



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1105786-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1105786-6

(22) Data do Depósito: 07/11/2011

(43) Data da Publicação do Pedido: 04/08/2015

(51) Classificação Internacional: A01N 65/08

(54) Título: COMPOSIÇÕES FITOPRAGUICIDAS SINÉRGICAS A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE EXTRATOS DE ANNONACEAE E PIPERACEAE E PROCESSOS DE UTILIZAÇÃO CONTRA AEDES AEGYPTI E OUTRAS PRAGAS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 695, Centro, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-310; UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75101873000190. Endereço: Avenida Sete de Setembro 3165, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80230901

(72) Inventor: JOSÉ DOMINGOS FONTANA; ADELIA GRZYBOWSKI; MARCELA TIBONI; MAURÍCIO PASSOS; MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA; RODRIGO FAITTA CHITOLINA

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 07/11/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 24/04/2018

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



“COMPOSIÇÕES FITOPRAGUICIDAS SINÉRGICAS A PARTIR DA
COMBINAÇÃO DE EXTRATOS DE ANNONACEAE E PIPERACEAE
E PROCESSOS DE UTILIZAÇÃO CONTRA *Aedes aegypti* E OUTRAS
PRAGAS”

5 No que tange à apresentação do presente pedido de invenção, a
mesma se refere à formulação de composições fitopraguicidas sinérgicas a
partir de extratos etanólicos ou com outros solventes oriundos das espécies
botânicas da família Annonaceae e Piperaceae e ao processo de utilização
destas combinações sinérgicas como alternativa à utilização isolada de
10 inseticidas obtidos sinteticamente, tais como organofosforados, danosos ao
meio ambiente, contra o vetor transmissor das febres da dengue e amarela,
Aedes aegypti, *Aedes albopictus* e outras pragas.

 No que diz respeito à descrição do estado da técnica, uma vez que os
mosquitos são importantes vetores na transmissão de doenças, dentre eles o
15 *Aedes aegypti*, que é sabidamente conhecido como transmissor da dengue e
da febre amarela, tanto no Brasil quanto em outros países de clima tropical,
apesar de *Aedes aegypti* ser originário do Egito, ele espalhou-se pelas
regiões tropicais e sub-tropicais do planeta desde o século XVI, período das
Grandes Navegações. No Brasil, os primeiros relatos de dengue datam do
20 final do século XIX, iniciando assim um grande problema de Saúde Pública
no País. Neste contexto, o pesquisador Antonio Gonçalves Peryassú do
atual Instituto Oswaldo Cruz, IOC, fez importantes descobertas sobre o
ciclo de vida, hábitos e a biologia do *Aedes aegypti*, dados fundamentais
que levaram à erradicação do mosquito em território nacional nas décadas
25 seguintes. Porém, devido a outros países da América do Sul e Central não
conseguirem completa erradicação, e também por um relaxamento das

medidas de controle no Brasil, houve uma re-infestação nos anos 60, com a volta de registros de febre da dengue no País (CONSOLI, R.e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Ed. Fiocruz, 1994; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 1: 43-54, 2004; FIOCRUZ. Dengue. Acesso em 14 de abril de 2011, em <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>; URDANETA-MARQUEZ, L.e FAILLOUX, A.-B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 2: 253-261, 2011). Logo, um combate mais eficaz do mosquito da dengue é imperativo no Brasil e, portanto, também a busca de alternativas de controle e letalidade deste vetor que se caracterize por originalidade, inovação e potencial aderência o interesse industrial, o que é exatamente o objeto deste pedido de patente.

A dengue é uma doença viral, que tem como agente causador um arbovírus, com quatro diferentes sorotipos, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A transmissão ocorre quando a fêmea da espécie vetora se contamina ao picar um indivíduo infectado na fase virêmica da doença. O vírus multiplica-se no intestino médio do mosquito e infecta outros tecidos, chegando finalmente às glândulas salivares. Uma vez infectado, após um período de 10 a 14 dias, o *Aedes aegypti* é capaz de transmitir a doença enquanto viver, aproximadamente 30 dias. Não existe transmissão da doença através do contato entre indivíduos doentes e pessoas saudáveis (BRASIL. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de

normas técnicas. Brasília, Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001; FIOCRUZ. Dengue. Acesso em 14 de abril de 2011, em <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>; OCAMPO, C.B., et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica* 118(1): 37-44, 2011; GUZMÁN, M.G.e KOURÍ, G. Dengue: un update. *Lancet Infectious Diseases* 2: 33-42, 2002).

A febre amarela é outra doença viral febril aguda de curta duração encontrada em países da África e das Américas Central e do Sul (BRASIL. Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela. Brasília, Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1999; MASSAD, E., et al. The risk of yellow fever in a dengue-infested area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 4: 370-374, 2001). Assim como na dengue, a transmissão se faz através da picada de mosquitos. A febre amarela já foi um dos maiores problemas da saúde pública nacional, porém, devido a uma campanha iniciada em 1916 pela Fundação Rockefeller que levou a erradicação do principal mosquito vetor e também pelo desenvolvimento da vacina, desde então são poucos os casos relatos da doença (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 1: 43-54, 2004).

O mosquito *Aedes aegypti* espalhou-se rapidamente por todo País e, com a cocirculação dos diferentes sorotipos, ocorre o favorecimento dos casos de síndrome do choque da dengue, conhecida como febre hemorrágica, sendo esta muito mais grave. Em janeiro de 2011 o Brasil confirmou a re-introdução do sorotipo DEN-4, confirmando a cocirculação

dos quatro diferentes sorotipos no país (FIOCRUZ. Dengue 4: IOC detecta
primeiros casos no RJ. Acesso em 14 de abril de 2011, em
<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1122&sid=3>)
. O *Aedes aegypti* é um mosquito doméstico de hábitos oportunistas que
5 vive dentro e ao redor dos domicílios ou em locais com bastante
movimentação de pessoas, como estabelecimentos comerciais, escolas,
igrejas e outros (JANSEN, C.C.e BEEBE, N.W. The dengue vector *Aedes*
aegypti: what comes next. *Microbes and Infection* 12, 4: 272-279, 2010).
Na última década houve um aumento do número de casos da dengue em
10 função de diversos fatores, sendo um deles o rápido desenvolvimento de
resistência dos mosquitos aos inseticidas de síntese química. Logo, a busca
de fitopraguicidas naturais, com os quais as diversas formas anatômica-
morfológicas do mosquito não tenham tido qualquer forma de contato ou
mesmo que a mesma seja mínima e superficial, é uma estratégia fortemente
15 válida como nova forma válida de combate ao mosquito seja como
procedimento preventivo isolado seja como mais uma etapa dentro de uma
política sanitária do tipo manejo epidemiológico integrado e este pedido de
patente de invenção se apóia nesta premissa válida.

A dengue apresenta um ciclo epidemiológico principalmente urbano e
20 a capacidade de transmissão é maior em áreas mais populosas, nos quais os
humanos são os hospedeiros e o mosquito é o vetor. Portanto, uma das
formas de controle da disseminação das doenças relacionadas a este
mosquito está relacionada ao controle dos *criadouros* do mosquito,
impedindo que os ovos cheguem à fase adulta. O incentivo por meio das
25 campanhas é reduzir o número de focos onde as fêmeas adultas depositem
seus ovos, locais com água parada, reduzindo assim a população mosquitos

adultos (BRASIL. Dengue. instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. Brasília, Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001). Como o ciclo morfogenético do mosquito transita de ovo para larvas de quatro progressivos instares, depois para pupa e finalmente para inseto adulto, o ataque fitolarvicida ressalta como estrategicamente mais apropriado, seja pela duração das quatro etapas ou instares larvais seja por sua ocorrência sempre em ambiente aquático, onde a biodisponibilização dos princípios ativos, fruto do contato permanente com a larva, é maior. Esta estratégia está fielmente contemplada neste pedido de invenção.

Também como exemplo de prevenção às picadas dos mosquitos, entre eles o *Aedes aegypti* e no caso a fêmea carente de sangue humano ou animal, os repelentes são usados preventivamente, pois tem o objetivo de minimizar o contato destes mosquitos adultos ou volantes com os seres humanos. Na grande maioria são compostos como o DEET ou CAS- 134-62-3 - N, N-dietil-meta-metilbenzamida ou benzamida. Uma patente de invenção propõe a utilização do DEET como agente repelente de insetos à base de soluções alcoólicas conjuntamente com uma substância auxiliar, no caso glicerina, que prolonga a duração da eficácia do repelente (RUNKEL, F. Agente repelente de insetos. PI 9809522-6, 1998). Existem patentes depositadas que se referem de outros componentes repelentes para insetos, como o uso da dihidronapetalactona, um componente minoritário do óleo essencial de erva de gatos (*Nepeta* spp), que pode ser obtida sinteticamente através da hidrogenação da nepetalactona, o componente majoritário dos óleos essenciais de erva dos gatos (SCIALDONE, M. Composição repelente de insetos. PI 0516881-3, 2005). Também existem patentes que

tratam da utilização de repelentes nas mais diversas formulações, como em sabonetes ou barras dermatológicas, espumas de banho, condicionadores de cabelo, xampus em barra, hidratantes corporais, lenços umedecidos, adesivos pessoais, filtros solares, dentre outros (MARIA, E.J. Composição e barra dermatológica repelente de insetos. PI 0900780-6A2, 2009; YAMAUCHI, R.H. Hidratante corporal em barra repelente de insetos- PI 0805097-0A2, Shampoo em barra repelente de insetos – PI 0803945-3A2, Condicionador de cabelo repelente de insetos- PI 0803941-0A2, Espuma de banho repelente de insetos – PI 0803939-9A2, 2008; EMMRICH, R.R., et al. Adesivo repelente de insetos usável. PI 0608198-3A2, 2006; UICK, H.J. CIA., D. Filtro solar repelente de insetos, PI 9709965-1, 1997). Ainda na estratégia de repelência, ainda são utilizados aparelhos repelentes de insetos, que são destinados à volatilização de compostos odoríferos que afastam os mosquitos volantes. Existe neste sentido um modelo de utilidade que é descrito como conjunto elétrico de aquecimento onde ocorre o acoplamento do frasco refil contendo o produto químico/natural repelente a ser emanado ao ambiente através de evaporação (MARTINEZ, J.D. Aparelho repelente de insetos, UM 8400947-0, 2004) e também um repelente eletrônico de mosquitos que reproduz sons de mosquito macho, afugentando a fêmea então já fase de ovideposição, evitando assim as picadas (CASSETTARI, R. Repelente eletrônico de mosquitos, UM 7500550-6, 1995).

