

(11) Número de Publicação: PT 670677 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

A01N063/00 A A01N047/28 B
C07C275/16 B A01N063/02 B
A01N063/00 C A01N047:28 C

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.11.04

(30) Prioridade: 1992.11.05 US 971786
1992.12.14 US 990202
1993.07.20 US 95240

(43) Data de publicação do pedido:
1995.09.13

(45) Data e BPI da concessão:
2000.01.26

(73) Titular(es):

ABBOTT LABORATORIES
100 ABBOTT PARK ROAD, ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064-6050,
E.U.A. US

(72) Inventor(es):

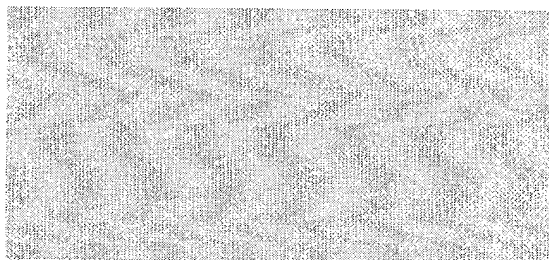
DENISE CAROL MANKER US
WILLIAM DAVID LIDSTER US
ROBERT LEE STARNES US
SUSAN CARYL MACINTOSH US

(74) Mandatário(s):

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) Epígrafe: POTENCIADOR DA ACTIVIDADE PESTICIDA DE BACILLUS

(57) Resumo:





DESCRIÇÃO

"Potenciador da actividade pesticida de *Bacillus*"

1. CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se a um factor que potencia a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus*, um pesticida químico e/ou um vírus com propriedades pesticidas, bem como a métodos para a obtenção do factor. O presente invento refere-se também a composições pesticidas que compreendem o factor e um transportador pesticida, ou o factor e um pesticida relacionado com *Bacillus*, um pesticida químico e/ou um vírus com propriedades pesticidas, bem como a métodos para utilização destas composições. O invento refere-se ainda a uma estirpe mutante, ou variante de *Bacillus*, em que este factor se obtém em maior quantidade ou tem uma actividade potenciadora maior, em comparação com a estirpe progenitora, e a métodos para a produção destas estirpes mutantes ou variantes.

2. ANTECEDENTES DO INVENTO

Todos os anos, perde-se uma porção significativa das colheitas agrícolas comercialmente importantes a nível mundial, incluindo alimentos, têxteis e várias plantas domésticas, devido a infestação por pragas, o que resulta na perda de milhões de dólares. Têm sido utilizadas várias estratégias na tentativa de controlar estas pragas.

Uma das estratégias consiste na utilização de pesticidas de largo espectro, pesticidas químicos com uma gama de actividades alargada. No entanto, existem várias desvantagens na utilização destes pesticidas químicos. Devido ao seu largo espectro de actividade, estes pesticidas poderão destruir organismos não alvo, como insectos e parasitas benéficos de pragas destruidoras. Para além disso, estes pesticidas químicos são frequentemente tóxicos para animais e humanos, e as pragas alvo desenvolvem muitas vezes resistência, quando são repetidamente expostas a estas substâncias.

Uma outra estratégia envolveu a utilização de biopesticidas, que utilizam



agentes patogénicos que ocorrem naturalmente, para o controlo das infestações das colheitas por insectos, fungos e ervas daninhas. Os biopesticidas compreendem uma bactéria que produz uma toxina, uma substância tóxica para a praga. Os biopesticidas são geralmente menos prejudiciais aos organismos não-alvo e ao meio ambiente como um todo, do que os pesticidas químicos. O biopesticida mais amplamente utilizado é o *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). O *B.t.* é um microorganismo em forma de bastonete, aeróbio, que forma esporos, amplamente distribuído. Durante o seu ciclo de esporulação, o *B.t.* produz uma proteína(s) na forma de cristal, conhecida como delta-endotoxina(s) cristalina(s), que mata as larvas de insectos. O *B.t.* é, portanto, muito útil como pesticida agrícola.

