°C por 2h, sendo então, filtrada (E6) duas vezes a aproximadamente 25°C para remover impurezas. A solução remanescente (8) foi rota-evaporada (E7) para redução do volume para cerca de 3,00 mL, sendo adicionados (E8) à solução reduzida (9), 30,00 mL de água gelada deionizada (A). O precipitado formado (10) foi filtrado (E9) e lavado (E10) com 50,0 mL de água gelada deionizada (A). O complexo metálico orgânico (11) foi seco a vácuo (E11) e armazenado (E12) em um dessecador, até ser empregado (E13), por meio de sua adição às iscas atrativas. [036] Rendimento: 64%. A via de síntese é apresentada abaixo:



[037] A seguir é feita a descrição dos equipamentos empregados para a obtenção do complexo Mg-isofenólico.

[038] Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos em um espectrofotômetro Agilent 8453, usando cubetas de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm. Os espectros de infravermelho foram obtidos em sólidos (Csl) na região de 4000 – 300 cm^{-1} com o uso de janelas de CaF_2 em um equipamento Bomem-Michelson 102. As análises elementares para C, H e N foram obtidas no equipamento EA 1110 CHNS-O Carlo Erba Instrumen. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (1H , ^{13}C , Cosy e dept.), foram obtidos em um espectrômetro BRUKER Equipamento Bruker 9,4 Tesla

(400 MHz para frequência do hidrogênio) equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®) e bobina de gradiente de campo em z, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de temperatura variável.

[039] Espectrômetro BRUKER - 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio): equipado com trocador automático de amostra, *cryo*-sonda TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) de 5,0 mm com ATMA® (*Automatic Tunning MAtching*) e gradiente de campo em z, sonda BBI com ATMA®, gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade *cryo-fit*® e unidade LC-SPE acoplado. Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Ressonância paramagnética de elétrons: As medidas de RPE foram realizadas com um espectrômetro Bruker EMX Plus (Rheinstetten, Germany) operando na banda-X, frequência de 9,76 GHz, potência de micro-ondas de 1 mW, e amplitude de modulação de 1 G, cavidade retangular TE 102, capilar de quartzo (d.i.= 0,75 mm) a temperatura de 303 K. Estes experimentos foram realizados no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

[040] Os cálculos de DFT foram realizados usando o software Gaussian 09 (G09) edição D.01, por meio do método DFT com funcionalidade híbrida de três parâmetros de Becke. As correlações corretivas de gradiente de Lee-Yang-Parr, (B3LYP) foi utilizada em combinação com o conjunto de bases LanL2DZ. As geometrias *cis*- e *trans*- do estado fundamental do complexo Mg-isofenólico foram otimizadas em fase gasosa. Para todas as otimizações foram utilizados critérios de convergência ajustados ao SCF. (Hay, P. J. et al. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* 1985, 82 (2), 284–298).

[041] Estudo de Solubilidade pelo método Shake Flask

[042] A solubilidade do complexo Mg-isofenólico foi determinada em tampão fosfato pH-7.4 a 37.0 ± 0.05 °C pelo o método Shake Flask. (Baka, E. et al. "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46:335, 2008). Nesse experimento o complexo Mg-isofenólico foi adicionado a 2,0 mL de solução tampão até alcançar a

saturação. As soluções foram mantidas no Shake flask a 50 rpm por 24h. Na sequência, as amostras em triplicatas foram centrifugadas por 5 minutos em uma centrífuga a 2200 rpm. A concentração final do complexo Mg-isofenólico foi determinada com o uso do espectrofotômetro no UV-Vis.

[043] Para a determinação do pKa utilizando métodos potenciométricos (pHmetro) para o complexo Mg-isofenólico utilizado um pHmetro (eletrodos de vidro e de referência juntos) da marca Qualxtron modelo QX150 PLUX), usando soluções tampão de pH igual a (4,00; 7,00 e 10,00) $\pm$ 0,02 da Vetec Química Ltda para calibração e soluções padronizadas de ácido clorídrico $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L e Hidróxido de sódio $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

[044] Primeiramente preparou-se um branco e em seguida solubilizou-se 6,0 mg do complexo Mg-isofenólico em 15,0 mL de água miliQ em um béquer de 50,0 mL, sob agitação constante. O pH da amostra foi ajustado para 12 com a solução padrão de NaOH_(aq). Durante as medidas o eletrodo permaneceu em repouso, até estabilização da leitura. Foram adicionadas alíquotas de 25 a 2000 μ L da solução padrão de HCl_(aq) à amostra, e após cada adição o pH foi registrado até atingir o pH 2. Em seguida, foi traçado uma curva de titulação (pHxV) para determinação do pKa. O experimento foi realizado em triplicatas. A mesma metodologia foi aplicada para ácido isovanílico livre (Pereira A. V. et al. Determinação da constante de dissociação (K_a) do captopril e da nimesulida – experimentos. Quim. Nova, vol. 34, no. 9, 1656-1660, 2011).

[045] Para a determinação da atividade sequestradora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) utilizando o Nitro Blue Tetrazolium (NBT) e assim avaliar a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) utilizou-se Riboflavina (VitB₂) como fotosensibilizador, nitro blue tetrazolium (NBT) como spin trapping e o aminoácido metionina (Met) como substrato. O meio de incubação consistiu de 10 μ L de Riboflavina em uma concentração de 3,3 μ M, 100,0 μ L de metionina em uma concentração de 10,0 mM, 100,0 μ L de “nitro blue tetrazolium em uma concentração de 46,0 μ M e 2790 μ L de tampão fosfato pH=7,4 em uma concentração de 0,10 M (Lü, J.-M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of cellular and molecular medicine, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010 e Cardoso, D.

R. et al. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. Food & Function, v. 3, n. 5, p. 487, 2012).

[046] O sistema foi incubado por 5 minutos em um reator utilizando lâmpadas de 450 nm. Em seguida, determinou-se o valor da absorção em 560 nm das soluções em estudo contra um branco. Concentrações de 50; 100; 150; 200; 250 e 300 µM do ácido isovanílico livre e do complexo Mg-isofenólico foram investigadas e logo após calculou-se o IC₅₀. Os resultados foram expressos em média ± SD, considerando-se 100% da redução do NBT como controle. Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism, versão 6.0.

[047] Para a determinação da atividade antioxidante do radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) utilizando o EPR, foram preparadas soluções estoque do radical estável DPPH[•] e do complexo Mg-isofenólico nas concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ e $1,0 \times 10^{-3}$ molL⁻¹ respectivamente, em metanol e diluída para concentrações de 25; 50; 75; 100; 150; 200 e 250 µM. As mesmas concentrações foram estudadas para o ácido isovanílico livre. Em um tubo de ensaio foram adicionados de 25,0 até 250,0 µL de solução do ácido isovanílico livre e do complexo I à solução do radical estável DPPH[•] e deixados no escuro por 1h. Os experimentos foram realizados utilizando a espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR). Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism, versão 6.0 a partir do cálculo das integrais (área relativa) de todos os sinais do radical em função das concentrações estudadas (Polovka, M. EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. v. 45, n. 1, p. 1–11, 2006).

[048] Experimentos *in vivo* - Formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*

[049] As formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* foram coletadas aleatoriamente em formigueiros do Laboratório de Formigas Urbanas e Abelhas do Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro. Os formigueiros eram abastecidos diariamente com folhas de *Eucalyptus* sp, sementes de aveia e, ocasionalmente, com folhas de outras plantas, tais como *Hibiscus* sp, *Ligustrum* sp ou pétalas de rosa (Hebling, M. J. A.; et al. "Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of

Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae)". Bull. Entomol. Res., 86: 253, 1996).

[050] O complexo Mg-isofenólico foi incorporado à dieta artificial nas concentrações de 0,2 até 2 mg/g. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro, foi usada uma dieta artificial sólida preparada com 1,25 g de glicose, 0,25 g de peptona bacteriológica, 0,025 g de extrato de levedura e 0,25 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 25 mL de água destilada. Para realização dos bioensaios, foram utilizadas operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* com massa corpórea variando de 15 mg a 20 mg. Foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração testada, divididas em grupos de dez formigas e mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro (Bueno, O. C. et al., Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. An. Soc. Entomol. Brasil., 26: 107-113; 1997).

[051] As placas foram colocadas em estufa com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa acima de 70% e examinadas diariamente para a retirada e anotação do número de formigas mortas durante um período de 25 dias. Os dados obtidos foram comparados através do teste não paramétrico "log-rank", com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 6.0.

[052] Estudo Aquático – (*Danio rerio* - zebrafish)

[053] Os peixes da espécie *Danio rerio* (Zebrafish) com $3,4 \pm 0,04$ cm e $0,35 \pm 0,01$ g) foram obtidos da empresa Aquaritiba Aquários e Peixes Ornamentais Ltda em Curitiba-PR e transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, sendo mantidos em aquários estoques de 20,0 L para o processo de aclimação, com fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, aeração constante e temperatura da água de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Receberam alimentação diariamente com ração para peixes ornamentais da marca Alcon®. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná sob o nº 943.

[054] Após aclimação, os peixes foram divididos em cinco grupos experimentais sendo o grupo controle mantido durante todo o período experimental. Os demais

grupos foram expostos às concentrações de 0,20; 1,0; 2,0 e 3,0 mg/L do complexo Mg-isofenólico. O bioensaio foi estático com duração de 96 horas. Após o período de exposição, os animais foram anestesiados em água contendo benzocaína 1% e eutanasiados por secção medular. O comprimento total e o peso dos peixes foram aferidos. O cérebro e as vísceras (fígado + intestino) foram retirados e armazenados em freezer -80°C para análises bioquímicas.