Também existem estratégias para controle do principal vetor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti* que são baseadas na utilização de inseticidas de síntese química tais como organofosforados - Temefós e piretróides – Cipermetrina, para reduzir a densidade de adultos durante

epidemias e tratamento de *criadouros*, caso do Temefós. Existe um pedido de patente que trata da composição inseticida por meio da combinação de um composto de cloronicotinila com um composto organofosforado (SHROFF, J.R. e JADHAV, P.M. Composição inseticida sinérgica e processo de preparação de composição inseticida sinérgica, PI 0513112-0, 2005).

No que concerne à apresentação dos problemas existentes, a estratégia de controle do vetor apenas com a eliminação dos focos do mosquito não é totalmente eficaz, pois não há uma adesão da população como um todo. Além disso, a falta de serviços urbanos, a proliferação de favelas e assentamentos subdesenvolvidos dentro e em torno das cidades tem dificultado o controle da dengue, e o *Aedes aegypti* tornou-se endêmico em várias partes do país. Dest'arte, há espaço para a adoção de novas estratégias de controle e de letalidade para o mosquito e este pedido de patente responde a este mister.

Já a utilização de repelentes contendo DEET, apresenta como desvantagem o fato de além de reações tóxico-alérgicas ainda causar danos materiais como em tecidos sintéticos e superfícies tingidas (GILLIJ, Y.G., GLEISER, R.M. e ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99, 7: 2507-2515, 2008). Além do foco estar baseado somente no mosquito adulto ou volante, ou seja, quando o vetor já está potencialmente apto a transmitir a doença.

A outra estratégia que está baseada na utilização de inseticidas químicos, como organofosforados e piretróides, não está sendo totalmente eficaz devido a resistência desenvolvida por algumas cepas do mosquito, o

que está favorecendo o aumento gradativo na quantidade de insetos adultos e conseqüentemente o aumento no número de casos de dengue no País (BROGDON, W. e MCALLISTER, J. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* 4, 4, 1998.; MELO-SANTOS, M.A.V., VARJAL-MELO, J.J.M., ARAÚJO, A.P., et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica* 113, 2: 180-189, 2010). Em estudo realizado por (LUNA, J.E.D., MARTINS, M.F., ANJOS, A.F.D., et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Revista Saúde Pública*, 38, 6. 2004), no Estado do Paraná, os mosquitos foram submetidos a dois inseticidas químicos, Temefós e Cipermetrina. Os resultados mostraram que o controle com Temefós, um organofosforado, ainda é viável, porém os mosquitos já apresentaram resistência a Cipermetrina, um piretróide sintético. O estudo sugere ainda a imediata substituição destes inseticidas por outros produtos de origem química ou biológica. Sendo assim, o uso de inseticidas químicos não é mais considerado uma boa forma de eliminar os mosquitos, já que estes estão cada vez mais resistentes a essas substâncias e assim gerando descendentes também resistentes, e conseqüentemente uma população predominantemente imune. Fora isso, o uso deste tipo inseticida causa sérios danos à natureza (BRASIL. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001).

A imensa flora brasileira pode ser explorada para o desenvolvimento de larvicidas eficazes, sem causar efeitos maléficos ao meio ambiente causados pelas substâncias sintéticas antes exemplificadas (LUNA, J.D.,

1 DOS SANTOS, A.F., DE LIMA, M.R.F., et al. A study of the larvicidal
and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil.
2 *Journal of Ethnopharmacology* 97, 2: 199-206, 2005), pois a utilização de
extratos vegetais que possuem bioativos ou metabólitos secundários com
5 efeitos tóxicos para insetos pode ser uma alternativa eficaz. Neste sentido,
óleos essenciais e extratos de plantas são potenciais fontes de compostos
com atividade tóxica para o controle dos mosquitos vetores da dengue e
febre amarela, além de muitos ainda serem potencialmente repelentes
(GILLIJ, Y.G., GLEISER, R.M. e ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent
10 activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina.
Bioresource Technology 99, 7: 2507-2515, 2008).

No enfoque mais amplo de solução e em linhas gerais, sendo o
objetivo da presente invenção a utilização de maneira combinada dos
extratos de duas ou mais plantas como fitopraguicidas potencializados para
15 a letalidade do mosquito, ele representa uma alternativa inovadora no
combate ao *Aedes aegypti*, pois leva a um efeito larvicida maior, já que as
plantas possuem metabólitos secundários com mecanismos bioquímicos de
ação completamente diferentes e então atuantes negativa e
cumulativamente no ciclo morfogênético do inseto, *per se* de maneira
20 satisfatória e ainda mais eficazmente se combinadas, ou seja, contemplando
sinergismo ou superaditividade de ação, como postulado e comprovado
escopo deste pedido de patente. Para tanto, o pedido presente de patente
concilia fontes botânicas larvicidas de baixo custo – sementes de graviola,
Annona muricata e frutos de pimenta-do-reino, *Piper nigrum*, método de
25 extração básico baseado no solvente orgânico mais barato no País – o
etanol -, e, mais importantemente, sinergismo ou superaditividade quando

da combinação de diferentes proporções dos dois extratos crus mesmo sem
quaisquer gastos adicionais de purificação dos bioativos fitolarvicidas. Não
obstante as sementes e frutos serem as fontes eletivas de base para os fins
deste pedido de invenção seja em função do volume disponível a cada safra
5 e, mais importantemente, do ponto de vista de equilíbrio e proteção
ambiental, outras partes botânicas dos vegetais apontados igualmente se
prestam à utilização dos princípios bioativos fitopraguicidas, sendo aquelas
folhas, galhos, caules, cascas e raízes. Ademais, o mesmo se caracteriza
como inovador, pois pode substituir, vantajosamente, outras alternativas em
10 uso e menos amigáveis à população e meio ambiente, além de claro
potencial para ser explorado como atividade industrial. Há ainda que se
salientar que a combinação de fitoprincípios ativos com diferentes
mecanismos tóxicos de ação para insetos é uma estratégia de maior
originalidade que visa otimizar resultados. Diferentemente de exemplos
15 anteriores – combinação de dois inseticidas sintéticos e pelo menos um
deles, daninho ao meio ambiente – o presente pedido de patente de
invenção trata da combinação de fitolarvicidas naturais e visando uma
potencialização de resultados, ou seja, o sinergismo ou superaditividade.

No que se refere à descrição detalhada do invento, o mesmo está
20 baseado na seleção de espécies botânicas, nativas ou exóticas bem
adaptadas no Brasil, potencialmente ativas devido à presença de
metabólitos secundários importantes e com alto potencial larvicida para o
vetor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti* e seu similar *Aedes*
albopictus. Dentre as mais diversas plantas utilizadas pela população, tanto
25 com intuito curativo quanto praguicida, *Annona muricata* L., Annonaceae,
conhecida como graviola, é uma fonte de acetogeninas. Estes compostos

são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, 32 ou 34 carbonos, combinados com o 2-propanol, que é incorporado na forma de uma γ -lactona insaturada. Frequentemente ocorre à inserção de um a três anéis tetrahydrofurano, THF, no centro da cadeia carbônica, havendo ainda duplas ligações e um variado grau de átomos de oxigênio, sob a forma de hidroxilas e menos frequentemente carboxilas, cetonas, epóxidos (GU, Z.M., et al. Annonaceous acetogenins - potent mitochondrial inhibitors with diverse applications. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. AL., J.T.A.E. New York, Plenum Press: 249-310, 1995). As acetogeninas agem como pesticidas através de um mecanismo de ação que bloqueia a geração de energia mitocondrial do complexo I da cadeia respiratória ou liquidamente, inibição da biossíntese da moeda energética do organismo, ATP – Adenosina TriFosfato. Outra espécie fitolarvicida selecionada foi *Piper nigrum* L., Piperaceae, que é comumente conhecida como pimenta-do-reino, a qual contém uma série de amidas com potencial inseticida, que atuam no bloqueio enzimático do complexo citocromo P450, como a piperina, piperida, guineensina, pelitorina, dentre outras (SIDDIQUI, B.S., GULZAR, T., BEGUM, S., et al. Two new insecticidal amides and a new alcoholic amide from *Piper nigrum* Linn. *Helvetica Chimica Acta* 86, 8: 2760-2767, 2003; SIDDIQUI, B.S., GULZAR, T., BEGUM, S., et al. Two new insecticidal amide dimers from fruits of *Piper nigrum* Linn. *Helvetica Chimica Acta* 87, 3: 660-666, 2004; PARK, K., LEE, S.-G., SHIN, S.-C., et al. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7: 1866-1870, 2002). *Melia azedarach* L., Meliaceae, conhecida como Santa Bárbara ou cinamomo, produz tetraterpenóides

chamados de limonoides. Estes limonoides inibem a síntese de quitina e, portanto, bloqueiam o desenvolvimento e renovação do exoesqueleto do inseto no seu ciclo morfogênético (KUMAR, C.S.S.R., SRINIVAS, M. e YAKKUNDI, S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 43, 2: 451-455, 1996). De fato o proponente principal deste pedido e seus parceiros de patente comprovaram pessoal e documentadamente a eficácia dos limonóides de duas distintas Meliaceae, quais sejam *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* quanto à letalidade para as larvas de *Aedes aegypti* (WANDSCHEER, C.B., DUQUE, J.E., SILVA, M.A.N.D., FONTANA, J.D. et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44: 829-835, 2004).

