



INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Assinado Digitalmente

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

CARTA PATENTE N° PI 1003892-2

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 1003892-2

(22) Data do Depósito: 29/10/2010

(43) Data da Publicação do Pedido: 12/06/2012

(51) Classificação Internacional: A01N 65/26; A01N 65/00

(54) Título: PROCESSO DE PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DO NIM (AZADIRACHTA INDICA A. JUSS) COM AÇÃO OVICIDA E LARVICIDA SOBRE O AEDES AEGYPTI

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO. CGC/CPF: 06352421000168. Endereço: Cidade Universitária Paulo VI S/N, Tirirical, São Luis, MA, BRASIL(BR), 65055-970

(72) Inventor: ADRIANA LEANDRO CAMARA; MARIA CÉLIA PIRES COSTA; PAULA EILLANY SILVA MARINHO; MAMEDE CHAVES E SILVA

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 29/10/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 06/02/2018

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente

REPUBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
15 de Novembro de 1889

Relatório Descritivo da Patente de Invenção do “PROCESSO DE PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DO NIM (*Azadirachta indica* A. Juss) COM AÇÃO OVICIDA E LARVICIDA SOBRE O *Aedes aegypti*.”

5

I) Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito a um processo de preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) com ação ovicida e larvicida sobre o *Aedes aegypti*.

10

II) Antecedentes da Invenção

O extrato do Nim é obtido de forma natural de diversas partes da planta, a qual tem mostrado atividade inseticida, mas que até então, não 15 mostrou nenhum efeito tóxico ao homem (Patente US 920238 de 1992, pertencente a Rohm e Haas Company). O maior problema na eliminação do mosquito transmissor da Dengue, *Aedes aegypti*, é que seus ovos e larvas podem durar até um ano. O principal combate ao mosquito *Aedes aegypti* hoje se resume em limpeza de locais que armazenam água e, principalmente, o uso 20 de inseticidas da classe dos organofosforados, compostos altamente tóxicos

que regulam o crescimento dos insetos, mas que tem enorme efeito tóxico ao homem. (LIMA, et al. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 39, n. 3, 2006).

5 Compostos fáceis de ser manipulados, solúveis em água que combata o mosquito *Aedes aegypti* nas suas diferentes fases de desenvolvimento e que não seja tóxico ao homem seria a saída ideal para a eliminação do mosquito e consequentemente para ao controle da doença no Brasil e no Mundo. Assim, o Nim surge como uma forma natural, atóxica, de baixo custo e eficaz para o controle do *Aedes aegypti*.

10 A dengue é um dos principais problemas de saúde pública do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue. (Ministério da Saúde, 2009).

15 Doença infecciosa aguda de curta duração, a dengue, tem gravidade variável. É causada por um arbovírus, do gênero *Flavivírus* (soropositivos: 1,2,3 e 4). No Brasil, circulam os tipos 1, 2 e 3. O vírus do tipo 3 está presente desde dezembro de 2000 e foi isolado em janeiro de 2001, no Rio de Janeiro.

20 O controle da dengue vem sendo um dos maiores desafios na saúde pública do País. Desde que foi detectada a presença do *Aedes aegypti* em São Paulo, em 1985 até meados de 1995, 595 municípios paulistas encontravam-se infestados por este vetor .

No Brasil, a erradicação do *Aedes aegypti* ocorreu em 1958, devido ao controle da febre amarela, também transmitida por este mosquito, o que fez desaparecer também a dengue, mas em 1967 este mosquito reapareceu em São Luís e Belém, sendo em seguida eliminado (Ministério da 5 Saúde. Rio de Janeiro, 1976.). Assim, em 1976, com origem em um foco em Salvador, inicia-se a re-colonização do *Aedes aegypti* no Brasil (Rebelo, *et al.*, Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 15(3):477-486, jul-set, 1999).

O *Aedes aegypti*, que pertence à família Culicidae, é o principal vetor da dengue, sua distribuição é cada vez mais abrangente, porém é 10 encontrado principalmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, inclusive no Brasil.

A dengue é transmitida principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. A doença só acomete a população humana. Esses mosquitos picam durante o dia, ao contrário do mosquito comum (*Culex*), que pica durante 15 a noite.

No Maranhão o mosquito *Aedes aegypti* encontra-se disseminado em municípios de todas as regiões. Os índices de positividade predial para o mosquito, foram mais elevados na Amazônia Maranhense e na Ilha de São Luís, por constituírem as rotas de maiores fluxo migratório da 20 população e de escoamento de produtos entre o Maranhão e os estados vizinhos e também por serem áreas onde estão localizados os grandes centros urbanos e econômicos do Estado. (Rebelo, *et al.*, Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 15(3):477-486, jul-set, 1999).