[055] Biomarcadores Bioquímicos em *Danio rerio* - zebrafish

[056] Devido à pequena quantidade de tecido, as análises bioquímicas foram realizadas com 2 peixes. As amostras de (fígado + intestino) foram descongeladas, moídas, pesadas e homogeneizadas na proporção de 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0. As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,5 com auxílio de um micro-homogeneizador. As amostras de (fígado + intestino) foram centrifugadas por 30 minutos a 15.000xg a 4°C e as de cérebro, por 20 minutos a 10.000 xg a 4°C, obtendo-se assim duas fases. No cérebro foi realizado análises da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e nas vísceras (fígado + intestino) foram analisadas atividades da enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), além da lipoperoxidação (LPO). Em uma microplaca foram adicionadas às amostras, o DTNB (5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM e o substrato acetiltiocolina a 10,0 mM. As leituras foram realizadas em 405 nm. (Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. modified to microplates by Silva de Assis, 1998.)

[057] Para as análises da atividade da enzima SOD foi utilizado o método proposto por Gao (1998) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol.

[058] Em um microtubo foram adicionados amostra, tampão (Tris-base 1M/ EDTA 5,0 mM pH 8,0) e pirogalol (15mM) e incubados por 30 min. A reação foi interrompida com HCl 1,0 M. A leitura foi realizada em 440 nm. (Gao, R., Yuan, Z. Zhao, Z., Gao, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(1), 41-45, 1998).

[059] A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo o método proposto por Aebi (1984). Em microplaca foram adicionadas as amostras e a solução tampão (Tris–base 1,0M / EDTA 5,0 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20,0 mM e água MilliQ). A leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro em 240 nm. (Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126, 1984).

[060] A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com o método proposto por Keen (1976). Em microplaca foram adicionadas as amostras e acrescentou-se soluções de [GSH a 3,0 mM e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) a 3,0 mM]. As leituras foram realizadas em 340 nm. (Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188, 1976).

[061] As análises da LPO foram realizadas através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*), proposto por Jiang (1992). O sobrenadante das amostras foi tratado em metanol na proporção 1:2 (v/v) e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para microtubos e incubado com a solução reação (laranja de xilenol 100 µM, H₂SO₄ 25 mM, BHT 4 µM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM e metanol 90%) por 30 min. As leituras foram realizadas em 570 nm. (Jiang, Z. Y.; Hunt, J. V.; Wolff, S. P.

[062] Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992). A concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford (1976) com albumina bovina como padrão. (Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254, 1976). As leituras de AChE, SOD, GST LPO e concentração de proteína foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca TECAN A 5082.

[063] Experimentos *in vivo* - Estudos em Ratos (ratos Wistar)

[064] Foram utilizados ratos machos da família de Wistar de aproximadamente 4 meses de idade, com peso entre 230 e 300 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram mantidos 5 animais por gaiola de policarbonato (41

x 34 x 16 cm) com cepilho durante os experimentos, em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro e escuro de 12 horas (7-19h). A água e a comida foram fornecidas a vontade durante todo o estudo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos de acordo com a necessidade de cada experimento. Todos os experimentos e tratamento dos animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, protocolo número 924. O máximo de esforço foi empreendido para minimizar possíveis desconfortos causados aos animais.

[065] Estudo Comportamental – Campo Aberto

[066] Foi realizado um estudo crônico durante 21 dias, onde foi utilizado uma solução de 3,0 mg/mL do complexo Mg-isofenólico preparado em solução salina 5% (m/v) e aplicada via intraperitoneal com uma dosagem de 3,0 mg/kg todos os dias, às 14:00h.

[067] No 21º dia foi realizada uma sessão treino, e no 22º a sessão teste.

[068] Com o objetivo de avaliar a atividade motora dos ratos, foi executado o teste de campo aberto (CA), onde é utilizado um aparato (Fig. 2) que consiste em uma arena redonda 100 cm de diâmetro e 45 cm de altura, com o solo dividido em 19 quadrantes.

[069] Os animais foram colocados no centro do CA e deixados a explorá-lo livremente durante 5 minutos. Foram registrados três parâmetros motores: Número de quadrantes (isto é, o número de travessias das quatro patas do animal de um quadrante para outro), frequência de levantar (o número de vezes que os animais permaneciam sobre as patas traseiras) e tempo de imobilidade (tempo em segundos que o animal permanece imóvel). (Walsh R. N. at al. The Open-Field Test: A Critical Review Psychological Bulletin, Vol. 83, No. 3, 482-504, 1976).

[070] Teste de Natação forçada

[071] O teste de natação forçada consistiu em duas etapas. A Primeira foi uma sessão treino, na qual os animais foram colocados em um tanque cilíndrico de policloreto de polivinila (PVC) com dimensões de 25 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água a uma temperatura de $24.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, com profundidade de 25 cm, que não permite que os ratos toquem o fundo do tanque por 15 min (Fig. 3). Após 24 h da primeira sessão, os animais foram submetidos ao teste de natação por 5 minutos e seu

comportamento monitorado por uma câmera localizada acima do tanque (Reneric, J. P. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res.* 136(2): 521-32, 2002).

[072] Esse teste teve como objetivo avaliar 3 parâmetros comportamentais: tempo de natação (definido como movimentos horizontais, no qual o animal realiza movimentos circulares e cruzamentos de um quadrante para o outro), tempo de imobilidade (verificada quando não existe nenhum movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água) e o tempo de escalada (consiste em movimentos verticais, no qual o animal tenta com as patas dianteiras escalar as paredes do cilindro). A água era substituída após cada teste a fim de evitar a influência de temperatura e substâncias deixadas pelo rato anterior. Os resultados foram expressos em segundos. (Santiago, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 34: 1104–1114., 2010).

[073] Teste com Labirinto em Cruz Elevado

[074] Para avaliar o comportamento ansiolítico dos ratos, um dos testes mais largamente utilizado é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. O aparato para o teste consiste em dois braços abertos e dois braços fechados (por paredes laterais), opostos entre si (Fig.4). O rato é posto no centro do labirinto e deixado a explorá-lo e todo comportamento é filmado por 5 minutos. A medida das suas categorias comportamentais reflete o conflito entre a tendência natural dos animais em explorar ambientes novos e evitar situações potencialmente perigosas. O comportamento do animal no LCE é passível de medição através de observação direta, determinando-se as medidas absolutas e relativas de preferência (número de entradas e tempo de permanência) pelos braços abertos e fechados. (Pellow, S., et al., Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167., 1985).

[075] Biomarcadores Bioquímicos - (ratos Wistar)

[076] Após os testes que avaliaram o comportamento, no 23º dia os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (15%) e decapitados. Em seguida, os cérebros, fígados e rins foram removidos e armazenados a – 80°C para análises bioquímicas. As amostras de cérebro (córtex frontal, estriado e hipocampo), fígado e rins foram homogeneizadas com auxílio de micro-homogeneizador na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,10 M e pH 7,0. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 15.000 $\times g$ a 4°C, obtendo duas fases. A fase aquosa foi utilizada para avaliar a atividade antioxidante por meio das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), além da enzima glutathione reduzida (GSH).

[077] A neurotoxicidade do complexo Mg-isofenólico foi avaliada nas regiões cerebrais: córtex frontal, estriado e hipocampo por meio da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Foram adicionados na microplaca a amostra, o DTNB (5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM e o substrato acetiltiocolina a 10 mM. A leitura foi realizada a 405 nm. (Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M.). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95, 1961).

[078] As análises da atividade da enzima SOD foram realizadas por meio do método de inibição da auto-oxidação do pirogalol. Em microtubos foram adicionados amostra, tampão (Tris-base 1,0 M/ EDTA 5,0 mM pH 8,0) e pirogalol (15,0 mM) e incubados por 30 min. A reação foi interrompida com HCl 1,0 M. As leituras foram realizadas em 440 nm. (Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(1), 41-45, 1998).

[079] Para avaliar a atividade da enzima CAT foram adicionados em uma placa a amostra e a solução Tampão (Tris-base 1 M/EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20 mM e água MilliQ). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de 240 nm. (Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126, 1984.)

[080] A atividade da GST foi calculada adicionando em uma microplaca a amostra e solução de [GSH a 3,0 mM e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) a 3 mM]. As leituras foram realizadas em 340 nm. (Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188, 1976).

[081] As análises da enzima GSH foram baseadas no método proposto por Sedlak e Lindsay. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) para precipitação protéica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 10 min a 4°C. Foram adicionados à microplaca: amostra, tampão (Tris-base 400 mM, pH 8,9) e DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico, 2,50 mM). As leituras foram realizadas em 415 nm. Para determinação da concentração de GSH foi realizada uma comparação com uma curva-padrão de GSH. (Sedlak, J., Lindsay, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205, 1968). A concentração de proteína foi determinada com albumina (soro bovina) como padrão. (Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254, 1976). As leituras de AChE, SOD, GST, GSH e concentração de proteína foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca TECAN A 5082.

[082] Investigação do grau de pureza do complexo Mg-isofenólico

[083] Os dados de análise elementar dos teores de C, H e N indicam a presença de um composto com fórmula mínima ($MgC_{22}H_{24}N_2O_9$) PM = 484.75 g/mol. Os dados experimentais estão coerentes com a proposta prevista para o complexo Mg-isofenólico. Porém, observamos uma diferença significativa entre o valor teórico e o experimental para o hidrogênio. Tal diferença pode estar relacionada com alta capacidade de hidratação do íon Mg(II), o que pode levar a um aumento no número de moléculas de água coordenadas ou de solvatação no complexo Mg-isofenólico. A Tabela 1 apresenta os dados referentes à porcentagem em massa de C, N e H obtidos.