Verificou-se que algumas estirpes, e.g. *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e o *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai* são específicas para *Lepidoptera*. Verificou-se que o *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* é específico para *Diptera* (Goldberg, patente U.S. No. 4 166 112). Verificou-se que outras estirpes, e.g. *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis* (Krieg et al., 1988, Patente U.S. No. 4 766 203) são específicas para *Coleoptera*. Em 1986 (Hernnstadt et al. Bio/Technology vol. 4 305-308, 1986, patente U.S. 4 764 372, 1988), foi referido o isolamento de outra estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica para *Coleoptera*. Esta estirpe, designada por "*Bacillus thuringiensis* subesp. *san diego*", M-7, foi depositada no Northern Regional Research Laboratory, USA, com o número de depósito NRRL B-15939. No entanto, o cessionário da patente '372, Mycogen, Corp, admitiu publicamente que o *Bacillus thuringiensis* subesp. *san diego* é o *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis*. Para além disso, a patente '372 foi cedida à Novo Nordisk A/S. Foi também descrita uma estirpe de *B.t.* que é tóxica contra *Lepidoptera* e *Coleoptera* (Pedido PCT No. WO 90/13651). A toxina descrita no pedido PCT No. WO 90/13651 tem um peso molecular de 81 kd.

Durante o seu ciclo de esporulação, o *B.t.* produz uma proteína(s) na forma de cristal conhecida como delta-endotoxina(s) cristalina(s), com um peso molecular entre 27-140 kd, que por ingestão mata as larvas dos insectos. Para uma dada estirpe de *B.t.*, a actividade tóxica poderá residir numa ou mais destas proteínas cristalina. A maior parte das delta-endotoxinas são protoxinas que são convertidas proteoliticamente em polipéptidos tóxicos

menores(truncados), no intestino médio do insecto alvo (Höfte e Whiteley, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255). As delta-endotoxinas são codificadas pelos genes *cry* (proteína cristalina). Os genes *cry* foram divididos em seis classes e várias subclasses, com base nas semelhanças estruturais e especificidade pesticida. As classes principais são específicas para *Lepidoptera* (*ctyl*); específicas para *Lepidoptera* e *Diptera* (*cryII*); específicas para *Coleoptera* (*cryIII*); específicas para *Diptera* (*cryIV*) (Höfte e Whiteley, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255); específicas para *Coleoptera* e *Lepidoptera* (referidos como *cryV* por Tailor et al., 1992, Mol. Microbiol. 6:1211-1217); e específicas para *Nematoda* (designados por *cryV* e *cryVI* por Feitelson et al., 1992 Bio/Technology 10:271-275).

Já se produziram delta-endotoxinas por métodos de ADN recombinante. As delta-endotoxinas produzidas por métodos de ADN recombinante podem ser, ou não, na forma de cristal.

A delta-endotoxina de *B.t.* é insolúvel em água, excepto a pH alcalino, e é quase sempre codificada por plasmídeos. Verificou-se que algumas estirpes de *Bacillus thuringiensis* produzem um análogo do nucleótido adenina, pesticida, estável ao calor, conhecido como β -exotoxina ou turingiensina, que é por si só um pesticida (Sebesta et al., em H.D. Burges (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases, Academic Press, New York, p. 249-281, 1981). A β -exotoxina foi detectada no sobrenadante de algumas culturas de *Bacillus thuringiensis*. Tem um peso molecular de 789 e é constituída por adenosina, glucose e ácido alárico (Lüthy et al., in Kurstak (ed.), Microbial and Viral Pesticides, Marcel Dekker, New York, 1982, pp. 35-72). A sua gama de hospedeiros inclui, mas não se lhes limita, *Musca domestica*, *Mamestra configurata* Walker, *Tetranychus urticae*, *Drosophila melanogaster*, e *Tetranychus cinnabarinus*. Pensa-se que a toxicidade da β -exotoxina é devida à inibição da ARN-polimerase dirigida por ADN, por competição com o ATP. Foi demonstrado que a β -exotoxina é codificada por um plasmídeo Cry em cinco estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) e que a β -exotoxina pode ser classificada como β -exotoxina de tipo I ou tipo II (Levinson et al., 1990, J. Bacteriol. 172:3172-3179). Verificou-se que a β -exotoxina do tipo I é produzida pelo *B.t.* subesp. *thuringiensis* do serótipo 1, *B.t.* subesp. *tolworthi* do serótipo 9, e *B.t.* subesp. *darmstadiensis* do serótipo 10. Verificou-se que a β -exotoxina do tipo II