O único modo possível de evitar a introdução de um novo tipo de vírus da dengue é a eliminação do transmissor, o *Aedes aegypti*, que também pode transmitir a febre amarela.

Extratos de diversas partes do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss)

5 têm mostrado bastante efeito sobre larvas de insetos do gênero *Anopheles*, o principal vetor da malária, de *Culex* vetor da elefantíase (Vatandoost e Vaziri, *East Mediterr Health J.* 4-5:573-81. 2004) e até mesmo do *Aedes aegypti* (Wandscheer, et al., *Toxicon*. 15; 44(8):829-35. 2004). Porém a sua eficácia sobre ovos do mosquito ainda não foi descrito.

10 O Nim, da família Meliaceae é uma árvore originária da Índia, com excelente adaptação no Brasil, possuidora de propriedades químicas especiais, utilizada há mais de quatro mil anos no controle de insetos, pragas, nematóides, bactérias, fungos, piolhos, carrapatos, na medicina humana e animal, reflorestamento, fabricação de creme dental, sabonetes, sabões, 15 cosméticos, adubação e no paisagismo, além de outras finalidades, na condição de uma planta de múltiplo uso. (Subapriya e Nagini, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 5(2):149-6. 2005; Thakurta, et al., *J. Ethnopharmacol.* 22;111(3):607-12. 2007.

20 Desta árvore, podem ser utilizadas as folhas desde os seis meses de idade para a formulação de biodefensivos e outros empregos, as sementes para o preparo de mudas e extração do óleo. A madeira é muito especial e cuja exploração racional começa aos 10 anos do plantio para a fabricação de móveis e outros usos nobres, de grande densidade e imunidade

a traças, cupins, brocas, além de rebrotarem após os cortes sistemáticos, sendo todas essas aplicações de amplo valor de mercado e plenas oportunidades de comercialização. Diante desta elevada importância, o Nim se apresenta como uma planta perene exótica de elevada importância para o

5 Maranhão, inclusive para a elevação do índice de Desenvolvimento Humano (IDR), principalmente das populações mais necessitadas do Estado.

As diversas patentes já concedidas com extratos do Nim Indiano usam folhas e principalmente óleo das sementes do Nim, mas nenhuma comprovou a eficácia na eliminação do *Aedes aegypti*, nem mostrou a de um
10 extrato de fácil manipulação e eficaz no controle de insetos em diversas fases do seu desenvolvimento, como o proposto neste pedido de patente. (Patente US 920238 de 1992, pertencente a Rohm e Haas Company; Patente US 07/944201 de 1992, pertencente a Neem Pharmaco)

A presente invenção propõe que a partir da preparação do extrato
15 hidroalcoólico das folhas do Nim, pode-se obter um produto viável, de fácil manipulação, de baixo custo, sem efeito tóxico ao homem e que possa ser comercializado e utilizado em campanhas de controle do *Aedes aegypti* nos países onde há a infestação por este mosquito. A grande vantagem deste
20 produto é que pela primeira vez um produto é mais eficaz na eliminação dos ovos do *Aedes aegypti* e, quem sabe até de outros insetos ainda não testados, sendo esta forma de desenvolvimento do inseto a mais resistente a uso de inseticidas já testados. Desta forma, este produto surge como uma grande possibilidade de eliminar o vírus circulante da Dengue, e assim controlar esta doença, já que única forma de combate a Doença é o controle do inseto.

III) Descrição detalhada da invenção

1. Processo de Preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim 5 (EHAN)

Para o preparo do extrato, as folhas do Nim devem ser coletadas e submetidas ao processo de secagem, sendo expostas sobre uma bancada, em local seco e arejado a temperatura ambiente. Depois secadas em estufa a 10 45°C. Após completa secagem o material é triturado e pesado. Ao pó obtido adicionou-se álcool a 70% ($v_{EtOH}:v_{H_2O}$) na proporção (1:3): uma parte da planta para três de álcool, para obtenção do macerado. Deixar o macerado a temperatura ambiente e constante agitação por 72h. O macerado deverá ser filtrado em papel de filtro ou gazes. O macerado é submetido à uma nova 15 adição de Etanol a 70% (v/v) e filtração após 72h de agitação podendo ser realizadas entre 1 a 10 vezes, sendo preferivelmente feitas entre 3 a 5 macerações após agitação. Os filtrados são colocado no balão extrator em banho-maria com temperatura controlada de 70°C em um Evaporador rotativo que tem por finalidade a retirada do álcool e assim concentrar o extrato, ficando 20 no balão apenas o extrato concentrado das folhas do Nim. Em seguida, o extrato concentrado deve ser acondicionado sobre refrigeração e armazenado em frasco de vidro até seu uso. O extrato concentrado das folhas do Nim é

diluído com água na concentração entre 10 a 90%, sendo preferencialmente entre 20 a 25% obtendo-se o ovicida e larvicida.