[084] É possível observar uma boa concordância entre os dados experimentais e teóricos, o que confirma a fórmula mínima proposta.

MM(g/mol)	experimental(teórico) %		
	C	H	N
484,75	55,01 (54,51)	5,12 (4,99)	5,91 (5,78)
% Erro	0,90	2.53	2,1

Tabela 1: Resultados de análise elemental dos teores de C, H e N para o complexo cis-

[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO) considerando a fórmula mínima MgC₂₂H₂₄N₂O₉.

[085] Caracterização por DFT, IR e RMN do complexo Mg-isofenólico

[086] O complexo octaédrico Mg-isofenólico poderia adotar as formas isoméricas *cis*- e *trans*-, que estão relacionadas ao grupo água e hidroxila coordenada diretamente ao Mg(II). O cálculo de DFT ao nível teórico B3LYP/LanL2dZ foi realizado para definir as estruturas mais estáveis do complexo Mg-isofenólico. Foram calculadas as entalpias e as energias livres de Gibbs para as estruturas, usando os termos de correção termodinâmica em 298.15 K, obtidas a partir dos cálculos dos modos vibracionais, garantindo que as frequências imaginárias não foram geradas nas estruturas mínimas.

[087] O isômero *trans*- converge para um sistema penta coordenado devido à forte interação do hidrogênio H---OH com o COO⁻ do complexo Mg-isofenólico.

[088] Comparando-se as duas estruturas de menor energia, o isômero cis- (Fig. 5A) é favorecido por 3,58 Kcal/mol. A precisão da geometria otimizada foi comprovada através da comparação do espectro teórico e experimental do complexo Mg-isofenólico (Fig. 5B). A coordenação bidentada do ácido isovanílico ao íon Mg(II) é suportada pelo o grupo carboxílico (Fig. 5B), onde o estiramento C=O em 1698 cm⁻¹ com modos vibracionais do C-OH entre 1290 e 1320 cm⁻¹ tem uma redução em sua energia com a desprotonação do grupo carboxilato (COOH) do ácido isovanílico. O espectro de infravermelho (IR) teórico mostra três modos de vibração do C=O, em 1542, 1503 e 1410 cm⁻¹ e com aparecimento de um novo estiramento em 480 cm⁻¹ atribuída à ligação do metal-oxigênio, como observado para muitos complexos metálicos com um átomo doador de oxigênio (Fig. 5B). (Mohammadi, K. at al. Synthesis and characterization of dual function vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications. J. Inorg. Biochem. 2005, 99 (11), 2217-2225 e Song, Y-M.; Xu,

at al. Synthesis, characterization and biological activities of rare earth metal complexes with curcumin and 1,10-phenanthroline-5,6-dione. J. Inorg. Biochem. 2009, 103(3), 396–400).

[089] Os espectros de RMN de H^1 para o complexo Mg-isofenólico, fenantrolina e ácido isovanílico livres, Figura 6 e Tabela 2 confirmam a obtenção do complexo Mg-isofenólico. O efeito de coordenação da 1,10-fenantrolina e do ácido isovanílico ao íon $Mg(II)$, levou a alteração dos sinais dos prótons 1H , de dubletos e multipletos, para singletos largos. Essa alteração está relacionada com a alta densidade de carga do íon $Mg(II)$ que alterou o momento de quadrupolo elétrico da molécula, indicando que a troca do hidrogênio ocorreu a uma velocidade alta, uma vez que o ^{14}N tem um quadrupolo elétrico e, a relaxação de seus estados de spins ocorre muito rápida, de modo que os prótons ligados ou próximos ao nitrogênio vêem uma média dos estados de spin possíveis do ^{14}N . (CAUSA, M. at al. Electronic structure and stability of different crystal phases of magnesium oxide. Physical Review B, v. 33, n. 2, p. 1308–1316, 1986 e Silverstein, R. M. at al. C.T; 3ª Ed. Editora Guanabara; Rio de Janeiro 1979.(b) n. . li, p. 1450–1455, 2005).

[090] De maneira geral, os tempos de relaxação em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) podem ser descritos como: relaxação spin-rede ou longitudinal, caracterizada por T_1 e relaxação spin-spin ou transversal, caracterizada por T_2 . Vale lembrar, no entanto, que ambos os processos são distintos e ocorrem simultaneamente, mas com tempos diferentes dependendo da amostra. (Imoneau, C. at al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for food systems. Food Research International, v.26, p. 387– 398, 1993).

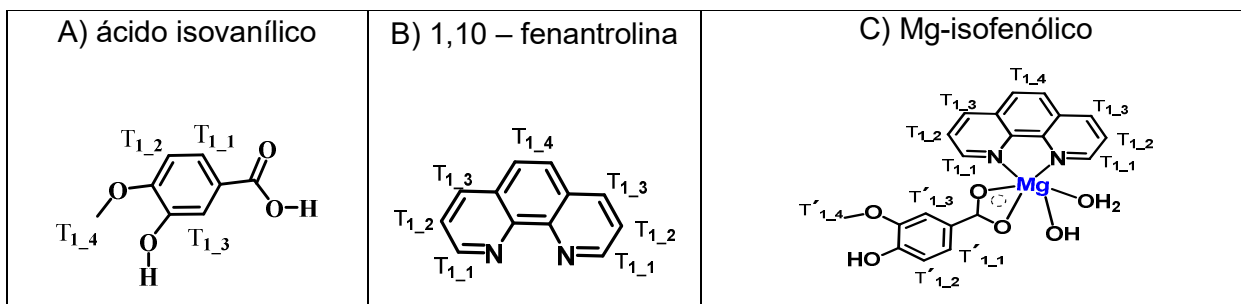
[091] Para a 1,10-fenantrolina, ácido isovanílico e o complexo Mg-isofenolico calculou-se tempo de relaxação (T_1) uma vez que este em solução tem a fonte dominante a interação entre os núcleos a dipolo-dipolo e modulada pela mobilidade molecular, de modo que possui uma dependência da temperatura, viscosidade da solução, do tamanho e da estrutura das moléculas. Os dados da Tabela 3, mostram uma redução no tempo de relaxação T_1 após a coordenação do íon $Mg(II)$ em todos os prótons do complexo Mg-isofenólico, o tempo de relaxação do próton T_{1_1} da 1,10-fenantrolina por

exemplo, teve seu tempo reduzido em 95% após a coordenação. Isso indica que tal efeito está diretamente relacionado com alto poder polarizante do íon Mg(II).

[092] A temperatura foi um parâmetro estudado, visto que esta possui uma relação direta com o tempo de relaxação e uma forte influência na resolução dos sinais do complexo Mg-isofenólico. Os experimentos realizados em 60, 27 e -5°C mostram uma melhora na resolução dos sinais, Figura 6. Analisando a temperatura de -5°C, é possível verificar que os sinais de dubletos e multipletos da região da fenantrolina compreendidos de 7,6 à 9,3 ppm foram desdobrados por conta da redução dos níveis vibracionais e maior tempo de relaxação longitudinal (T_1) do complexo Mg-isofenólico em baixa temperatura.

X (δ C)	X (δ C)	H (δ)
1 (150,41)	10 (150,13)	9,10
2 (127,17)	9 (127,17)	7,78
3 (138,91)	4 (129,85)	8,50
5(128,92)	6 (128,92)	8,00
7 (129,85)	8 (138,91)	-
11 (145,99)	12 (145,87)	-
13 (172,30)	(15142,79)	-
14	111,26	6,81
16 (149,27)	19 (123,01)	-
17 (115,96)	- 18(121,48)	7,36
20	55,95	3,75 (s)

Tabela 2: Deslocamentos químicos de H^1X e CX^{13} , δ (ppm) do complexo Mg-isofenólico



Tempo de relaxação (s)	Ácido isovanílico	1,10 – Fenantrolina	Metal- isoflavanóide
T_{1-1}	2,0	5,6	0,3
T_{1-2}	1,5	4,7	0,1
T_{1-3}	1,6	4,6	0,7
T_{1-4}	5,0	4,5	1,1
T'_{1-1} e T'_{1-2}	-	-	0,6
T'_{1-3}	-	-	2,2
T'_{1-4}	-	-	2,7

Tabela 3: Tempo de relaxação do ácido isovanílico, 1,10-fenantrolina e para o Mg-isofenólico.

[093] Analisando o espectro de RMN¹³C simplificado, é possível confirmar a formação do complexo Mg-isofenólico, uma vez que o deslocamento químico do carbono 13, Figura 7 A e B, de 167 ppm do ácido isovanílico livre para 174 ppm no complexo Mg-isofenólico, mostrando o efeito da ligação e coordenação de grupos retiradores de densidade. Indicando a coordenação da carboxila ao íon Mg(II). Esse efeito é coerente com a preferência do íon Mg(II) a coordenação ao oxigênio e foi observado em outros sistemas contendo Mg(II) como centro metálico. (Oliveira, R. M. M. et al. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. Journal of inorganic biochemistry, v. 129, p. 35–42, 2013).

[094] Os espectros de IV, mostrados na figura 5B, estão de acordo com os resultados do RMN para o complexo Mg-isofenólico. Pode-se observar que o estiramento da carboxila C=O em 1698 cm⁻¹ deixou de ser ativo no IR após a coordenação devido à perda de característica de ligação dupla, no entanto, é possível verificar a presença deste carbono em 174 ppm conforme exibido no espectro de RMN de ¹³C da figura 8B.

[095] Esse deslocamento está relacionado com a desblindagem do carbono 13, passando de um grupo carboxílico para a característica de um grupo carboníl após a coordenação.