Os extratos etanólicos destas espécies botânicas foram cada qual obtidos de 250 g das partes botânicas previamente trituradas e colocadas em contato com cinco volumes do solvente etanol até fervura incipiente a 78 - 79 °C e imediatamente filtrados a vácuo com auxílio de Kitassato e funil de Buchner com papel de filtro duplo. Os resíduos da filtração foram lavados com dois volumes adicionais de etanol quente. Os filtrados foram levados para o rotaevaporador da Laborota 4000; Heildolph, Germany) até a completa evaporação do solvente. O solvente etanol foi eleito por critério de economicidade e facilidade de obtenção no Brasil, porém este pedido de patente também contempla a utilização de outros solventes extratores para a obtenção dos extratos tais como hexano, éter de petróleo, tolueno, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, acetona, acetonitrila, butanol, propanol, isopropanol, metanol ou a mistura deles, com ou sem a presença de água como co-solvente em pH neutro, ácido ou

básico. O método modelo de extração anterior também pode ser executado por alternativas tais como infusão, decocção, extração em aparelho de Soxhlet, refluxo, turbolização, maceração, maceração dinâmica, arraste de vapor, percolação, extração assistida por microondas e ultrassom, extração acelerada com solventes, extração com fluídos super críticos. A título de esclarecimento, os rendimentos de extratos brutos expressos em g/100g de planta seca triturada, bem como as partes botânicas das espécies utilizadas neste pedido de patente estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS

Espécie	Parte botânica utilizada	Rendimento do extrato bruto (g/100 g de planta seca)
<i>Annona muricata</i>	semente	20,4
<i>Melia azedarach</i>	semente	8,4
<i>Piper nigrum</i>	fruto	8,6

As soluções estoques de todos os extratos brutos foram normalizadas para 50 mg/mL em etanol e convenientemente diluídos para a utilização nos bioensaios. Todos os extratos etanólicos brutos foram submetidos previamente ao teste de letalidade em náuplios de *Artemia salina* (MEYER, B.N.F., N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45, 1,: 31-34, 1982). Os náuplios de *Artemia salina* foram obtidos a partir de 100 mg de cistos, Maramar Aquacultura Ltda, que foram colocados em contato com 100 mL de água do mar artificial, NaCl 26,3 g; KCl 0,75 g; CaCl₂.2H₂O 1,47 g; MgCl₂.6H₂O 5,10 g; NaBr 0,08 g; NaHCO₃ 0,21 g; MgSO₄.7H₂O 6,20 g; H₂O destilada q.s.p 1 L, e oxigenação com porcelana porosa adaptada em uma bomba, luz lateral, durante 24-36 h. Cada ensaio de toxicidade foi

realizada em quadruplicata e repetido três vezes para cada curva dose-resposta, em seis concentrações progressivas para cada extrato. Para controle negativo foram utilizados etanol, 2 % v/v, e como controle positivo foi utilizada a dose diagnóstica, $DD = 2 \times CL_{99}$ do timol no valor de 92,54 $\mu\text{g/mL}$, previamente determinada. A contagem da taxa de mortalidade foi realizada após a exposição de 10 náuplios em 2 mL de água do mar artificial contendo extrato, após 24 h de exposição. Para as determinações das concentrações letais foram utilizadas as análises probit (FINNEY, D.J. Probit Analysis. New Delhi: Ed. S. Chand & Company Ltda, 1981), utilizando o *software* SPSS® Statistic Versão 17.0.0.

Através do teste preliminar com *Artemia salina* realizado com os extratos brutos, as espécies apresentaram as seguintes atividades:

a) *Annona muricata* demonstrou alta atividade com valores de CL_{50} de 10,20 (7,52 – 13,77) $\mu\text{g/mL}$; b) *Piper nigrum* também com alta atividade com valor de CL_{50} de 2,78 (2,31 – 3,61) $\mu\text{g/mL}$; c) *Melia azedarach* demonstrou atividade intermediária com valores de CL_{50} de 71,90 (55,44 – 92,89) $\mu\text{g/mL}$.

Portanto, para o escopo deste pedido de patente, as espécies com maior atividade, ou seja, *Annona muricata* e *Piper nigrum*, foram preferencialmente selecionadas para a realização dos experimentos com *Aedes aegypti*, sobretudo em combinações, uma vez que foco do pedido de patente é a utilização dos extratos etanólicos em conjunto para obtenção melhorada do efeito na mortalidade das larvas, ou seja, um efeito sinérgico entre os extratos. Porém como a espécie *Melia azedarach* já foi previa e positivamente avaliada contra larvas de *Aedes aegypti* em nosso laboratório (WANDSCHEER, C.B., DUQUE, J.E., SILVA, M.A.N.D., FONTANA,

J.D. et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of

Melia azedarach and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44: 829-835, 2004), este pedido de patente também contempla a adição desta espécie na combinação binária dos extratos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* ou mesmo delas em forma individual desta forma se adotando então outras formulações binárias, ternárias e assim por diante. Esta estratégia ampliada de outras combinações binárias, ternárias e mesmo quaternárias, obviamente pode envolver outros extratos vegetais que não os citados desde que os mesmos contenham os mesmos ou similares princípios bioativos antimosquito *Aedes aegypti* até em visões estratégicas mais amplas do que o efeito fitolarvicida, tais como a inibição da eclosão dos ovos de *Aedes aegypti*, da diferenciação das pupas e da capacidade volante de insetos adultos, sendo tais compostos e substâncias de origem natural e sintética da classe dos piretróides, organofosforados e mesmo agentes de controle biológico tais como células inteiras de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Para comprovação do potencial larvicida, foram realizados bioensaios com *Aedes aegypti* a partir da cepa “Rockefeller”, que foi cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, originalmente obtida do CDC, *Center of Disease Control* – Porto Rico. Detalhamos aqui neste relatório descritivo todo o procedimento de preparação, uso e resultados obtidos com o fitopraguicidas de modo a permitir a reproduzibilidade de ação por parte de quaisquer outros interessados. A colônia do mosquito foi mantida no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária no Depto de Zoologia – UFPR a uma temperatura de 25 °C e umidade relativa de 80 %.

As fêmeas adultas foram alimentadas com sangue de camundongo

para estimular a oviposição em papel filtro. Os ovos adsorvidos em papel
filtro foram colocados em bandejas plásticas com água mineral, Ouro
Fino®, e dieta artificial para peixe, Tetramin®. As bandejas foram
colocadas em estufa do tipo B.O.D com temperatura de 28 °C e fotoperíodo
5 de 12 h, até as larvas atingirem o terceiro ínstar em aproximadamente
cinco dias. Os bioensaios foram realizados conforme a metodologia
recomendada pela Organização Mundial da Saúde (WHO. Guidelines for
laboratory and field testing of mosquito larvicides, 2005), utilizando seis
diferentes concentrações de cada extrato. Outra alternativa de
10 composição dos fitopraguicidas tange o emprego dos extratos etanólicos de
Annona muricata e de *Piper nigrum*, seja a partir das sementes e frutos ou
de outras partes botânicas de cada planta, aqui propostos em combinação
binária larvicida seria a já referida a inibição da eclosão dos ovos do
mosquito *Aedes aegypti*, da passagem morfogênica de pupa a inseto
15 adulto e mesmo contra insetos adultos. Adicionalmente, as formulações
lato sensu aqui propostas poderão ser utilizadas, também, no combate de
outras pragas artrópodos tais como aquelas pertinentes à classe *Insecta* e
Aracnidae, a mero título de exemplificações mas sem qualquer conotação
de excludência.

20 As soluções estoque foram normalizadas em etanol e adicionadas na
quantidade de 1 mL em potes plásticos com capacidade de 320 mL
contendo água mineral q.s.p 150 mL. Apesar de os extratos terem sido
preparados em soluções preferencialmente etanólicas, este pedido de
patente não exclui a composição em outras formas líquidas, sólidas, semi-
25 sólidas ou aerossóis e mesmo a partir de outros solventes. Este pedido de
patente trata preferencialmente da utilização das composições

fitopragueidas em corpos de água, porém também trata da utilização por outros ambientes tais quais atmosfera e solo. Em cada pote foram adicionadas 20 larvas em terceiro ínstar, sendo que para cada concentração foram realizadas quatro replicatas. Os potes foram levados a estufa do tipo B.O.D por 24h com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Como controles negativos foram utilizados potes contendo somente água ou uma solução aquosa etanólica, 0,66 % v/v, representando o veículo da formulação. Como controle positivo foi utilizada uma solução aquosa de Temefós, 0,006 µg/mL, correspondente a dose diagnóstica para a cepa Rockfeller (LIMA, J.B.P., DA-CUNHA, M.P., DA SILVA JÚNIOR, R.C., et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 3: 329-333, 2003). Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento após o toque com pipeta Pasteur. Para as determinações das concentrações letais foram utilizadas as análises probit, calculadas utilizando o *software* SPSS® Statistic Versão 17.0.0.

Foram utilizadas como amostras de referência para os bioensaios e para análise cromatográfica que endossam este pedido de patente:

- 20 a) *Annona muricata*: Como não existem padrões de acetogeninas disponíveis comercialmente, *e.g.*, annonacina, anteriormente no LQBB-UFPR foi obtida uma amostra bruta de acetogeninas polares ou pAG de sementes de *Annona muricata* trituradas utilizando três volumes de acetonitrila em agitador-incubador Gyrotory Water Bath Shaker – G76 para 25 uma extração durante 12 h, com temperatura de 28 °C. Este extrato foi purificado com carvão ativo e colunas de sílica gel (FONTANA, J.D.,

LANCAS, F.M., PASSOS, M., et al. Selective polarity- and adsorption-guided extraction purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70-2: 67-76, 1998). A análise da Cromatografia Líquida
5 acoplada com Espectrômetro de Massa para íon negativo apresentou o pico principal esperado de 594,9 para annonacina e também os fragmentos do espectro massa-massa resultaram em picos-chave de 483,4 e 197,2 (ALLEGRAND, J., TOUBOUL, D., SCHMITZ-AFONSO, I., et al. Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high
10 and low collision energy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 3602-3608, 2010). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Agilent 1100, bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager acoplado a um
15 triplo quadrupolo Applied Biosystems modelo API 3200 equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus e fonte de ionização por eletrospray ESI. Foi utilizada como fase móvel metanol: água acidificada 0,1 % com ácido fórmico, 95:5, no modo isocrático, com fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, em uma coluna C_{18} Waters® de 7,5 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 3,5 μm e a amostra foi previamente filtrada em filtro de seringa
20 PVDF de 11 mm, 0.45 μm , Millipore Millex antes da injeção; b) *Piper nigrum*: padrão de piperina com 97% de pureza adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

Comparando as bioatividades do extrato etanólicos bruto de *Annona muricata* e a amostra pAG em *Aedes aegypti*, os valores de CL_{50} em
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram de 93,48 e 0,65, respectivamente. O valor da atividade melhora então 143 vezes para a amostra pAG devido ao enriquecimento em

acetogeninas. Anteriormente já foram descritas atividades contra larvas de *Aedes aegypti* com CL₅₀ de 60 e 900 µg/mL para extratos de sementes de *Annona muricata* utilizando larvas de 4º instar de *Aedes aegypti* (BOBADILLA, M., ZAVALA, F., SISNIEGAS, M., et al. Larvicidal evaluation of aqueous suspensions of *Annona muricata* Linnaeus against *Aedes aegypti* Linnaeus. Revista Peruana de Biología 12, 1: 145-152, 2005; HENAO, G.J.P., PAJÓN, C.M.G. e TORRES, J.M.C. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* vector del dengue en Colombia. Revista CES MEDICINA 21, 1: 47-54, 2007). Com o extrato previamente desengordurado com hexano, a CL₅₀ encontrada foi de 74,68 µg/mL para larvas de 3º e 4º instar (MORALES, C.A., GONZÁLEZ, R. e ARAGÓN, R. Evaluación de la actividad larvica de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*. Revista Colombiana de Entomología 30, 2: 187-192, 2004). Assim, o resultado por nós encontrado, CL₅₀ de 93,48 µg/mL, está próximo do que já está descrito na literatura. O eficiente mecanismo de ação das acetogeninas em vários modelos celulares e tissulares é explicado por uma inibição específica da respiração mitocondrial no complexo I. Assim, a inibição da NADH: Ubiquinona oxireductase bloqueia a fosforilação oxidativa mitocondrial, ou seja, o bloqueio de transporte de elétrons e não permite a conversão de ADP e fosfato inorgânico em ATP, Adenosina TriFosfato, a qual é principal coenzima e moeda energética das células (CARMEN ZAFRA-POLO, M., FIGADÈRE, B., GALLARDO, T., et al. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry* 48, 7: 1087-1117, 1998). Como os extratos de *Annona muricata* foram obtidos a partir das sementes que são sabidamente

fontes de acetogeninas, este pedido de patente também contempla a obtenção dos extratos a partir de quaisquer outras partes botânicas enriquecidas nestas acetogeninas tais como folhas, caule, casca do caule, raízes, galhos e casca do fruto e além disto, também a partir de outros gêneros e espécies da família Annonaceae.