é produzida pelo *B.t.* subesp. *morrisoni*, do serótipo 8ab e que é activa contra a *Leptinotarsa texana*. Exemplos de outros factores solúveis em água isolados a partir de *B.t.* incluem a alfa-exotoxina (Luthy, 1980, FEMS Microbiol. Lett. 8:1-7); gama-exotoxinas, que são várias enzimas proteolíticas incluindo lecitinases, citinases e proteases (Forsberg et al., 1976, *Bacillus thuringiensis*: Its Effects on environmental Quality, National Research Council of Canada, NRC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Subcommittees on Pesticides and Related Compounds and Biological Phenomena); sigma-exotoxina (Argauer et al., 1991, J. Entomol. Sci. 26:206-213) e anidroturingiensina (Coll. Czechoslovak Chem. Comm. 40, 1775, 1975).

Têm sido desenvolvidos esforços na arte para se alcançar uma mortalidade aumentada com as formulações de *B.t.*. Os meios utilizados incluem a pesquisa de novas estirpes com uma mortalidade aumentada, a tentativa de manipular as estirpes actuais, tentativas de conceber formulações mais eficazes através da combinação de esporos e/ou cristais de *B.t.* com novos transportadores pesticidas, pesticidas químicos, ou agentes potenciadores (veja-se, por exemplo patente U.S. No. 5 250 515, um inibidor de tripsina). Constitui, portanto, um objectivo do presente invento potenciar a actividade pesticida de pesticidas.

3. SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento refere-se a um novo factor que, ao contrário dos factores conhecidos na arte, potencia a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus*. Especificamente, o factor de acordo com o presente invento é um potenciador. Tal como aqui definido, o termo "potenciador" é uma substância que não tem actividade pesticida significativa, e.g. tem uma LC₅₀ (LC₅₀ é a concentração de substância necessária para matar 50% da praga) superior a cerca de 3000 µg/g, testado por um bioensaio (veja-se secção 6), mas que actua aumentando a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus*, em pelo menos 50% e não impede o crescimento das larvas. Tal como referido na secção 2, outras substâncias conhecidas na arte, capazes de aumentar a actividade pesticida, tais como as delta-toxinas, inibidores de tripsina e exotoxinas, têm actividade pesticida.



Numa concretização particular, o factor é solúvel em água. Tal como aqui definido, uma substância, ou composto, é "solúvel em água" se for possível dissolver pelo menos cerca de 1 mg da substância em 1 ml de água. O factor poderá também potenciar a actividade pesticida de um pesticida químico e/ou de um vírus com propriedades pesticidas.