[096] O espectro de RMN de ¹H pode auxiliar na identificação de possíveis agregados moleculares uma vez que os sinais de H¹ apresentam-se com baixa resolução,

alargados e com seus deslocamentos químicos alterados em comparação a um composto que não forma agregados moleculares. Essas alterações ocorrem por conta da perturbação da anisotropia de anel decorrente das interações entre os sistemas das moléculas agregadas.

[097] Para isso preparou-se uma série de amostras do complexo Mg-isofenólico em MeOD-d₄ em várias concentrações e realizou-se as medidas de RMN de ¹H.

[098] Analisando a Figura 9, pode-se observar que não houve alteração dos deslocamentos químicos e alteração na resolução dos sinais, mostrando que não ocorreu a formação de agregados em solução dentro da faixa de concentração estudada, indicando que os sinais alargados estão relacionados com o efeito da coordenação do íon Mg(II).

Estudo de pH e estabilidade utilizando o RMN de ¹H

[099] Um candidato em potencial a inseticida e/ou fungicida deve apresentar estabilidade no estado sólido, no escuro e exposto à luz solar quando em solução aquosa ou em água. O complexo Mg-isofenólico em tampão fosfato (D₂O), mostrou-se estável em toda faixa de pH estudada (Fig.10). Porém, apresentou uma variação nos deslocamentos químicos nos pHs 4 e 10, respectivamente, o que está relacionado com a protonação e desprotonação do complexo Mg-isofenólico.

[100] O complexo apresentou excelente estabilidade em solução aquosa quando exposto à luz solar natural e foi comparada com a amostra que ficou protegida da luz durante 120 horas. Essa estabilidade pode ser comprovada pela ausência de alterações nos espectros de RMN de ¹H em tampão fosfato D₂O (pH = 7,4). Esses resultados indicam a alta resistência do complexo Mg-isofenólico à fotodegradação, ao passo que não desprezam os efeitos nocivos para os organismos aquáticos e terrestres. Nesse contexto, fez-se necessário, a investigação da toxicidade no meio aquático utilizando o peixe padrão zebrafish e ratos machos da família de Wistar. (Lee, J. et al. Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Assessment: The Application of the Zebrafish in Defining the Effects of Arsenic, Methylmercury, or Lead on Early Neurodevelopment. *Toxics*. 2014, 2(3), 464–495).

Solubilidade e valor do pKa do complexo Mg-isofenólico

[101] A solubilidade de uma substância em meio aquoso é um fator importante no planejamento de um candidato a inseticida e/ou fungicida. O complexo Mg-isofenólico apresentou uma solubilidade de $314,13 \pm 2,13 \mu\text{g/mL}$ em meio aquoso pH=7,4 tampão Britton-Robinson (tampão BR) o que poderá viabilizar sua aplicação tanto na forma de iscas (sólido) ou na forma de solução.

[102] O complexo Mg-isofenólico apresentou um valor de pKa 6,02, Figura 12A, contra 4,67 do ácido isovanílico livre. Sendo que o efeito da coordenação deixou o complexo Mg-isofenólico mais ácido que o ácido isovanílico livre, Figura 9B, tal alteração pode ter contribuído para maior grau de ionização do complexo Mg-isofenólico e uma maior inibição das espécies reativas do oxigênio.

Atividade inseticida contra *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiótico

[103] Com o objetivo de atuarem como inseticidas ou agentes tóxicos na forma de iscas e emulsões, utilizou-se o complexo Mg-isofenólico no combate/controle das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Esses estudos são de grande importância devido à relação mútua entre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiótico, uma vez que conhecendo os mecanismos de defesa, poderá favorecer o desenvolvimento de novos inseticidas e pesticidas menos tóxicos e mais seguros para o meio ambiente. (Silva, L. C. et al. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology* 2015, 62(4), 484–493). Além disso, as formigas produzem bactérias antifúngicas para proteger seu fungo simbiótico de fungos patogênicos e pesticidas, sendo que esta relação tem grande efeito no desenvolvimento de novos inseticidas.

[104] O ensaio foi realizado também para o ácido isovanílico livre, onde as formigas foram tratadas e alimentadas com dieta artificial (grupo de controle), sulfluramida, ácido isovanílico livre e o complexo Mg-isofenólico, Tabela 4. As taxas de sobrevivência das formigas, não diferiram significativamente entre o grupo controle e as tratadas com ácido isovanílico livre. O complexo Mg-isofenólico apresenta uma toxicidade comparável ao pesticida comercial sulfluramida. A Tabela 4 mostra que a taxa de mortalidade da formiga *Atta sexdens rubropilosa* frente ao complexo Mg-isofenólico entre o 6º e 8º dia foi tóxica para as concentrações de $1,0 \text{ mgg}^{-1}$ e $2,0 \text{ mgg}^{-1}$. O $S_{50\%}$

do complexo Mg-isofenólico foi estimada em 2,0 mgg⁻¹ (6º dia, S₅₀ = 2b). O complexo Mg-isofenólico apresentou um modo de ação lenta e provocou a mortalidade mais rápida do que a sulfluramida (0,2 mgg⁻¹, S₅₀ = 5b em 10 dias).

[105] Com o objetivo de avaliar a inibição do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, foram realizados estudos com o complexo Mg-isofenólico e o ácido isovanílico livre. A Figura 13 mostra os diâmetros médios das colônias e a % de inibição do fungo após 30 dias de experimento. Conforme ilustrado na Figura 12, é possível confirmar a eficiência do complexo Mg-isofenólico, onde este inibiu 100% do crescimento do fungo utilizando uma concentração de 100 mgL⁻¹.

Tratamento	% Mortalidade acumulada por dia										S ₅₀ *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	4	4	6	6	8	12	14	22	28	>25a
Ácido isovanílico Livre	0	0	6	12	18	24	28	32	40	44	>25a
Mg-Isofenólico 0.20 mgg ⁻¹	0	2	4	14	18	28	58	76	90	94	13b
Mg-Isofenólico 1.0 mgg ⁻¹	6	22	56	90	98	100	100	100	100	100	3b
Mg-Isofenólico 2.0 mgg ⁻¹	4	48	78	100	100	100	100	100	100	100	2b
Sulfluramida 0.20 mgg ⁻¹	0	8	20	70	98	100	100	100	100	100	5b

Tabela 4: Mortalidade (%) e Média de sobrevivência 50% (S₅₀) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* alimentados com dieta artificial, com ácido isovanílico livre, Mg-isofenólico e sulfluramida. *Diferentes letras após S₅₀ valores mostram diferença significativa de acordo com o log-rank teste ($P < 0.05$)

[106] Impacto do complexo Mg-isofenólico sobre a vida aquática

[107] A utilização de agrotóxicos pode provocar a contaminação dos lençóis freáticos por conta da lixiviação dos solos, além de alterar toda vida aquática (Edwards, 1973). Porém, esse tipo de prática agrícola tem sido um modelo recorrente no Brasil.

[108] Experimentos realizados com complexo Mg-isofenólico frente ao peixe padrão Zebrafish utilizando uma concentração máxima de 2,0 mgL⁻¹ por 96h de exposição, não apresentou qualquer toxicidade para o sistema aquático nas concentrações estudadas.

[109] Em contrapartida, estudos toxicológicos com os inseticidas comerciais piretróide e organofosforado mostraram que mesmo em baixíssimas concentrações, apresentam elevada toxicidade para o sistema aquático, conforme pode-se verificar com os respectivos valores das $DL_{50} = 0,0025-0,0058$ e $0,49-1,28 \text{ mgL}^{-1}$ após 96 horas de exposição ao peixe Zebrafish. (Zhang, Z. Y, et. al, Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Manag. Sci.* 2010, 66(1), 84–89).

[110] Foi analisado também, o efeito do complexo Mg-isofenólico sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e da enzima catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) no trato digestivo (intestino e fígado), que são biomarcadores bioquímicos clássicos que indicam a contaminação por inseticidas e pesticidas em sistemas aquáticos. A Figura 14A, B, C mostra que a exposição do peixe Zebrafish ao complexo Mg-isofenólico não afetou a atividade das enzimas AChE no cérebro, CAT e GST no aparelho digestivo em todas as concentrações investigadas. Em contraste, a presença complexo Mg-isofenólico mostra uma redução significativa na peroxidação lipídica de Zebrafish acompanhada por um aumento na atividade de superóxido dismutase em comparação com o controlo, Figura 14. Indicando que o complexo, além de não apresentar toxicidade, pode estar atuando com antioxidante no sistema aquático.

[111] Impacto do complexo Mg-isofenólico sobre a vida terrestre

[112] Os experimentos realizados com ratos da família Wistar criados em laboratório, não foram observados sinais de toxicidade ou alterações comportamentais durante o tratamento com o complexo Mg-isofenólico utilizando uma dosagem de $3,0 \text{ mgKg}^{-1}/\text{dia}$ durante o tratamento crônico de 21 dias com uma dose total de 62 mgKg^{-1} . A DL_{50} para administração oral do fipronil, um inseticida que danifica o sistema nervoso central de insetos ao bloquear a passagem de íons cloro através dos receptores GABA é de 50 mgkg^{-1} . (Third Reevaluation - Report of the Hazard Identification Assessment Review Committee; HED Doc. No. 014400; U.S. Environmental Protection Agency, Health Effects Division, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2000; pp 1-24).

[113] Os resultados dos experimentos comportamentais mostrados na Figura 15, após o uso do complexo Mg-isofenólico em um estudo crônico, apresentaram um aumento da atividade locomotora espontânea dos ratos e reduziu o tempo de escalada no teste de natação forçada, indicando que o complexo Mg-isofenólico poderia ter cruzado a barreira hematoencefálica. No teste de plus maize elevado, houve um aumento significativo na percentagem do tempo de permanência no compartimento do braço aberto em comparação com os ratos controle, indicando que o complexo Mg-isofenólico apresenta propriedades características de fármacos ansiolíticos.