Relacionando as bioatividades larvicidas do extrato etanólico bruto de *Piper nigrum* e o padrão de piperina, os valores de CL₅₀ em µg/mL encontrados foram de 1,84 e 6,65. Como pode ser observado nas ilustrações apenas a este pedido de patente, existe uma heterogeneidade no extrato bruto da pimenta-do-reino, isto é, a piperina juntamente com outros componentes menores, foram mais ativos, ou seja, 3,6 vezes do que o padrão de piperina isoladamente. Um estudo anterior demonstrou a presença de outros compostos bioativos, como as isobutilamidas retrofractamida A, piperida, guineensina e pelitorina (PARK, K., LEE, S.-G., SHIN, S.-C., et al. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7: 1866-1870, 2002). O extrato etanólico bruto dos frutos verdes de *Piper nigrum* já havia sido avaliado contra larvas de 3º instar de *Aedes aegypti* resistentes ao piretróide cipermetrina e apresentou um valor de CL₅₀ de 0,98 µg/mL (SIMAS, N.K., LIMA, E.D.C., KUSTER, R.M., et al. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40, 4: 405-407, 2007). Já para os extratos etanólicos de três outras espécies de Piperaceae avaliados contra larvas de 4º instar, as CL₅₀ encontradas foram maiores como segue: *Piper longum* 2,23; *Piper ribesoides* 8,13 e *Piper sarmentosum* 4,06 µg/mL (CHAITHONG, U.,

CHOOCHOTE, W., KAMSUK, K., et al. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti*. *Journal of Vector Ecology* 31, 1: 138-144, 2006). O mecanismo de ação das piperamidas, como a piperina e particularmente seu grupo químico MDP, metilenodioxifenil, é exercido ao nível da enzima citocromo P450 e o grupamento amida da piperamida é essencial para a atividade neurotóxica (SCOTT, I., JENSEN, H., PHILOGÈNE, B., et al. A review of Piper spp. , Piperaceae, phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7, 1: 65-75, 2008). Para a formulação deste pedido de patente, os extratos de *Piper nigrum* foram obtidos a partir dos frutos que são fontes de piperamidas e assemelhados, porém este pedido de patente também contempla a obtenção dos extratos outras partes botânicas enriquecidas nestes compostos e também outras fontes de piperamidas provenientes de outros gêneros e espécies botânicas da família Piperaceae. Este pedido de patente além das formulações das composições utilizando as fontes naturais de acetogeninas e piperamidas podem ser tanto individual quanto duplamente substituídas por iguais substâncias e mesmo congêneres derivadas da síntese química.

Com base nos resultados globais da bioatividade dos extratos etanólicos brutos individuais de *Annona muricata*, Am e de *Piper nigrum*, Pn, a combinação destes extratos resultou no aumento da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* de forma sinérgica, comprovado através de duas metodologias estatísticas: teste de independência e concentração total/isobolograma. Para a avaliação das combinações dos extratos brutos através do teste de independência foi necessário avaliá-los individualmente em diferentes concentrações e determinar a mortalidade esperada, M_{ESP} através da Equação 1, onde M_1 e M_2 são as porcentagens de mortalidade

observadas separadamente para *Annona muricata* e *Piper nigrum*, respectivamente (MORALES-RODRIGUEZ, A. e PECK, D.C. Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biological Control* 51, 1: 169-180, 2009; KOPPENHÖFER, A.M. e FUZY, E.M. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biological Control* 28,1: 47-59, 2003) Para a avaliação através do teste de independência foram realizadas seis combinações larvicidas para o modelo *Aedes aegypti*.

$$M_{ESP} = M_1 + M_2 \times \left(1 - \frac{M_1}{100}\right)$$

10 Equação 1 - DETERMINAÇÃO DA MORTALIDADE ESPERADA

A seguir, os resultados das mortalidades esperadas e mortalidades observadas, M_{OBS} nas combinações dos dois extratos, foram aplicados na Equação 2 para determinação do valor de χ^2 (BENZ, G. Synergism fo
15 micro-organisms and chemical insecticides. Microbial control of insects and mites. BURGES, H.D.e HUSSEY, N.W. New York, Academic Press: 327-355, 1971; MCVAY, J.R., GUDAUSKAS, R.T. e HARPER, J.D. Effects of *Bacillus thuringiensis* Nuclear-Polyhedrosis Virus Mixtures on *Trichoplusia ni* Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 29, 3: 367-372,
20 1977).

$$\chi^2 = \frac{(M_{OBS} - M_{ESP})^2}{M_{ESP}}$$

Equação 2 - DETERMINAÇÃO DO χ^2

Os resultados de χ^2 encontrados na equação foram comparados com
25 os valores tabelados para grau de liberdade igual a 1. Os valores de χ^2 encontrados maiores que o tabelado significam que os dois extratos apresentaram um efeito simples não-aditivo, que pode ser tanto antagonismo como sinergismo. No caso de um efeito simples não-aditivo,

foi preciso verificar a diferença entre $M_{OBS} - M_{ESP}$, resultando em um valor positivo ou negativo, para sinergismo ou antagonismo, respectivamente. Os resultados então das mortalidades esperadas e observadas, bem como os valores de χ^2 e os efeitos observados estão mostrados na Tabela 2.

5 Tabela 2 - COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata*, Am E *Piper nigrum*, Pn AVALIADAS ATRAVÉS DO TESTE χ^2 CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Combinação / Concentração em µg/mL	Concentração em µg/mL		Mortalidade (%)		χ^2	$M_{OBS} - M_{ESP}$	Efeito
	Am	Pn	M_{ESP}	M_{OBS}			
1	100	0,1	52,5 (51,5-53)	68,2 (63,65-72,75)	4,70	15,70	Sinergismo
2	62,5	0,75	37 (35,5-38,5)	76,68 (69,83-83,53)	42,55	39,68	Sinergismo
3	50	1	31,75 (29,44-34,86)	77,13 (70,81-83,45)	64,86	45,38	Sinergismo
4	37,5	1,25	30,25 (28,80-34,07)	74,62 (63,34-85,91)	65,09	44,37	Sinergismo
5	25	1,5	35,99 (35,03-37,71)	79,92 (68,21-91,64)	53,63	43,93	Sinergismo
6	75	1,5	57,82 (57,34-57,66)	96,28 (91,30-101,26)	25,58	38,46	Sinergismo

NOTA: n=80; efeito não-aditivo $\chi^2 > 3,8415$, $\alpha = 0,05$, GL=1

10 Analisando os dados do teste de independência, todas as combinações de extratos brutos de *Annona* e *Piper* não apresentaram efeito simples não-aditivo, pois os valores de χ^2 foram maiores do que o tabelado, sobretudo as combinações 3 e 4, as quais apresentaram valores na ordem de 65 e além disso, a diferença entre os valores de mortalidade observada e esperada foram todos positivos confirmando que existe sinergismo entre os
15 extratos brutos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* contra larvas de *Aedes aegypti*.

Com o intuito de refinar os resultados para verificar as melhores proporções larvicidas e a tendência de sinergismo das combinações dos extratos brutos de *Annona muricata*, Am, e *Piper nigrum*, Pn, foi utilizada

uma segunda metodologia estatística, denominada de isoblograma/
 concentração total, onde são realizadas combinações a partir das curvas
 dose-resposta para cada extrato avaliado individualmente. Foram realizadas
 cinco diferentes combinações em diferentes proporções a partir curvas
 5 dose-resposta de Am:Pn (10:90, 30:70, 50:50, 70:30 e 90:10) para o alvo-
 modelo, *Aedes aegypti*. Para medir os efeitos das combinações foram
 utilizados os valores de CL₅₀ em µg/mL, que é o parâmetro mais utilizado
 para medir a atividade de drogas/ extratos em bioensaios. Estas CL₅₀, em
 µg/mL, dos extratos etanólicos brutos de *Annona muricata* e *Piper nigrum*
 10 avaliados individualmente e em diferentes combinações estão mostradas na
 Tabela 3:

Tabela 3 - CL₅₀ (µg/mL) DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* (Am) E *Piper nigrum* (Pn) AVALIADOS SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA *Aedes aegypti*

15

Combinação (Am:Pn)	CL ₅₀ (µg/mL)	
	<i>Annona muricata</i>	<i>Piper nigrum</i>
Individual	93,48 (73,97-109,74)	1,84 (1,75-1,95)
A (10:90)	3,31 (1,41-6,50)	1,08 (1,03-1,13)
B (30:70)	4,55 (0,69-11,60)	0,72 (0,67-0,76)
C (50:50)	8,43 (0,58-23,42)	0,52 (0,48-0,56)
D (70:30)	13,28 (2,07-31,95)	0,32 (0,11-0,43)
E (90:10)	13,19 (1,62-30,12)	0,10 (0,09-0,10)

NOTA: n=80; valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança das CL₅₀ (µg/mL) com 95% de confiança estimado pelo método Probit.