Tal como aqui definido, um "pesticida relacionado com *Bacillus*" é uma estirpe, um esporo, ou uma substância, e.g. proteína ou seu fragmento, de um *Bacillus* (e.g. *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus subtilis*), que possui actividade contra, ou que mata, pragas; uma substância que proporciona protecção às plantas, e.g., uma substância anti-alimento; ou um microorganismo capaz de expressar um gene de *Bacillus* que codifica para uma proteína de *Bacillus* ou fragmento seu derivado, com actividade contra, ou que mata, pragas (e.g. a delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*) e um transportador aceitável (veja-se Secção 5.2, *infra*, para exemplos destes transportadores). A praga poderá ser, por exemplo, um insecto, um nemátodo, um acarino, ou um caracol. Um microorganismo capaz de expressar um gene de *Bacillus* que codifica para uma proteína de *Bacillus*, ou seu fragmento com actividade contra, ou que mata, pragas que habitam no filopiano (a superfície das folhas das plantas) e/ou na rizosfera (o solo que envolve as raízes das plantas) e/ou em meios aquáticos e é capaz de competir com sucesso, no meio ambiente particular (colheitas ou outros habitats de insectos), com microorganismos do tipo selvagem, e proporcionando a manutenção e expressão de forma estável de um gene de *Bacillus* que codifica para uma proteína de *Bacillus*, ou um seu fragmento, com actividade contra, ou que mata, pragas. Exemplos destes microorganismos incluem, mas não se lhes limitam, bactérias, e.g. do género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, *Alcaligenes* e *Clostridium*; algas, e.g. das famílias *Cyanophyceae*, *Prochlorophyceae*, *Rhodophyceae*, *Dinophyceae*, *Chrysophyceae*, *Prymnesiophyceae*, *Xanthophyceae*, *Raphidophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Cryptophyceae*, *Euglenophyceae*, *Prasinophyceae* e *Chlorophyceae*; e fungos, em particular leveduras, e.g. dos géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*.



Tal como aqui definido, "actividade pesticida" mede a quantidade de actividade contra uma praga, através da morte ou impedimento do crescimento de uma praga, ou através da protecção da planta contra a infestação pela praga.

O invento refere-se também a uma estirpe mutante ou variante de *Bacillus*, a partir da qual se obtém um factor em grandes quantidades, comparado com a estirpe progenitora, bem como a métodos para a obtenção deste mutante ou variante.

O invento refere-se igualmente a composições pesticidas que compreendem o factor e um transportador pesticida, bem como o factor e um pesticida relacionado com *Bacillus*, um pesticida químico e/ou um vírus com propriedades pesticidas.

O invento refere-se também a métodos para a utilização das composições pesticidas de acordo com o presente invento. Numa concretização, o invento refere-se a um método para controlar uma praga, que compreende a exposição da praga a uma quantidade da composição, controladora da praga. Noutra concretização, o invento refere-se a um método para diminuir a resistência de uma praga a um pesticida relacionado com *Bacillus*, que compreende a exposição da praga a uma composição que compreende o factor e um transportador pesticida. O invento refere-se ainda a um método para potenciar a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus* que compreende a administração a uma praga exposta a um pesticida relacionado com *Bacillus* de uma composição que compreende o factor e o transportador numa quantidade eficaz para potenciar a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus*.

O invento refere-se ainda a um método para a obtenção de um factor "substancialmente puro" de acordo com o presente invento, que compreende os passos de:

- (a) fermentação de uma estirpe de *Bacillus*;
- (b) recuperação do sobrenadante de (a); e
- (c) isolamento do factor a partir do sobrenadante

Tal como aqui definido, um factor "substancialmente puro" significa um



factor que contém menos que 10% de contaminantes, por exemplo, a proteína delta-endotoxina.

O invento refere-se também a um método para a identificação do factor de acordo com o presente invento, que compreende

- (a) fermentação de uma estirpe de *Bacillus*
- (b) recuperação do sobrenadante da fermentação de (a); e
- (c) ensaio do sobrenadante de (b) quanto a potenciação de um pesticida relacionado com *Bacillus*

4. DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra de forma esquemática o procedimento geral utilizado para purificar Ia.

A Figura 2 mostra o espectro de ^{13}C RMN de Ia.

A Figura 3 mostra o espectro de RMN de prótons de Ia.

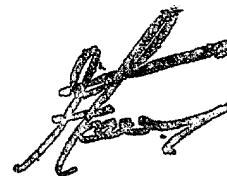
A Figura 4 mostra a estrutura de Ia deduzida. Os desvios de prótons (^1H) e de ^{13}C são apresentados em ppm, registados em D_2O .

A Figura 5 mostra um esquema de síntese para a obtenção da estrutura Ia.

5. DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DO INVENTO

O presente invento refere-se a um factor que potencia a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus*. O factor pode ter um peso molecular de cerca de 350 a cerca de 1200 ou, numa concretização específica, de cerca de 350 a cerca de 700.