[114] Os experimentos bioquímicos mostraram um aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) no estriado, glutathione redutase (GSH) no córtex frontal e acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, após o tratamento com o complexo Mg-isofenólico (Figura 16), indicando que o inseticida cruza a barreira hematoencefálica e não apresenta toxicidade no sistema cerebral. As análises bioquímicas dos rins e do fígado, mostram um aumento da atividade das enzimas catalase (CAT) e SOD (Figura 16), evidenciando que o complexo Mg-isofenólico não induz quaisquer manifestações tóxicas nesses órgãos. Além disso, a redução da atividade da glutathione redutase (GSH) nos rins após o tratamento com o complexo Mg-isofenólico, pode estar relacionado com o aumento da atividade antioxidante das enzimas CAT e SOD ou com uma possível ação do complexo Mg-isofenólico como antioxidante secundário.

[115] As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) possuem o papel importante de controlar os níveis das espécies reativas do oxigênio, superóxido e peróxido de hidrogênio nas células, respectivamente. Assim, o aumento da atividade antioxidante da SOD sugere que o complexo Mg-isofenólico pode estar atuando como um eliminador do radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, contribuindo para o aumento da atividade da SOD (Birben, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012, 5(1), 9-19).

[116] Várias polifenóis, tais como a vitamina E (Alfa Tocoferol), Vitamina C (ácido ascórbico) e carotenóides, são fortes inibidores da peroxidação lipídica (Nimse, S. B. et al. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms *RSC Adv.* 2015, 5 (35), 27986-28006). Portanto, os resultados antioxidantes obtidos para a inibição das

espécies reativas do oxigênio, mostraram um complexo estável e com baixo valor de IC_{50} . Nesse contexto, foram realizadas atividades antioxidantes do ácido isovanílico livre e do complexo Mg-isofenólico utilizando o ensaio com a VitB2/NBT e o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. (DPPH•). (Winterbourn, C. C. Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 1979, 182(2), 625–8. e Sanna, D. et al. Determination of Free Radical Scavenging Activity of Plant Extracts Through DPPH Assay: An EPR and UV-Vis Study. *Food Anal. Method.* 2012, 5(4), 759–766. DOI:10.1007/s12161-011-9306-1).

[117] O complexo Mg-isofenólico exibiu uma grande capacidade de inibição do radical DPPH com um IC_{50} de $94,70 \pm 4,12 \mu\text{molL}^{-1}$ aproximadamente 4 vezes superior ao valor obtido para o ácido isovanílico livre, $405,0 \pm 8,6 \mu\text{molL}^{-1}$. Para NBT, o complexo Mg-isofenólico apresentou IC_{50} de $64,65 \pm 4,67 \mu\text{molL}^{-1}$, quase metade do valor obtido para o ácido isovanílico livre, $105,77 \pm 4,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, para inibição do radical superóxido.

[118] Esses resultados mostram que a redução da LPO no peixe zebrafish e nos ratos da família de Wistar, pode estar relacionada com a atividade antioxidante do complexo Mg-isofenólico, uma vez que este atua diretamente na inibição das espécies reativas de oxigênio.

[119] A partir do exposto, observa-se que o **COMPLEXO Mg-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS** resolve problemas presentes no campo técnico no que diz respeito à toxicidade de inseticidas empregados no combate da formiga *Atta sexdens rubropilosa*, além de apresentar excelente estabilidade em solução, estabilidade térmica, hidrossolubilidade para diferentes valores de pH (3-10) e alto rendimento sintético, e, portanto, é merecedor do privilégio de patente de invenção.

REIVINDICAÇÕES

1) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPLEXO Mg-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS caracterizado pela adição (E1) de 25,00 mL de metanol HPLC (1) e de 1,76 g (8,22 mmol) de acetato de magnésio (2) $[\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$; seguida da adição (E2) de 1,36 g (7,54 mmol) de 1,10-fenantrolina (3) e 1,80 g (10,70 mmol) do ácido isovanílico (4), ficando o sistema (5) sob agitação (E3) constante e atmosfera de $\text{N}_{2(g)}$ por 10 minutos; em seguida, se dar a adição (E4) de 1,488 mL (10,70 mmol) de trietilamina (6), e então, a mistura (7) reacional ser mantida sob agitação constante (E5) e temperatura de 110°C por 2h, sendo, filtrada (E6) duas vezes a aproximadamente 25°C para remover impurezas; a solução remanescente (8) ser rota-evaporada (E7) para redução do volume para cerca de 3,00 mL, sendo adicionados (E8) à solução reduzida (9), 30,00 mL de água gelada (A), para formação de precipitado (10) a ser filtrado (E9) e lavado (E10) com 50,0 mL de água gelada (A), para obtenção do complexo metálico orgânico (11), o qual será seco a vácuo (E11) e armazenado (E12) em um dessecador, até ser empregado (E13).

2) COMPLEXO Mg-ISOVANILATO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser constituído de:

- ✓ de metanol HPLC (1);
- ✓ acetato de magnésio (2), $[\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$;
- ✓ 1,10-fenantrolina (3);
- ✓ ácido isovanílico (4), e;
- ✓ trietilamina (6).

3) COMPLEXO Mg-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado por** ser adicionado a iscas atrativas para a formiga *Atta sexdens rubropilosa* em uma concentração entre 0,2 e 2 mg/g.