Como é possível observar, os valores de CL₅₀ observados nas
 combinações também foram menores quando comparados aos extratos
 20 avaliados individualmente, um indicio de sinergismo. Ademais, o extrato
 bruto de *Piper nigrum* é mais ativo do que o de *Annona muricata* para o

modelo *Aedes aegypti* e esta relação, R, apresentou um valor elevado, ou seja, 50,78 (42,37-56,23). Estes valores de CL₅₀ foram aplicados em diferentes equações, para determinar numericamente os efeitos das interações, bem como revelar a tendência de interação entre os extratos nas diferentes combinações. As CL₅₀ dos extratos etanólicos brutos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* avaliados separadamente são descritas como z₁* e z₂*, respectivamente, enquanto as CL₅₀ em combinação são denominadas de z₁ e z₂. A partir destas CL₅₀ determinadas foi possível obter o valor numérico de A através da seguinte Equação 3:

Equação 3 - DETERMINAÇÃO DO VALOR NUMÉRICO DE A
O valor numérico de A ou log A representa o tipo de interação que ocorre entre duas drogas/extratos e pode ser classificado em:

- A = 1 ou log A = 0, aditividade
- A < 1 ou log A < 0, superaditividade ou sinergismo
- A > 1 ou log A > 0, subaditividade ou antagonismo

Cinco combinações larvicidas para o modelo *Aedes aegypti*, foram experimentadas em proporções fixas a partir das curvas dose-resposta dos extratos brutos avaliados separadamente, com uma razão de potência obtida através de R=z₁*/z₂*. As proporções de cada extrato foram denominadas como p₁ e p₂, para *Annona muricata* e *Piper nigrum*, respectivamente, onde p₁+p₂=1.

A partir da Equação 3 e das proporções fixas dos extratos, é possível obter uma relação expressa em termos de concentração total, z_t, de cada combinação:

$$A = z_t \left[\frac{p_1}{z_1^*} + \frac{p_2}{z_2^*} \right] \text{ ou } z_t = \frac{Az_t^*}{[p_1(1-R)+R]}$$

Equação 4 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL

O valor de concentração total aditiva, z_{add} , de cada combinação foi obtido utilizando a Equação 4 e o valor de $A=1$. Para cada combinação, os valores de z_t e z_{add} foram comparados estatisticamente através de teste t pareado, $p < 0,05$, utilizando o software SPSS® Statistic Versão 17.0.0. Adicionalmente, para determinar a tendência de sinergismo, nós utilizamos um parâmetro, denominado de R_z , que representa a relação entre os valores de z_{add} , concentração total aditiva, e z_t , concentração total obtida. Os resultados dos cálculos estão mostrados na Tabela 4.

10 Tabela 4 - VALORES NUMÉRICOS DE A E CONCENTRAÇÕES TOTAIS, z_t E z_{add} , EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata*, Am E *Piper nigrum*, Pn CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Combinação (Am: Pn)	$p_1^{(a)}$	A	$z_t^{(b)}$	$z_{add}^{(b)}$	$R_z = z_{add}/z_t$
A (10:90)	0,1	0,62 (0,61-0,64)	1,27 (1,18-1,38)	2,04 (1,93-2,16)**	1,61 (1,64-1,57)
B (30:70)	0,3	0,44 (0,39-0,50)	1,15 (0,97-1,37)	2,61 (2,47-2,77)**	2,27 (2,54-2,02)
C (50:50)	0,5	0,37 (0,28-0,50)	1,35 (0,96-1,92)	3,61 (3,41-3,84)**	2,68 (3,54-2,00)
D (70:30)	0,7	0,32 (0,09-0,51)	1,85 (0,50-3,19)	5,87 (5,52-6,25)*	3,17 (10,99-1,96)
E (90:10)	0,9	0,20 (0,07-0,33)	3,06 (1,06-5,48)	15,64 (14,40-16,82)**	5,12 (13,61-3,07)

NOTA: (a) proporção de *Annona muricata*; (b) concentração total em $\mu\text{g/mL}$; (*) $p < 0,05$ ou (**) $p < 0,01$ (teste t entre z_t e z_{add})

15 Todos os valores numéricos de A calculados se apresentaram bem abaixo de 1, comprovando a existência de sinergismo ou superaditividade entre os dois extratos avaliados, em combinação, contra larvas de *Aedes aegypti*. As concentrações totais, z_t e z_{add} , foram comparadas através de teste t pareado e demonstraram diferença estatística, com valores de 20 $p < 0,05$, em todas as combinações avaliadas, comprovando que existe sinergismo entre os dois extratos. Das cinco combinações, três, inclusive, apresentaram valores de $p < 0,01$.

Analisando as relações entre as concentrações totais de cada combinação, ou seja, $R_z = z_{add}/z_t$, isto é, quantas vezes a concentração total aditiva é maior que a concentração total encontrada, a combinação E apresenta um valor cinco vezes maior que o esperado, enquanto na 5 combinação A, este valor é de 1,61. O aumento nestes valores, R_z , é diretamente proporcional ao aumento da proporção de *Annona muricata*, enquanto os valores de A, são inversamente proporcionais às proporções, comprovando que quanto maior a proporção de *Annona muricata*, melhor é o sinergismo entre os dois extratos.

10 Portanto, nossos resultados suportam a base inovativa deste pedido de patente porque todas as combinações dos extratos etanólicos das sementes de *Annona muricata* e dos frutos *Piper nigrum* exibem efeitos sinérgicos sobre a letalidade de larvas de *Aedes aegypti*. Estes resultados inéditos e positivos podem ser explicados pela circunstância de que os 15 principais componentes tóxicos destas duas plantas – acetogeninas e piperamidas – atuam segundo mecanismos de ação bioquímica completamente diferentes: as acetogeninas de *Annona muricata* bloqueando a geração de energia mitocondrial ou ATP e piperina/ amidas relacionadas de *Piper nigrum* causando efeitos neurotóxicos através da 20 inibição enzimática do citocromo P450. Portanto, através do efeito sinérgico encontrado é possível reduzir as quantidades dos extratos necessários para produzir mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, vetor que persiste como um sério problema de Saúde Pública no País. Portanto, este pedido de patente contempla a utilização das fontes de princípios 25 ativos larvicidas contra as espécies de *Aedes* sp. Tendo como origem botânica os gêneros e espécies *Annona muricata* e *Piper nigrum* além de

outras espécies e mesmo outros gêneros desde que enriquecidos nas referidas acetogeninas e piperamidas e ainda outras espécies, como as meliáceas *Melia azedarach* ou *Azadirachta indica*, cujos bioativos anti-insetos não são quimicamente relacionados ou seja, são limonóides ou terpenenóides. Este pedido de patente também trata da composição dos fitopraguicidas utilizando na sua formulação extratos em sua forma mais purificada após fracionamento além da forma bruta inicial vista nos extratos alcoólicos, assim como do enriquecimento mais direto em princípios ativos larvicidas em uma segunda extração pode ser garantido através de uma primeira extração dirigida à população neutra de lipídeos da família dos triacilgliceróis e similares que não apresentem bioatividade larvicida.

No que tange a apresentação e descrição dos desenhos, figuras ou ilustrações além das tabelas e equações já incorporadas na parte anterior do relatório descritivo anterior, a compreensão da técnica de utilização de extratos etanólicos das sementes de *Annona muricata* e frutos de *Piper nigrum* em combinações sinérgicas como alternativa para o controle das larvas do mosquito vetor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti* é adicionalmente esclarecida com desenhos e figuras numerados de 1 até 5.

A título de exemplo prático-laboratorial de caracterização dos bioativos presentes em sementes de graviola e de frutos de pimenta-do-reino, na Figura 1 aparecem duas cromatografias em camada delgada dos perfis dos extratos brutos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* e suas respectivas amostras de referência, ou seja, a amostra pAG representando uma amostra rica em acetogeninas e o padrão comercial de piperina representando uma piperimida, respectivamente. A cromatografia em

camada delgada foi desenvolvida utilizando como fase estacionária placas de sílica gel 60 Merck, com a distância origem até o final de 8 cm. Como fase móvel foi empregada a mistura hexano: clorofórmio: nitroetano: acetato de etila: acetona: metanol: acetonitrila: água em proporção 12:2:4:4:1:2:1,6:0,1. Como agentes reveladores foram utilizados anisaldeído sulfúrico a quente contendo 1 g de anisaldeído, 5 mL de ácido sulfúrico e 90 mL de metanol, seguido de aquecimento a 110°C por 3 minutos e o reativo de Kedde que é uma nebulização seqüencial a frio de solução A – 3% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e outra solução B- 5,7 % de hidróxido de potássio em etanol. As imagens das cromatoplasmas foram adquiridas com câmera fotográfica Sonny CyberShot Smart Zoom DSC-P92. Define-se Rf como a relação entre a distância de migração de um componente qualquer do extrato e a distância total percorrida pelo solvente; dest' arte se uma substância é detectada com o reagente e migrou 4 cm, seu Rf será 0,5 já que o solvente ou fase móvel migrou 8 cm. O cromatograma da esquerda mostra o perfil geral dos constituintes revelados com p-anisaldeído sulfúrico a quente. O extrato etanólico bruto de *Annona muricata* mostra claramente a predominância de TAGs - triacilgliceróis com manchas violáceas com Rf 0,93 enquanto que estas manchas não aparecem na amostra de referência, pAG, destacando portanto as acetogeninas com coloração verde-acizentada com Rf 0,37 e 0,27. A maior mancha de acetogeninas é provavelmente annonacina, que é dominante em sementes de *Annona muricata* (CHAMPY, P., MELOT, A., GUERINEAU, V., et al. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disord* 20, 12: 1629-1633, 2005). Na placa da direita, revelada com o reagente de Kedde para a

detecção específica de lactonas insaturadas, as acetogeninas aparecem com uma forte coloração rosa avinhada, confirmando as interpretações, e como é um reagente seletivo, facilita a visualização até de acetogeninas em menor concentração no extrato. A Figura 1 também mostra o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto de *Piper nigrum* e do padrão de piperina. Na placa da esquerda, com anisaldeído sulfúrico, se mostra as manchas violáceas com alto Rf 0,93 e que são referentes aos lipídeos comuns ou TAGs. Já a piperina, com Rf = 0,58 apresenta-se como o maior componente e apresenta coloração verde-marrom. Outros compostos não identificados, mas com coloração semelhante, apresentam-se com Rf próximos a piperina.

Na Figura 2, também como exemplo de prática laboratorial estão representadas as combinações dos extratos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* analisadas através do teste de independência. Adicionalmente, todas as seis combinações apresentaram diferença estatística, $p < 0,05$, entre as mortalidades esperadas e observadas, utilizando o *software* SPSS® Statistic Versão 17.0.0, para a verificação da existência de diferença estatística, $p < 0,05$ (FARENHORST, M., KNOLS, B.G.J., THOMAS, M.B., et al. Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. PLoS ONE 5, 8: e12081, 2010). Esta diferença estatística comprova a existência de sinergismo entre os dois extratos, principalmente nas combinações 3 e 4 nas quais houve um aumento na ordem de 2,4 vezes.