O factor de acordo com o presente invento potencia a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus*, em pelo menos 1,5 vezes, a opcionalmente cerca de 1000 vezes, de preferência em cerca de 100 vezes a



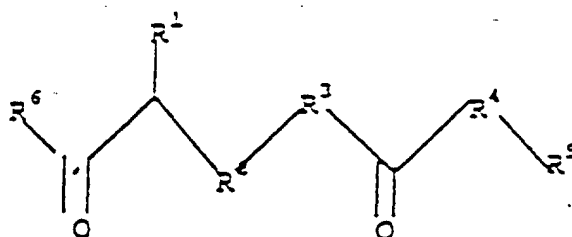
cerca de 400 vezes. Numa concretização específica, o factor de acordo com o presente invento potencia a actividade pesticida de uma delta-enterotoxina de *Bacillus thuringiensis*, incluindo, mas não se limitando a uma proteína CryI (incluindo proteína CryIA, CryIB, e CryIC), CryII, CryIII, CryIV, CryV ou CryVI, na forma de comprimento total, ou numa forma truncada, processada por proteólise, em cerca de 1,5 vezes a cerca de 1000 vezes. Numa concretização mais particular, o factor de acordo com o presente invento potencia uma delta-endotoxina de *B.t.* em cerca de 100 vezes, a cerca de 400 vezes. O factor poderá também potenciar a actividade pesticida de um pesticida químico e/ou um vírus com propriedades pesticidas.

O factor poderá ser também solúvel em água, estável em água até cerca de 100°C, durante 5 minutos, estável quando submetido à luz solar directa durante cerca de 10 horas e/ou estável a um pH de cerca de 2, durante cerca de 10 dias.

Numa concretização específica, o factor tem de 13 a 24 átomos de carbono.

Numa concretização mais específica, o factor tem de 13 a 19 átomos de carbono. Numa concretização ainda mais específica, o factor tem 13 átomos de carbono.

Numa concretização específica, o factor tem a estrutura (I)



em que

R¹ é amino, hidroxí, alquilo C₁₋₁₀, benzamida, 3,5-dinitrobenzamida, p-nitrobenzamida, halobenzamida, alquilbenzamida, tiofenamida, furanamida, pirrolamida, imidazolâmida, pirazolamida, alquilamino C₁₋₁₀, dialquilamino C₁₋₁₀,



éster de alquilo C₁₋₁₀ ou de benzilo, halogéneo ou alcoxi C₁₋₁₀;

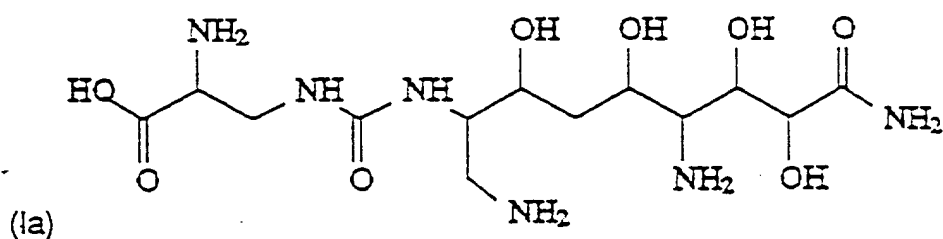
R² é (CH₂)_n, em que n é um número inteiro de 0-10;

R³ e R⁴ são independentemente (NH)_p, em que p é 0 ou 1;

R⁵ é $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{X}^1 \\ || \\ \text{CH}-\text{CHX}^2-\text{CH}_2-\text{CHX}^3-\text{CHX}^4-\text{CHX}^5-\text{CHX}^6-\text{CX}^7 \end{array}$ ou (CHOH)_qCH₂OH em que X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶ e X⁷ são independentemente NH₂, OH, acetilo, halogéneo ou alcoxi C₁₋₁₀ e q é um número inteiro de 1-10;

R⁶ é hidroxilo, amino, alcoxi C₁₋₁₀ ou benzoxi, éster benzílico, éster 3,5-dinitrobenzílico, éster p-nitrobenzílico, éster halobenzílico, éster alquilbenzílico, éster de tiofeno, éster de furano, éster de pirrolo, éster de imidazolo; ou um sal seu derivado aceitável para pesticidas, incluindo, mas não se lhes limitando, fosfato, sulfato, acetato, carbonato e nitrato.