FIG. 1

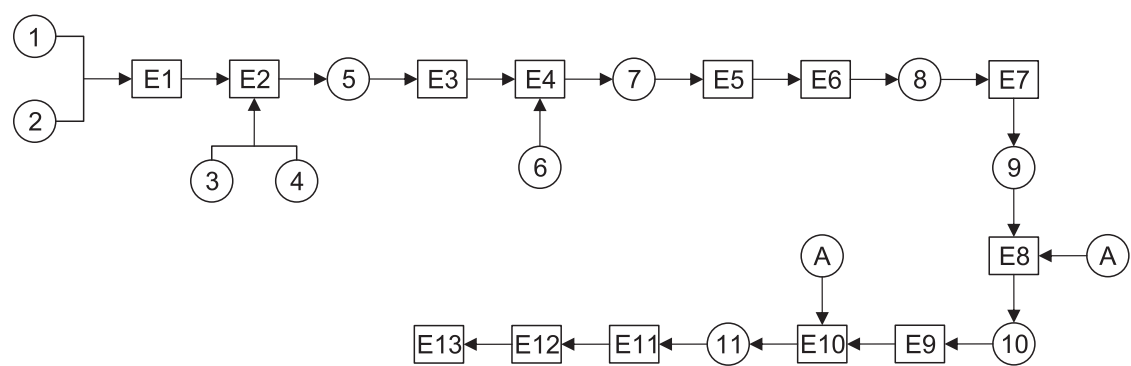


FIG. 2



FIG. 3

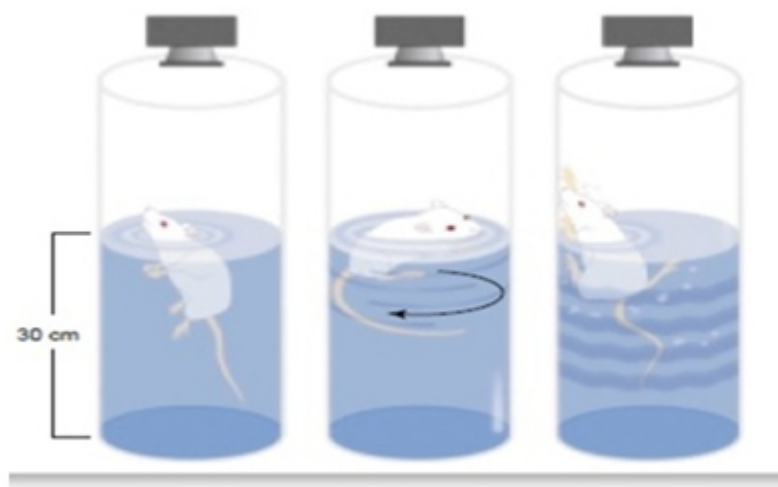


FIG. 4



FIG. 5

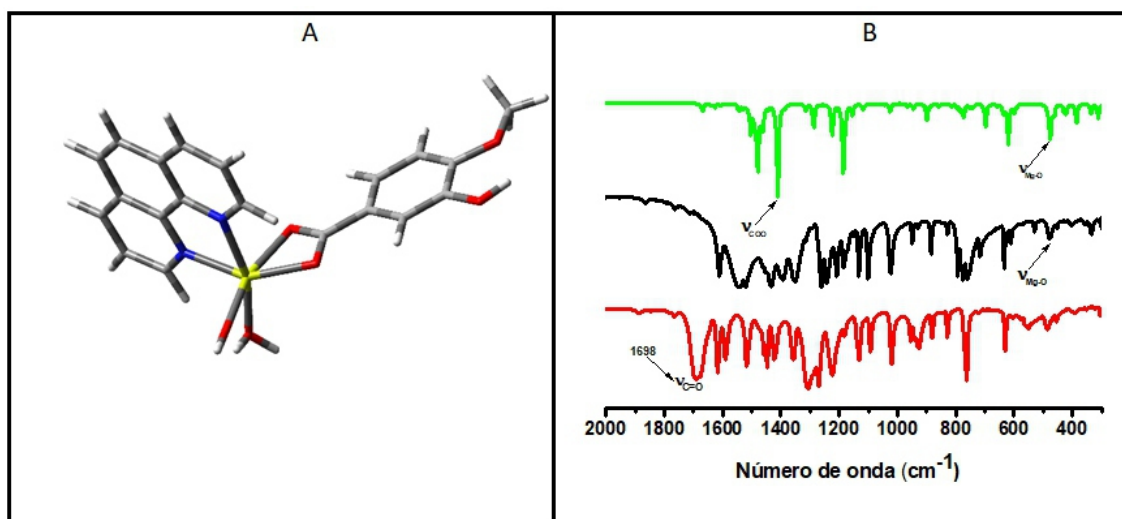


FIG. 6

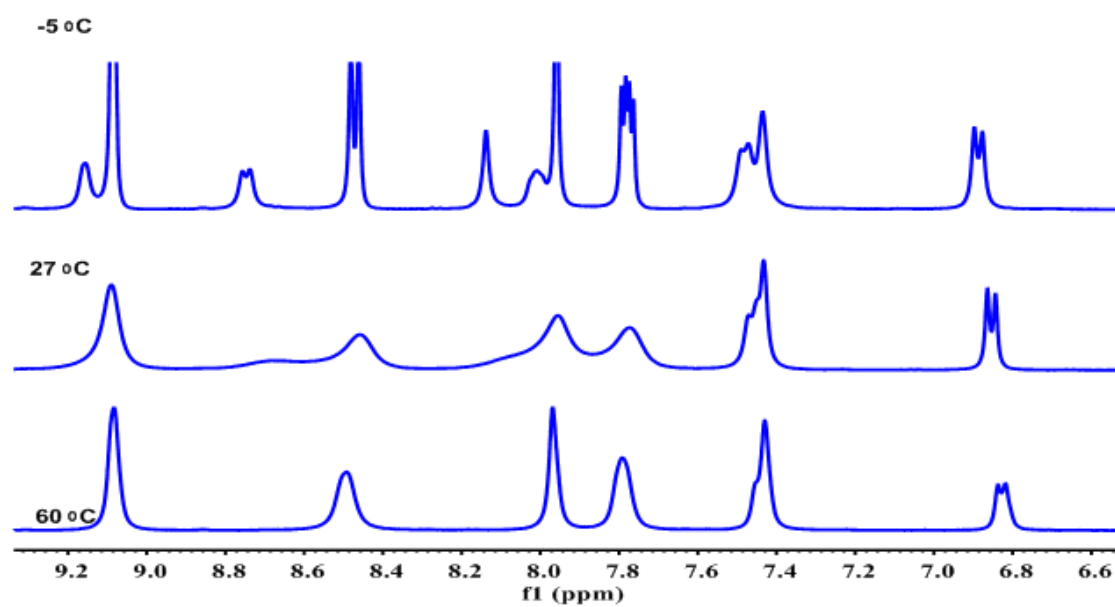


FIG. 7

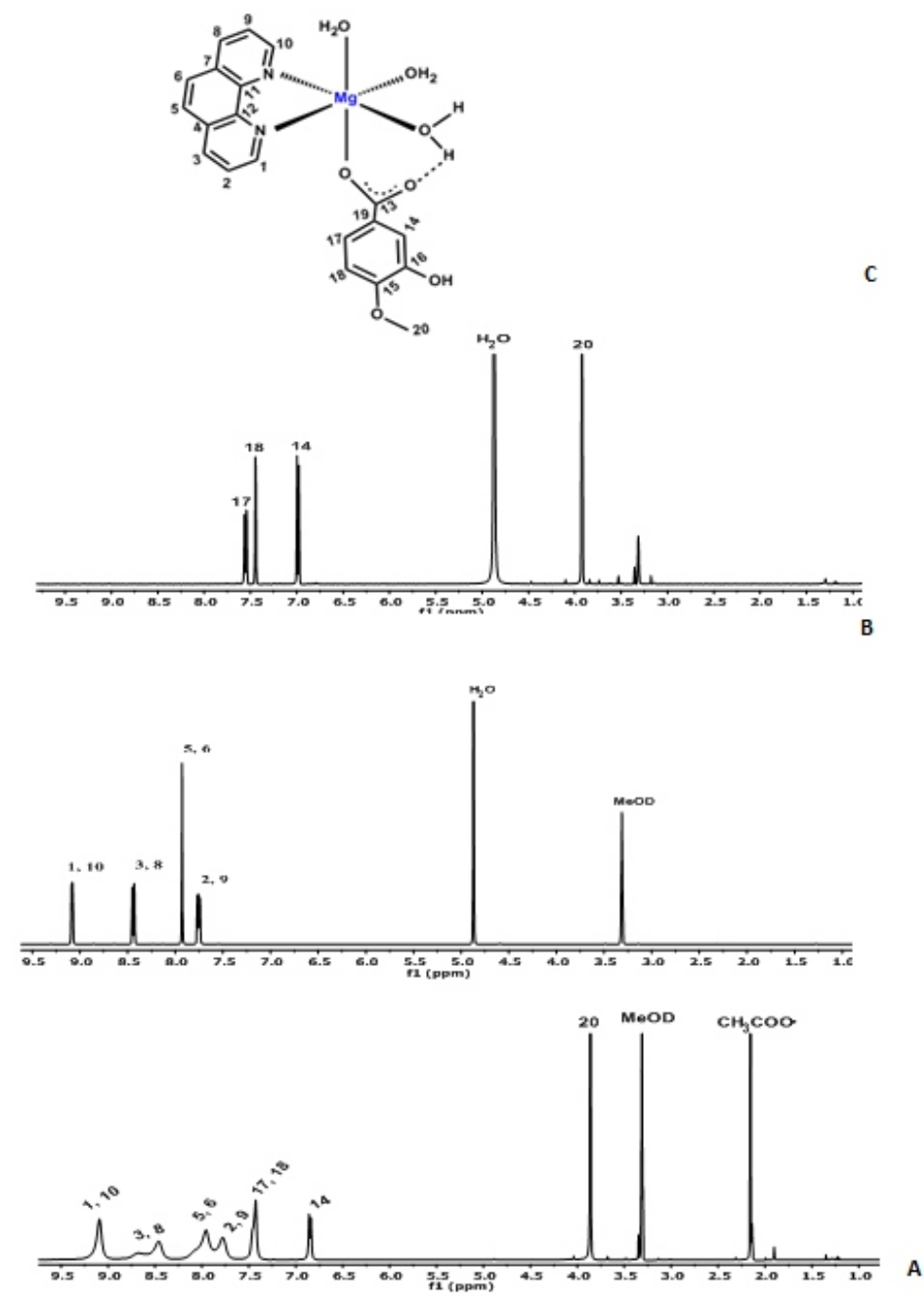


FIG. 8

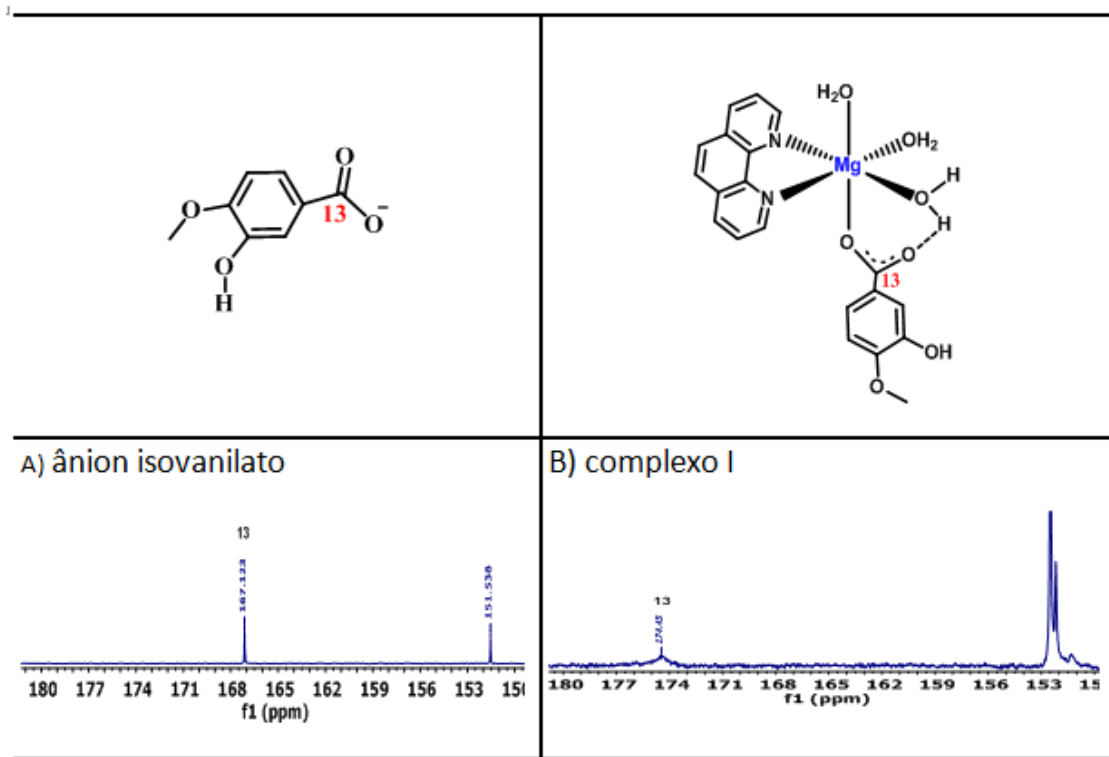


FIG. 9

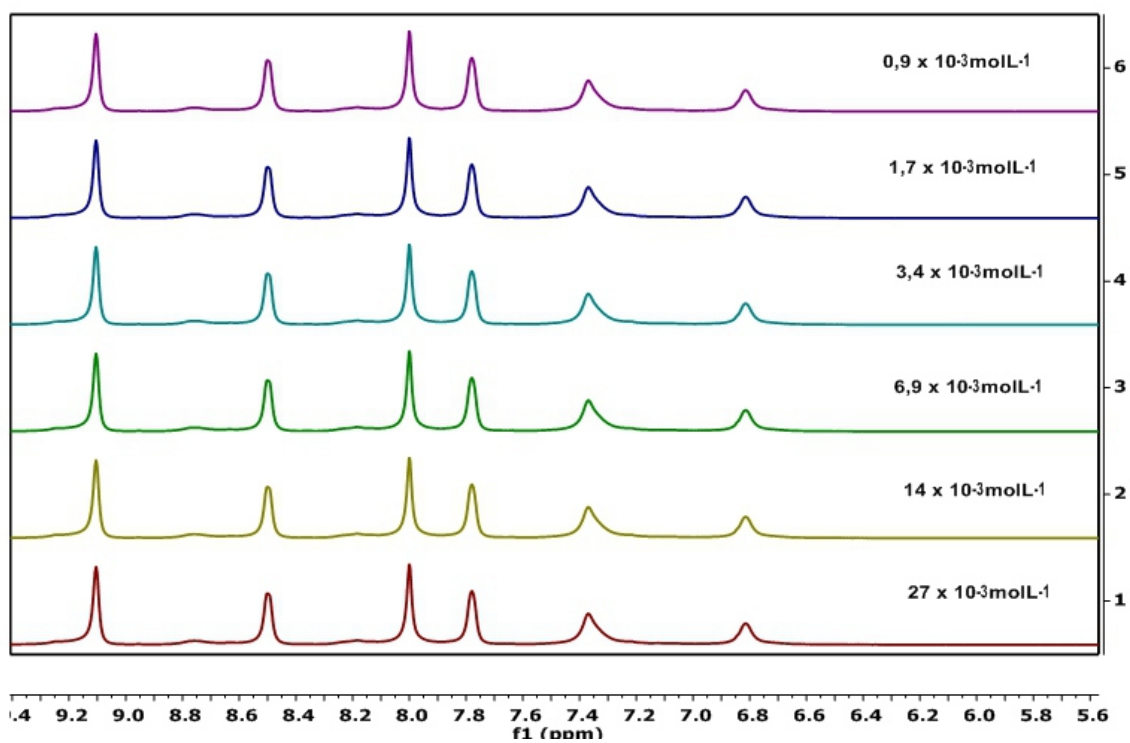


FIG. 10

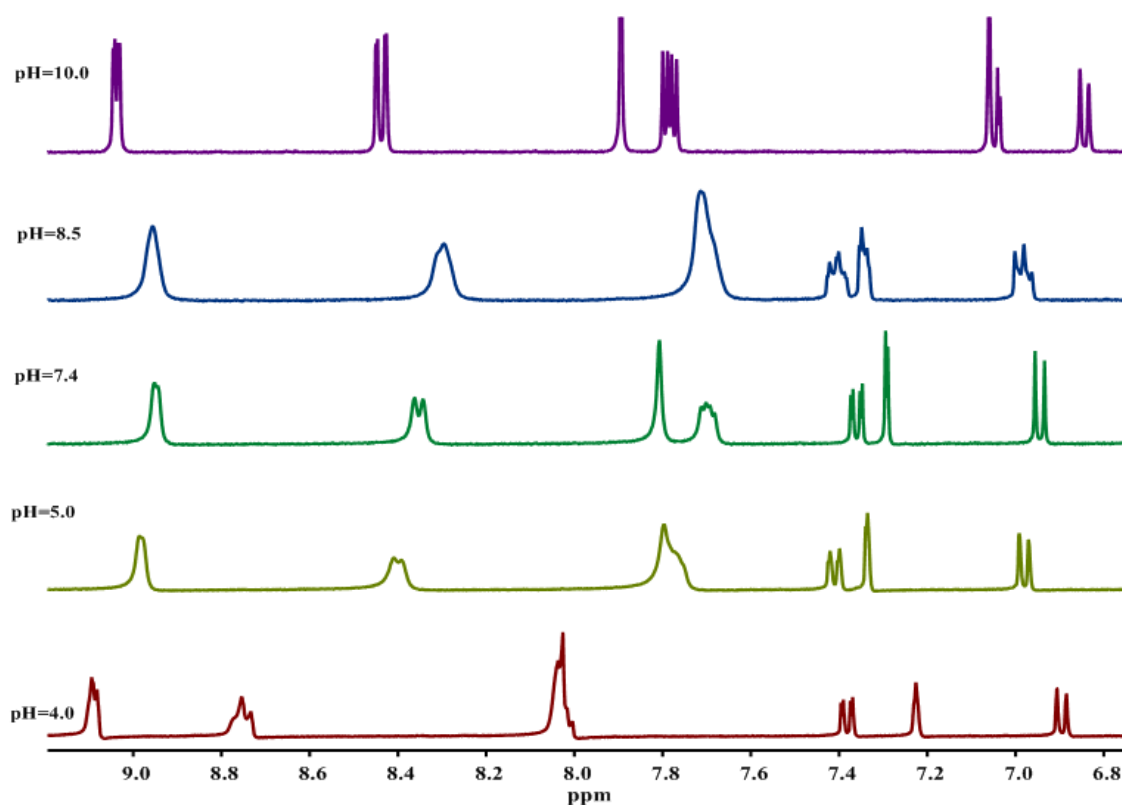


FIG. 11

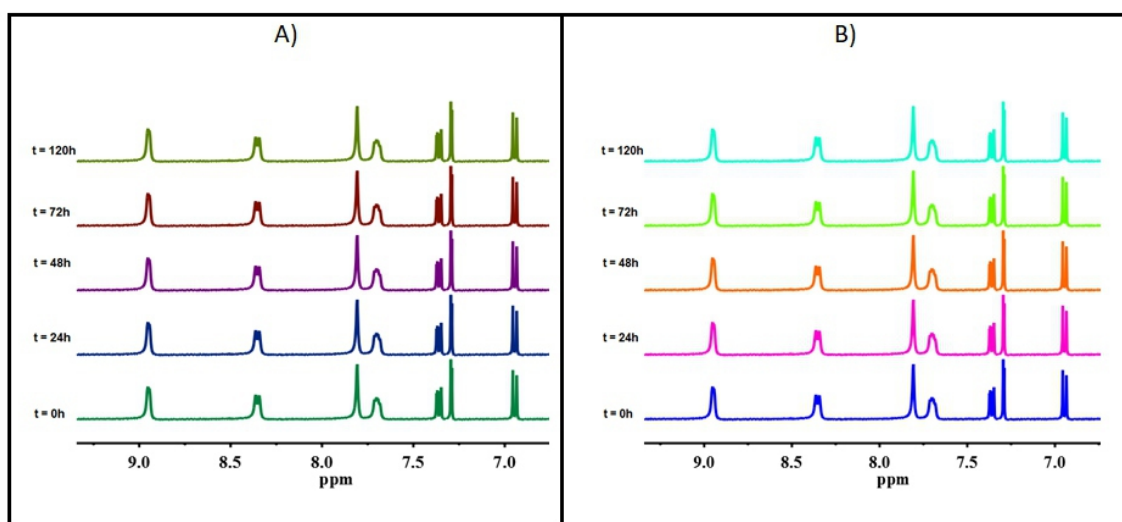


FIG. 12

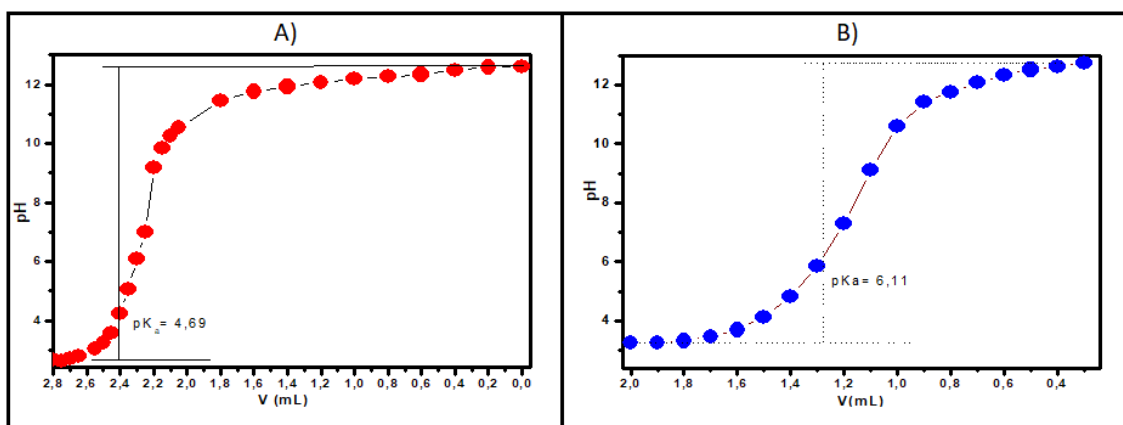