Na Figura 3 está representado o isoblograma, construído a partir das CL_{50} determinadas individualmente. Este gráfico é usualmente descrito na literatura para a visualização das interações que são facilmente observadas.

O isobolograma pode ser obtido plotando um gráfico cartesiano dos valores, por exemplo CL_{50} , dos extratos avaliados separadamente, com o extrato menos ativo em 'X' ou abcissa e o mais ativo em 'Y' ou ordenada. Unindo os valores das CL_{50} obtêm-se a linha de aditividade com seu respectivo intervalo de confiança. Após avaliar as combinações entre os dois extratos, os valores de CL_{50} foram plotados no gráfico, onde todos os pares das novas CL_{50} das combinações situou-se abaixo do intervalo de aditividade, comprovando então sinergismo entre os dois extratos etanólicos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* (THOMULKA, K.W. e LANGE, J.H. Mixture toxicity of nitrobenzene and trinitrobenzene using the marine bacterium *Vibrio harveyi* as the test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 2: 189-195, 1997; NAKORNCHAI, S. e KONTHIANG, P. Activity of azithromycin or erythromycin in combination with antimalarial drugs against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Acta Tropica* 100,3: 185-191, 2006; PARRY, T.J., THYAGARAJAN, R., ARGENTIERI, D., et al. Effects of drug combinations on smooth muscle cell proliferation: An isobolographic analysis. *European Journal of Pharmacology* 532, 1-2: 38-43, 2006).

Na Figura 4 está representado um gráfico que relaciona as proporções p_1 , proporção de *Annona muricata* versus o log das concentrações totais, z_t ou z_{add} , o qual resultou em uma curva não-linear, visualmente informativa para a comparação das diferenças entre as concentrações totais e tendência das interações (TALLARIDA, R.J. e RAFFA, R.B. Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: Replacing the isobologram. *Life Sciences* 58, 2: PL23-PL28, 1995). Com este gráfico foi possível comprovar a existência de uma

interação positiva entre os dois extratos etanólicos de *Annona muricata* e *Piper nigrum*, uma vez que as duas curvas não lineares de z_1 e z_{add} são distantes uma da outra, e ainda, a curva de z_{add} está situada na porção superior da figura, comprovando que existe sinergismo entre os dois extratos em quaisquer combinações avaliadas, com tendência a um efeito melhor quanto maior for a proporção de *Annona muricata* nas combinações.

Na Figura 5 estão apresentados os aspectos morfológicos das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com os extratos etanólicos brutos de *Annona muricata* e *Piper nigrum*, separadamente ou em diferentes combinações. As larvas de *Aedes aegypti* foram analisadas comparativamente entre os diversos tratamentos e visualmente analisadas em fotos obtidas sob lupa Carl Zeiss – Stemi 2000 C - aumento de 4,5 x e câmera fotográfica Sonny CyberShot Smart Zoom DSC-P92 e o tamanho foi calculado a partir da escala inserida nas fotografias através do *software* Corel Photo-Paint® 10 Versão 10.410 e determinado com o auxílio de uma régua. Para a medição das larvas foi utilizado o BitRule Charten *Software* contendo uma régua virtual. As porcentagens de cada segmento do corpo das larvas nos bioensaios larvicidas foram determinadas com relação à média do tamanho total do corpo das larvas utilizadas nos controles negativos, com água ou etanol. Foram medidos os tamanhos da cabeça, cérvix ou cérvix - parte anterior ao tórax ou “pescoço”, tórax, abdômen e sifão respiratório. As larvas dos controles negativos, com água ou etanol, apresentaram o aspecto normal, com tamanho médio de 4,1 (\pm 0,36) e 4,2 (\pm 0,85) mm para os controles com água ou etanol, respectivamente. Já as larvas expostas ao organofosforado Temefós e ao extrato bruto de *Piper nigrum* apresentaram

o abdômen encurtado com um tamanho médio de 3,4 ($\pm 0,41$) e 3,5 ($\pm 0,70$) mm, respectivamente. No caso das larvas expostas ao extrato bruto *Annona muricata* o corpo se tornou alongado, com tamanho de 5,3 ($\pm 1,05$) mm e o aparecimento de cervice, assim como em quaisquer das combinações de *Annona muricata* e *Piper nigrum* que resultaram em perfil morfológico semelhante ao de *Annona muricata* isoladamente e o tamanho médio das larvas nas combinações de A até E: 5,4 ($\pm 0,58$); 5,2 ($\pm 0,51$); 5,1 ($\pm 0,40$); 5,4 ($\pm 0,44$) e 5,2 ($\pm 0,66$), sugerindo que o extrato bruto de *Annona muricata* é o responsável por tais efeitos. A alta taxa de mortalidade provocada tanto por *Piper nigrum* quanto por *Annona muricata*, e mais ainda pela combinação de ambas, acompanhada das alterações morfológicas antes descritas só fazem reforçar o efeito larvicida detectado contra *Aedes aegypti* e o acerto estratégico deste pedido de patente a partir justamente das combinações dos extratos e o detectado sinergismo.

No que diz respeito a exemplos de concretizações da invenção desejada e comparação com o estado da técnica, além das citações já embutidas na parte anterior deste relatório descritivo, se incorpora as duas tabelas. A primeira delas, ou seja, Tabela 5, elenca vários parâmetros operacionais, como parte botânica utilizada, solvente de extração, rendimento da extração, cepa de *Aedes aegypti*, estágio larval e tempo de exposição, e ainda finaliza com os importantes valores de CL₅₀ e CL₉₉, ou seja, as concentrações efetivas para assegurar a letalidade de 50 e 99% das larvas de *Aedes aegypti*, a partir de nossos dados experimentais obtidos de forma individual para cada extrato de planta comparados com os dados descritos na literatura para cada uma das espécies, ou seja, *Annona muricata* e *Piper nigrum*.

5 Tabela 5 – EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO DA INVENÇÃO DO USO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata*, Am E *Piper nigrum*, Pn AVALIADOS INDIVIDUALMENTE CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti* E NOSSOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS CONFRONTADOS AQUELES DA LITERATURA (*, **)

Parâmetros	<i>Annona muricata</i>		<i>Piper nigrum</i>	
	Exemplo	Exemplo comparativo(*)	Exemplo	Exemplo comparativo(**)
Parte botânica utilizada	Sementes	Sementes	Frutos maduros	Frutos verdes
Solvente de extração	Etanol	Etanol 95%	Etanol	Etanol
Rendimento (%)	20,4	28	8,6	10
Cepa <i>Aedes aegypti</i>	Rockfeller	Rockfeller	Rockfeller	Resistente Piretroíde
Estágio larval	3º ínstar	4º ínstar	3º ínstar	3º ínstar
Tempo de exposição (h)	24	24	24	24
CL ₅₀ (µg/mL)	93,48	900	1,84	0,98
CL ₉₉ (µg/mL)	1571,11	-	3,86	2,72

10 NOTA: Exemplo comparativo para *Annona muricata* {(*) HENAO, G.J.P., PAJÓN, C.M.G. e TORRES, J.M.C. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* vector del dengue en Colombia. Revista CES MEDICINA 21, 1: 47-54, 2007} e *Piper nigrum* {(**) SIMAS, N.K., LIMA, E.D.C., KUSTER, R.M., *et al.* Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40, 4: 405-407, 2007}.

15 A Tabela 6 explicita a quantidade de cada extrato (em µg/mL ou mg/L) para assegurar a já referida CL₉₉ mas agora a partir dos nossos experimentos a partir de combinações sinérgicas dos dois extratos e também as DD ou Doses Diagnósticas, que correspondem exatamente ao dobro de cada CL₉₉, sendo que aqui também está incluída, para fins mais práticos, a quantidade, em gramas ou kilogramas, de sementes de *Annona muricata* ou frutos maduros de *Piper nigrum* necessárias para a obtenção dos extratos para cada litro ou tonelada de água afim de garantir a mortalidade praticamente total de larvas de *Aedes aegypti* ou seja as DD antes definidas como o dobro da CL₉₉. Portanto, este pedido de patente trata que as composições fitopraguicidas sejam formuladas a partir dos

20

extratos de *Annona muricata* e de *Piper nigrum*, normalizados os conteúdos de sólidos totais preferencialmente na faixa da dose diagnóstica definida como o dobro da CL₉₉, mas não de forma excludente, serem combinados em quaisquer proporções desde 99 : 1 até 1: 99 mas mais preferencialmente na faixa entre 90 : 10 e 98 : 2. Há que se observar, obviamente, que em cada combinação de extratos, as quantidades relativas de cada um são, como desejável, sempre menores do que aquelas que, individualmente, produzem um mesmo efeito letal para *Aedes*, de forma que fique, inquestionavelmente, comprovado o efeito desejado nas combinações, o sinergismo ou superaditividade.

Tabela 6 – EXEMPLOS DE QUANTIDADES USUAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata*, Am, E *Piper nigrum*, Pn, E AS QUANTIDADES NECESSÁRIAS DAS ESPÉCIES BOTÂNICAS PARA A UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS INDIVIDUALMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Proporção Am:Pn (%)	Quantidade de extrato/água				Quantidade de planta/água para DD	
	CL ₉₉ (µg/mL ou mg/L)		DD (2xCL ₉₉) (µg/mL ou mg/L)		g/L ou Kg/1000 L	
	Am	Pn	Am	Pn	Am	Pn
Am: Pn (0:100)	-	3,86	-	7,72	-	0,090
Am: Pn (10:90)	27,33	1,70	54,66	3,4	0,268	0,040
Am: Pn (30:70)	88,30	1,42	176,6	2,84	0,866	0,033
Am: Pn (50:50)	258,64	1,31	517,28	2,62	2,536	0,030
Am: Pn (70:30)	424,53	0,88	849,06	1,76	4,162	0,020
Am: Pn (90:10)	573,29	0,17	1146,58	0,34	5,620	0,004
Am: Pn (100:0)	1571,11	-	3142,22	-	15,403	-

NOTA: DD = Dose Diagnóstica; Os valores calculados das quantidades necessárias das espécies botânicas foram baseados nos rendimentos dos extratos em relação a 100 g de planta, ou seja, 20,4 g para Am e 8.06 g para Pn.