Numa concretização mais específica, o referido factor tem a estrutura



5.1. - OBTENÇÃO DO FACTOR

O factor de acordo com o presente invento pode ser obtido a partir da fermentação de um *Bacillus* (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*). Numa concretização específica, obtém-se o factor de acordo com o presente invento a partir do sobrenadante da fermentação de um *Bacillus thuringiensis*, incluindo *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *galleriae*, *Bacillus*



thuringiensis subesp. *entomocidus*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *alesti*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *canadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *darmstadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *dendrolimus*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *finitimus*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *kenyae*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *morrisoni*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *subtoxicus*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *toumanoffi* e *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*. Numa concretização preferida, obtém-se o factor a partir do sobrenadante de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai*, ou *Bacillus thuringiensis* subesp. *galleriae*, ou de mutantes seus derivados, que possuem substancialmente a mesma actividade de potenciação. Numa concretização específica, o factor é recuperado a partir de um mutante cry'spo de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*.

Numa concretização, obtém-se o factor a partir de um mutante de *Bacillus*, particularmente um *Bacillus thuringiensis*, em que o factor é produzido em maiores quantidades, ou de um mutante de *Bacillus thuringiensis* em que a actividade potenciadora do factor que se obtém a partir do mutante é maior, em comparação com a estirpe progenitora. "Estirpe progenitora" tal como aqui definido, refere-se à estirpe de *Bacillus* original, antes da mutagénese. A fim de obter estes mutantes, a estirpe progenitora pode ser, por exemplo, tratada com um agente mutagénico por meios químicos, como por exemplo, com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ou metanossulfonato de etilo, radiação gama, raios-X ou radiação UV. Mais concretamente, num método para efectuar a mutação de estirpes de *Bacillus* e seleccionar os mutantes, a estirpe progenitora é:

- i) tratada com um mutagénio;
- ii) os mutantes assim tratados são crescidos num meio adequado para a selecção de uma estirpe mutante
- iii) selecção de uma estirpe mutante

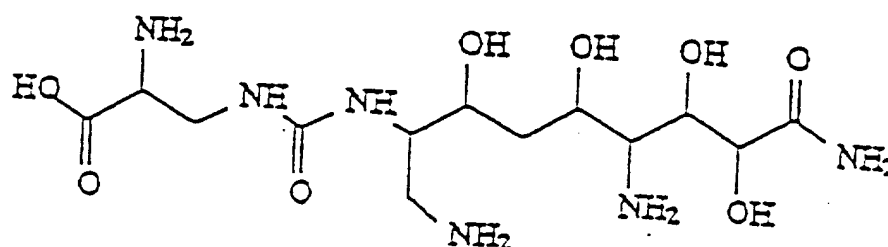
De acordo com uma concretização preferida deste método, as colónias seleccionadas são crescidas num meio de produção normal e faz-se uma selecção final das estirpes capazes de produção aumentada do factor.

A cultura de *Bacillus* pode ser efectuada utilizando meios e técnicas de



fermentação conhecidos na arte (veja-se por exemplo, Rogoff et al., 1969, J. Invertebrate Path. 14:122-129; Dulmage et al., 1971, J. Invertebrate Path. 18:353-358; Dulmage et al., em Microbial Control of Pests and Plant Diseases, H.D. Burges ed., Academic Press, N.Y. 1980). No final do ciclo de fermentação, pode-se recuperar o sobrenadante através da separação de esporos e cristais de *B.t.* do caldo de fermentação, utilizando meios conhecidos na arte, e.g. centrifugação e/ou ultrafiltração. O factor de acordo com o presente invento está contido no sobrenadante, que pode ser recuperado utilizando meios bem conhecidos na arte, e.g. ultrafiltração, evaporação e secagem por pulverização. Este procedimento é descrito em maior pormenor nas secções seguintes.