FIG. 13

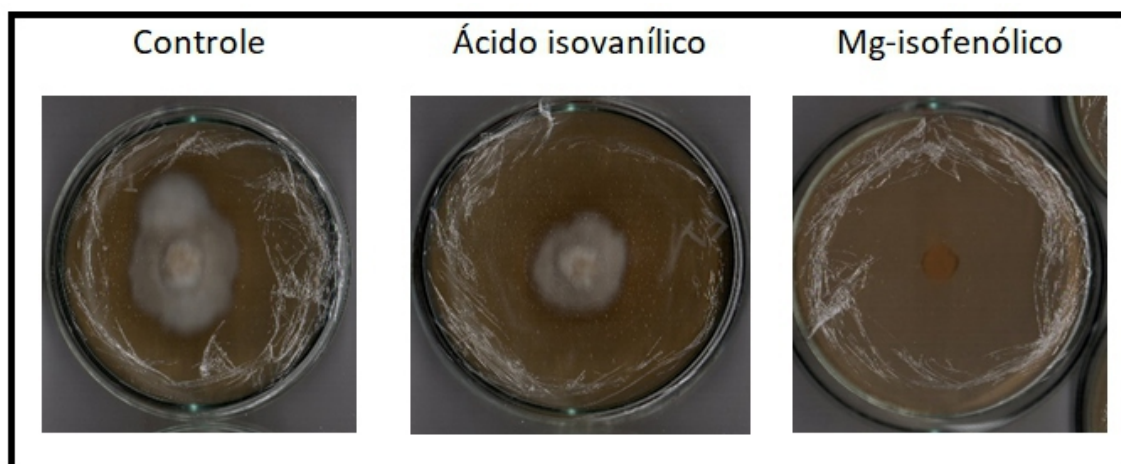


FIG. 14

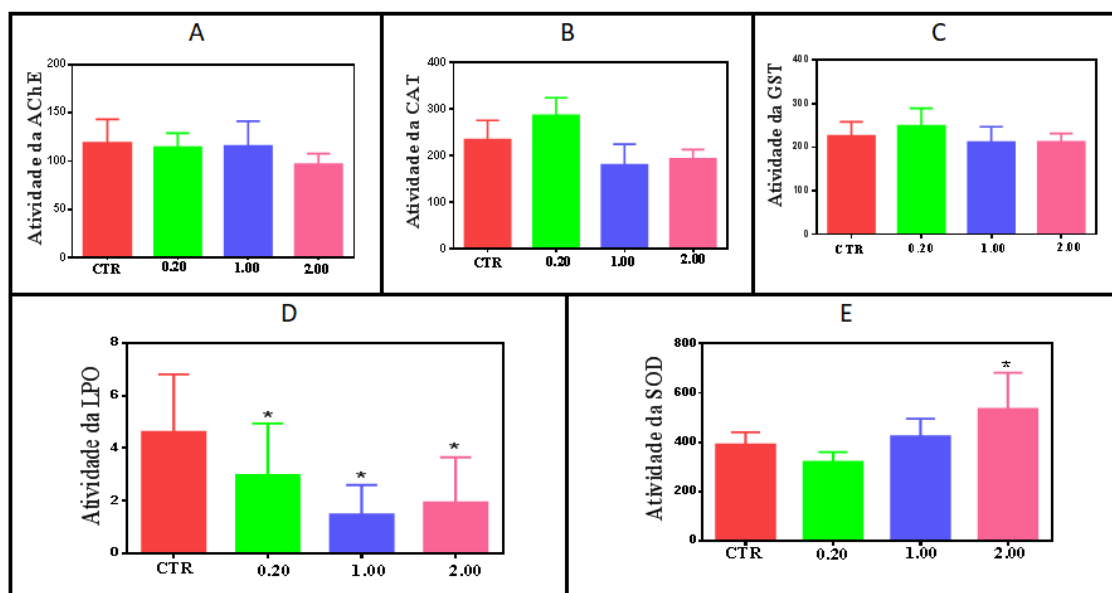


FIG. 15

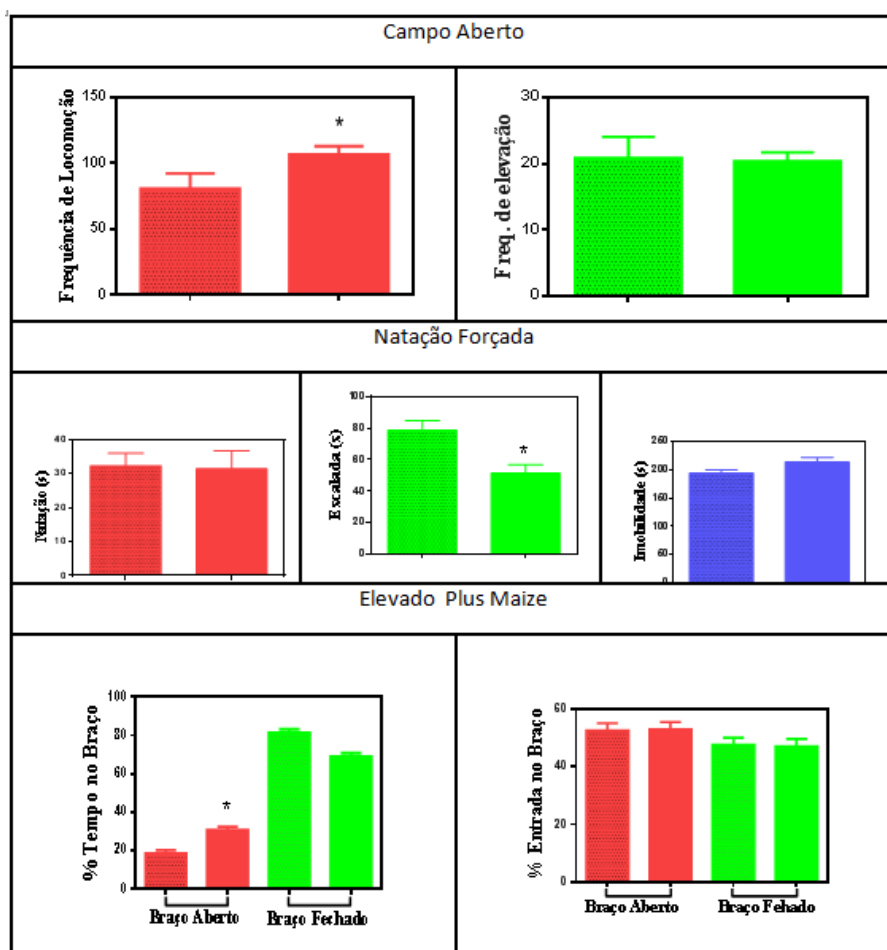
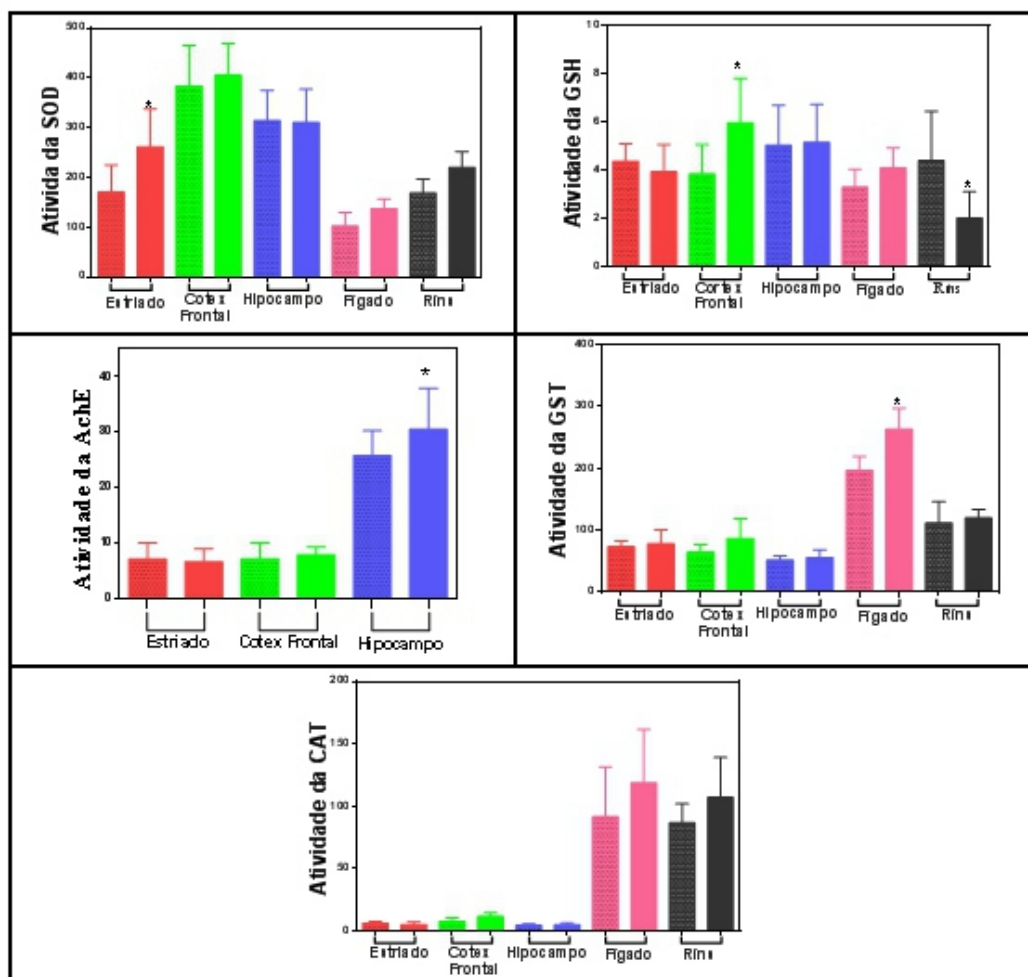


FIG. 16



RESUMO

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPLEXO Mg-ISOFENÓLICO PARA CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS E PRODUTO OBTIDO.

Refere-se ao processo de obtenção (Fig.1) de um de complexo de baixa toxicidade com potencial pesticida e fungicida para controle de pragas, obtido a partir do processamento do ácido isovanílico (4) e do íon metálico Mg(II), na forma de acetato de magnésio (2), que ao formarem um complexo metálico orgânico (11), possuem a capacidade de atuar diretamente no controle e/ou combate de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote, ao ser adicionado a iscas atrativas. O complexo metálico orgânico (11), com potencial inseticida proposto apresenta excelente estabilidade em solução, estabilidade térmica, hidrossolubilidade para diferentes valores de pH (3-10) e alto rendimento sintético.