Na Tabela 6 não se pode incluir dados comparativos oriundos da literatura pela simples razão da inovação ou originalidade deste pedido de patente, qual seja a combinação sinérgica dos dois extratos das plantas fitoláricidas contra o mosquito da dengue.

5 Para o usufruto dos inventores e das depositantes como está garantido no Período da Graça – artigo 12 da LPI – Lei da Propriedade Industrial e item 2 do AN no. 127/97 – se informa as duas ocorrências pertinentes e anteriores a este depósito de patente de invenção mas não mais do que 3 meses antes da data de depósito: a) a co-inventora Adélia
10 Grzybowski submeteu-se ao devido exame de qualificação de doutorado em Ciências Farmacêuticas na UFPR em data de 31 de Agosto de 2011; b) submissão, por parte do inventor líder, José Domingos Fontana e seus parceiros, de parte dos dados experimentais como publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia em 23 de Agosto de 2011 e cujo texto ainda se
15 acha em exame por parte do corpo editorial desta revista.

Resumidamente, como é requerido em Lei e para completo atendimento do que dispõe o INPI para a concessão de uma patente de invenção, se justifica o presente invento em função de: a) novidade: não há registro na literatura e portanto no estado-da-arte ou estado-da-técnica, do
20 emprego anterior de combinações de extratos de plantas Annonaceae e Piperaceae para assegurar a letalidade do mosquito da febre da dengue, *Aedes aegypti*; b) aplicabilidade industrial e/ou comercial: por se tratar de produtos naturais relativamente abundantes bem como suas fontes botânicas, sementes e frutos, envolvendo um método extrativo de baixo
25 custo qual seja extratos etanólicos e comprovada a eficácia em combater uma importante praga ambiental, o mosquito vetor dos vírus das febres da

dengue e amarela, o invento tem plena potencialidade de exploração industrial; c) atividade inventiva : a utilização das combinações dos extratos etanólicos das plantas-modelo exploradas como exemplos ilustrativos, então a partir de sementes de graviola, *Annona muricata* e de pimenta-do-reino, *Piper nigrum*, em quaisquer proporções resultou sempre em sinergismo ou superaditividade ou seja menor gastos de insumos bioativos para se obter maiores taxas de mortalidade. Como exemplo, as CL_{50} individuais ou isoladas eram de 93,48 e 1,84 $\mu\text{g/mL}$ ou ppm, respectivamente para *Annona muricata* e *Piper nigrum*, enquanto a CL_{50} da combinação 90 : 10 se reduziu a 13,19 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$ ou ppm, uma clara comprovação experimental e estatisticamente corroborada para o pretendido e alcançado sinergismo praguicida, mais especificamente larvicida, contra o mosquito das febres da dengue e amarela, *Aedes aegypti*.

REIVINDICAÇÕES

1. Composições fitopraguicidas sinérgicas a partir da combinação de extratos de Annonaceae e Piperaceae, **caracterizadas pelo** fato de os extratos serem obtidos de sementes de graviola *Annona muricata* e de frutos de pimenta-do-reino *Piper nigrum* e estarem enriquecidos nos respectivos princípios ativos, acetogeninas e piperamidas.

2. Processo de utilização de combinações sinérgicas praguicidas de Annonaceae e Piperaceae, **caracterizado pela** letalidade para *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

3. Composições de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas pelo** fato de que os extratos podem ser obtidos pelo método de extração a quente mediante simples fervura incipiente do vegetal e do solvente seguida de filtração, além de outros métodos extrativos tais como infusão, decocção, extração em aparelho de Soxhlet, refluxo, turbolização, maceração, maceração dinâmica, arraste de vapor, percolação, extração assistida por microondas e ultrassom, extração acelerada com solventes e extração com fluídos super críticos.

4. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1 ou 3, **caracterizadas pelo** fato de os extratos poderem ser obtidos utilizando preferencialmente etanol como solvente de extração, além de outros solventes assemelhados apolares e polares tais como hexano, éter de petróleo, tolueno, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, acetona, acetonitrila, butanol, propanol, isopropanol e metanol, bem como misturas destes solventes em quaisquer proporções e ainda misturas dos solventes polares com água igualmente em quaisquer

proporções, sendo ainda que quaisquer destes solventes e misturas poderem ser aplicados sob condição neutra, ácida e básica.

5. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1, 3 ou 4, **caracterizado pelo** fato de os extratos de graviola, *Annona muricata* enriquecidos em acetogeninas e de *Piper nigrum* enriquecidos em piperamidas e substâncias assemelhadas poderem ser obtidos a partir de partes botânicas tais como as folhas, caule, casca do caule, raízes, galhos e casca do fruto, além das sementes e frutos inteiros como respectivas fontes preferenciais.

6. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1, 3, 4 ou 5, **caracterizadas pelo** fato de os extratos de *Annona muricata* e de *Piper nigrum*, normalizados os conteúdos de sólidos totais preferencialmente na faixa da dose diagnóstica definida como o dobro da CL₉₉, mas não de forma excludente, serem combinados em quaisquer proporções desde 99 : 1 até 1 : 99 mas mais preferencialmente na faixa entre 90 : 10 e 98 : 2.

7. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1, 3, 4, 5 ou 6, **caracterizadas pelo** fato de que os extratos praguicidas serem obtidos a partir de outras espécies e gêneros das famílias Annonaceae e Piperaceae mesmo de outras fontes botânicas desde que contendo acetogeninas e piperamidas.

8. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1, 3, 4, 5, 6 ou 7, **caracterizadas pelo** fato de os extratos poderem ser utilizados em forma purificada após fracionamento, além da forma bruta típica de cada extrato inicial.

9. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, **caracterizadas pelo** fato de que o enriquecimento em princípios ativos, acetogeninas e piperamidas, em uma segunda extração, é garantido através de uma primeira extração dirigida à população neutra e inativa de lipídeos da família dos triacilgliceróis e similares.

10. Composições de acordo com **quaisquer das** reivindicações 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, **caracterizadas pelo** fato de que as fontes naturais de acetogeninas e piperamidas poderem ser tanto individual quanto duplamente substituídas por iguais substâncias e mesmo congêneres derivadas da síntese química.

11. Composições de acordo com as **quaisquer das** reivindicações 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, **caracterizadas pelo** fato de as combinações praguicidas sinérgicas poderem ser formuladas como soluções e suspensões alcoólicas e, alternativamente, em outros solventes e excipientes bem como quaisquer outras formas sanitárias de apresentação sejam líquidas, semi-sólidas sólidas e aerossóis.

12. Processo de utilização das combinações praguicidas sinérgicas de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** ampla aplicabilidade dos mesmos em corpos de água e outros ambientes tais quais atmosfera e solo, todos representativos como alvos para a acomodação do mosquito em estágio de alimentação e ovideposição.

13. Processo de utilização das combinações praguicidas sinérgicas, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 12, **caracterizado pelo** fato de os extratos combinados poderem ser, prioritariamente, utilizados contra as larvas de *Aedes ssp.* e todos seus

íntares, além dos outros estágios morfogénéticos dos mosquitos quais sejam os ovos e sua eclosão, pupas e sua diferenciação e mesmo contra os insetos adultos.