Alternativamente, o factor de acordo com o presente invento pode ser obtido através de síntese química, utilizando procedimentos conhecidos na arte. Como referido acima, numa concretização específica, o factor tem a estrutura (Ia)

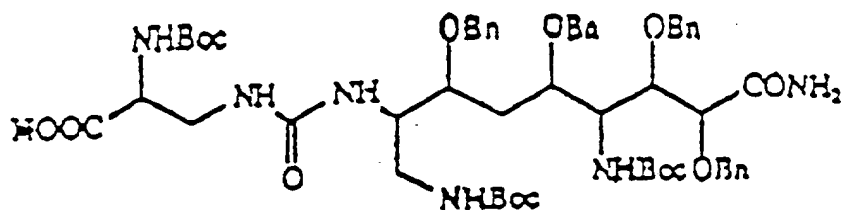


Na Figura 5 apresenta-se um esquema de síntese. O ácido 2,3-diaminopropiónico (DAP) é protegido utilizando Boc (carbamato de t-butilo). O DAP totalmente protegido em N pode ser convertido no imidazólio por tratamento com carbonato diimidazóico, para originar o composto A (veja-se Figura 5). O composto B (veja-se Figura 5) pode ser preparado a partir de ácido 3-amino-3-desoxialdónico por substituição selectiva do álcool primário terminal, utilizando um grupo rejeitado de benzenossulfonilo. Consegue-se a condensação de A e B sob condições Julia (NaH, THF), seguido de dessulfurização com níquel de Raney. O grupo ceto no composto C (veja-se Figura 5), pode ser estereosselectivamente reduzido por controlo da quelação, utilizando tris-acetoxiboro-hidreto de sódio. O C desprotegido pode ser tratado com isocianato D derivado de DAP, a fim de originar o derivado ureido correspondente, que será desprotegido por hidrogenólise, para originar o composto (Ia).

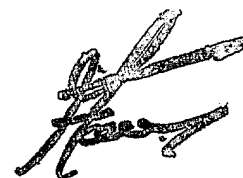


Numa concretização, os grupos amino de (Ia), obtido de forma sintética, ou a partir do sobrenadante de um *Bacillus*, podem ser acilados, ou com cloreto ácido, ou anidrido ácido na presença de hidróxido de sódio aquoso, a fim de se obterem triacetamidas, tribenzamidas e trioctamidas de (Ia). Alternativamente, os grupos amino e hidroxí podem ser per-acilados, formando inicialmente os ésteres de metilo utilizando um excesso de diazometano, seguindo-se a per-acilação nos grupos amino e hidroxilo, por tratamento com um anidrido de acilo (e.g. anidrido acético, anidrido de ácido benzóico, anidrido de ácido n-octanóico) em piridina. Noutra concretização, partindo de um derivado acilado, pode-se preparar um éster de amida misto, por metilação selectiva do carboxilo, seguida de tratamento com um anidrido de acilo em piridina. Noutra concretização, o ácido carboxílico pode ser derivatizado para formar ésteres de alquilo ou arilo ou amida. Ainda noutra concretização, poderão ocorrer oxidações selectivas dos substituintes hidroxí em cetona e análogos de ácido carboxílico de cadeia encurtada.