Para preparar as concentrações de 20 e 25% foi utilizado o extrato concentrado das folhas do Nim na proporção de 1:4 (uma parte do extrato para quatro de água) ou 1:3 (uma parte do extrato para três de água), respectivamente.

O extrato concentrado das folhas do Nim nas concentrações de: 25% foi capaz de inibir 100% da eclosão dos ovos e o de 20% inibiu 98,43% dos ovos de *Aedes aegypti*. Mostrando uma eficácia de quase 100% na eliminação dos ovos de *Aedes aegypti*. O grupo considerado como controle foi tratado com água (Tabela 1).

A fase de ovo do *Aedes aegypti* é a fase mais resistente do ciclo biológico. E até agora não há descrito nenhum produto que tenha ação sobre esta fase de desenvolvimento do mosquito. O que torna este extrato concentrado das folhas do Nim de excelente potencial inovador.

Tabela 1: Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim nas concentração de 25 e 20% na Inibição da eclosão dos ovos *Aedes aegypti*.

Tratamento	Concentração (%)	Inibição (%)
Controle	-	5,94

EHAN	25	100* \pm 0
EHAN	20	98,43* \pm 0

Resultados expressos como médias \pm erro padrão da média obtida em dois experimentos com 8 palhetas em cada. * Indica diferença significante em relação ao controle ($p<0,05$), "t Student.

O extrato concentrado das folhas do Nim nas concentrações de:

5 25% foi capaz de eliminar 76% das larvas de *Aedes aegypti* e a de 20% eliminou 17% das larvas de *Aedes aegypti* (Tabela 2). Mostrando uma eficácia de mais de 50% na eliminação das larvas na maior concentração, o que torna esse produto viável como composto larvicidainseticida, já que para uso como larvicida o produto deverá ter no mínimo 50% de eficácia no seu uso.

10 (FURTADO, et al . Neotrop. Entomol., v. 34, n. 5, Oct. 2005). Estes experimentos mostram ainda que o extrato concentrado das folhas do Nim é mais eficiente na eliminação os ovos de *Aedes aegypti* o que torna o produto mais viável na eliminação deste inseto.

Tabela 2: Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim nas concentração de 25 e 20% na mortalidade das Larvas de *Aedes aegypti*.

Tratamento	Concentração (%)	Larvas vivas (%)	Larvas mortas (%)
Controle	-	99	1

EHAN	25	24	76*
EHAN	20	83	17

Resultados expressos como médias \pm erro padrão da média obtida em quatro experimentos. * Indica diferença significante em relação ao controle ($p<0,05$), "t Student.

REIVINDICAÇÕES

“PROCESSO DE PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DO NIM (*Azadirachta indica* A. Juss) COM AÇÃO OVICIDA E LARVICIDA SOBRE O *Aedes aegypti*.”

5

1- Processo de preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) caracterizado por compreender as etapas de:

a) Coleta das folhas de Nim e secagem das mesmas a temperatura ambiente e posteriormente em estufa a 45°C;

10 b) Triturar as folhas secas da etapa (a) em um triturador e pesar;

c) Adicionar Etanol a 70% (v/v) as folhas secas trituradas da etapa (b) na proporção de 1:3 (uma parte das folhas e três partes do Etanol a 70% v/v), para formação do macerado;

15 d) Deixar o macerado formado na etapa (c) a temperatura ambiente e constante agitação por 72h;

2) Processo de preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por submeter o macerado após agitação à filtração com gazes ou papel de filtro.

20 3) Processo de preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por submeter o macerado à uma nova adição de Etanol a 70% (v/v) e filtração após 72h de agitação podendo ser realizada entre 1 a 10 vezes, sendo preferencialmente feitas entre 3 a 5 macerações após agitação.

25 4) Processo de preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelos filtrados obtidos serem submetidos ao

rotaevaporador, a baixa pressão e temperatura entre 20 à 100°C, sendo preferencialmente entre 50 a 70°C, obtendo-se o extrato concentrado das folhas de Nim.

5) Processo de preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por manter o extrato concentrado obtido sob refrigeração e armazenado em frasco de vidro até seu uso.