Fig. 1

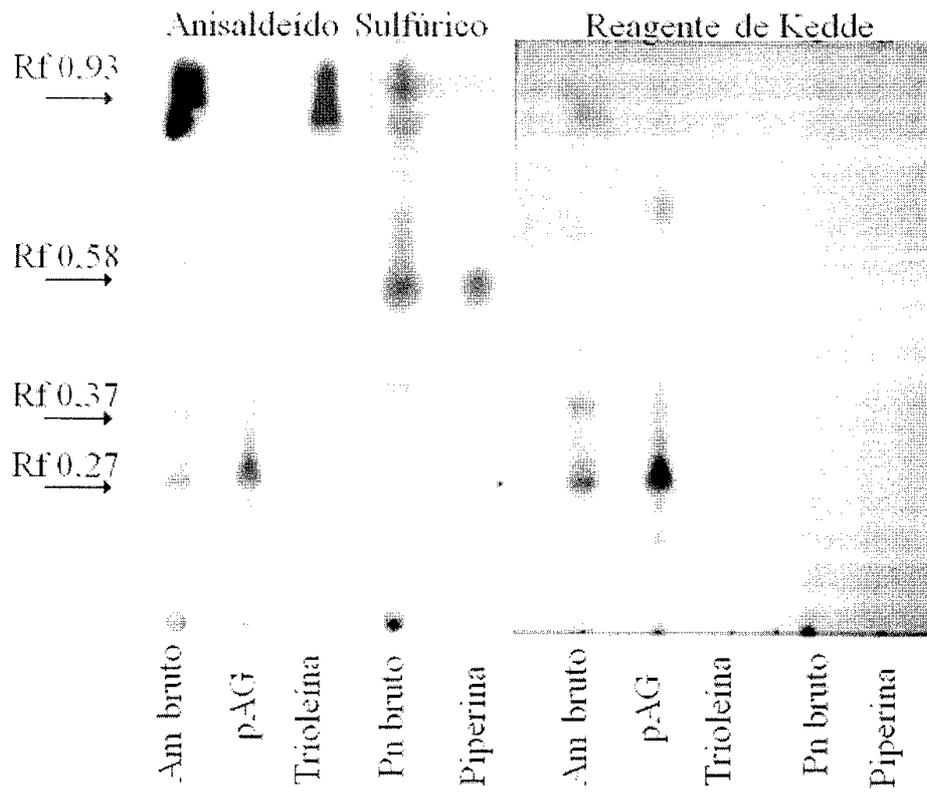


Fig. 2

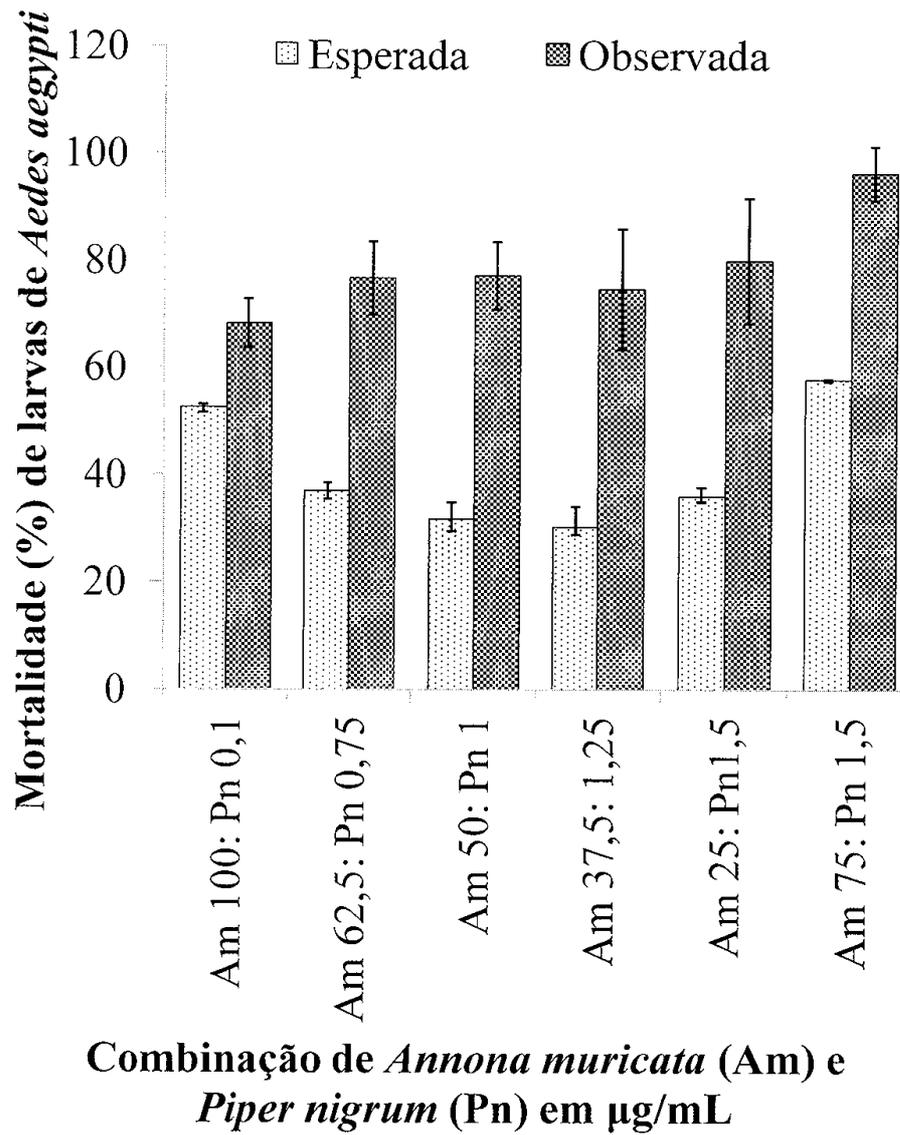


Fig. 3

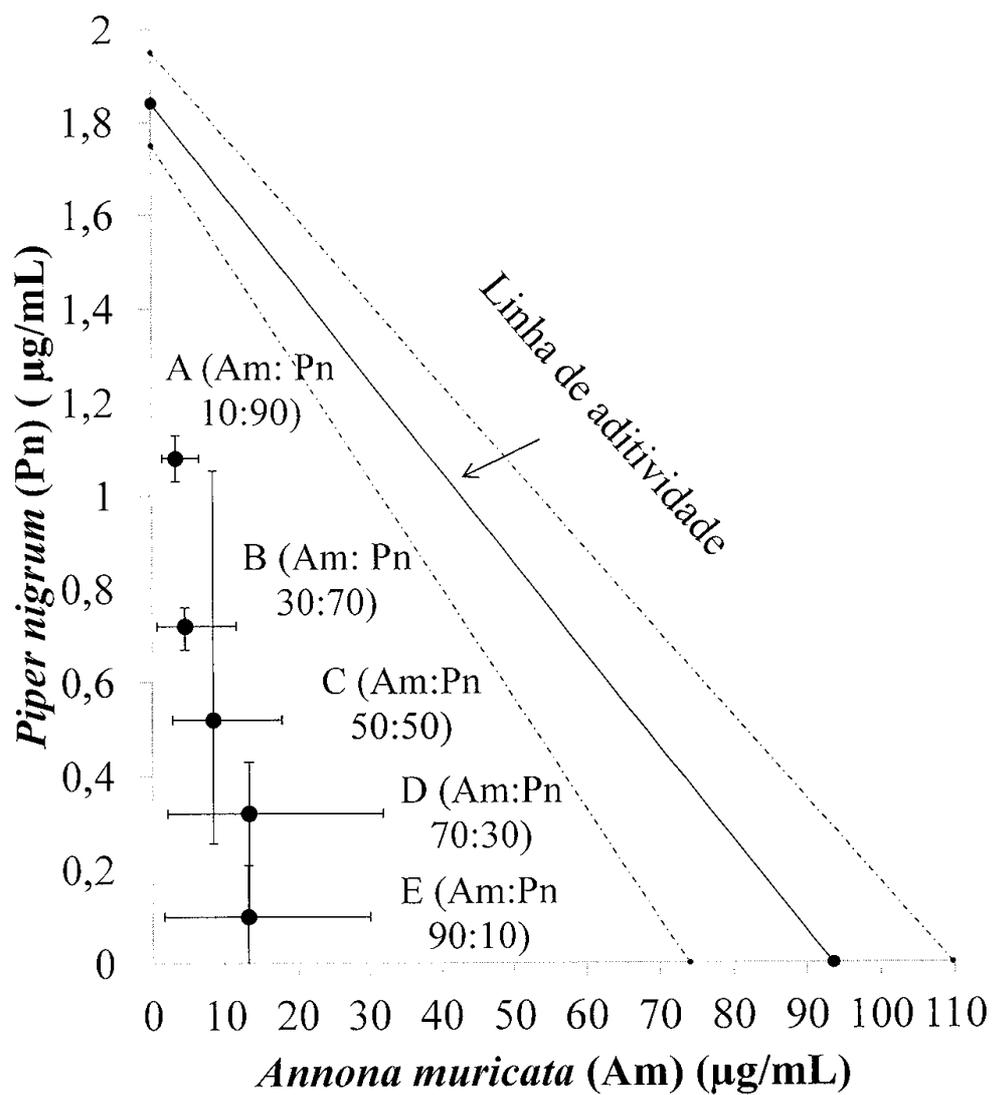


Fig. 4

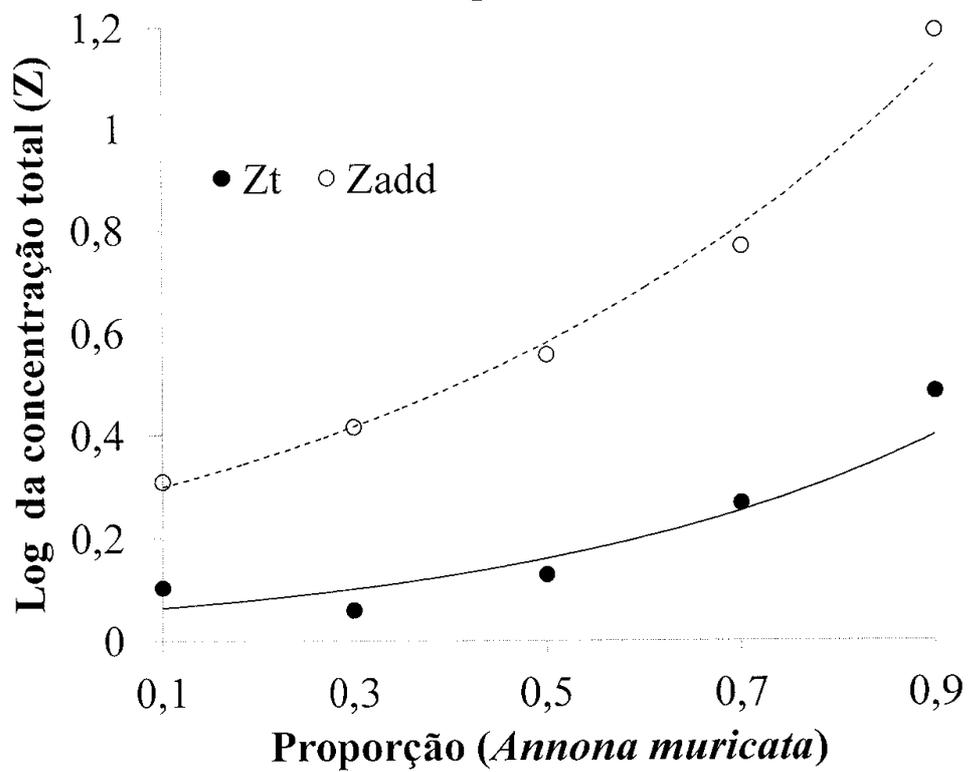
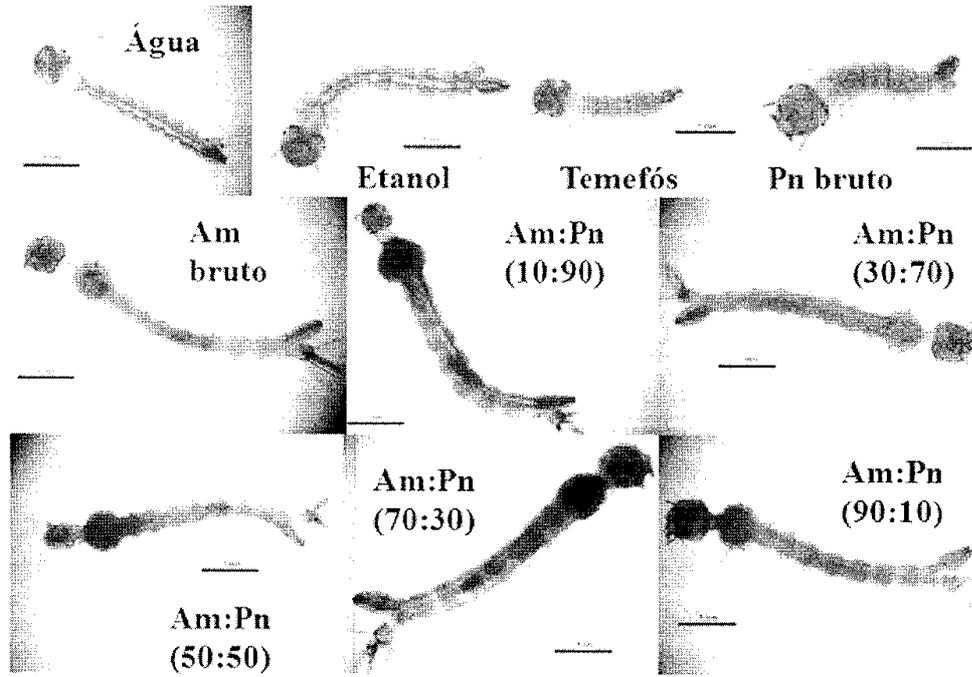


Fig. 5



Annona muricata (Am) e *Piper nigrum* (Pn)