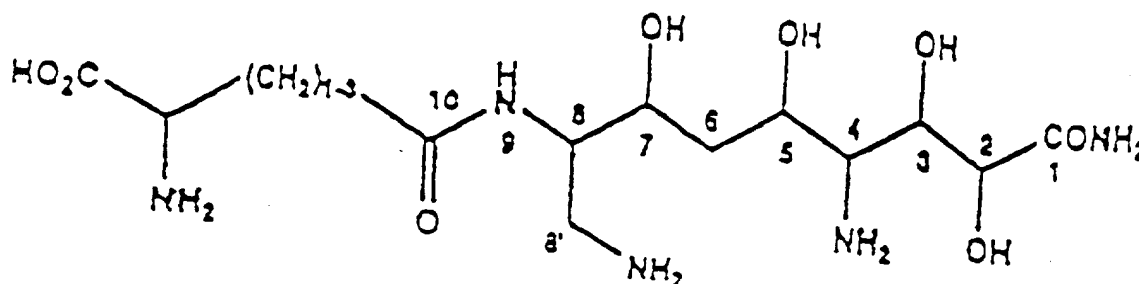
Noutra concretização, os grupos amino de (Ia) podem ser protegidos como carbamatos de t-butilo, por tratamento com anidrido de Boc, na presença de carbonato de sódio aquoso, seguido de protecção selectiva dos grupos hidroxilo utilizando brometo de benzilo em hidreto de sódio para originar (X), apresentado a seguir.



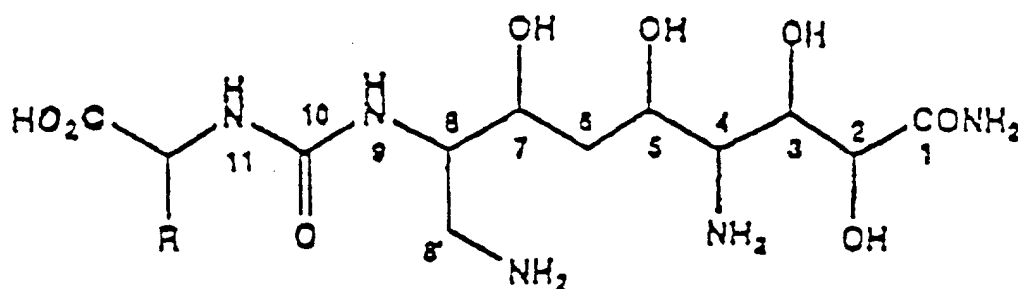
Este derivado totalmente protegido pode ser hidrolisado na ligação ureido utilizando hidróxido de sódio aquoso. Isto pode ser seguido de acilação selectiva com, por exemplo, aminoácidos, ácidos hidroxicarboxílicos ou ácido dicarboxílico, incluindo, mas não se lhes limitando, ácido aspártico, ácido glutâmico, ácido 2-aminoadípico, ácido málico, ácido adípico, na presença de N,N-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC). Os grupos N-Boc e O-benzilo podem ser



removidos por clivagem com ácido moderado e hidrogenólise sobre paládio em carvão activado, para se obter a estrutura (II) a seguir apresentada



Ainda noutra concretização, o composto (X) totalmente protegido pode ser tratado com vários isocianatos derivados a partir de aminoácidos, incluindo mas não se lhes limitando, glicina, alanina, valina, fenilalanina, fenilglicina, metionina, normetionina, para se obterem derivados 9-ureido. Os grupos protectores podem ser removidos, como acima descrito, para se obter a estrutura (III)

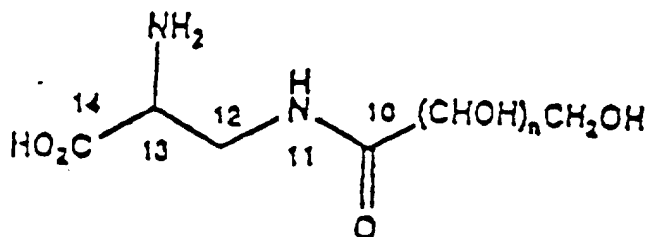


em que R é um aminoácido que ocorre naturalmente.

Ainda noutra concretização, o ácido 2,3-diaminopropiónico é protegido na posição 2, utilizando Boc na presença de carbonato de sódio aquoso, para originar ácido N-2-Boc-2,3-diaminopropiónico. Este derivado pode ser acilado com ácidos per-acetilaldónico, incluindo, mas não se lhes limitando, ácido penta-O-acetil-D-glucónico, ácido penta-O-acetil-D-manóico, ácido penta-O-acetil-D-galactónico, ácido hepta-O-acetil-D-eritro-L-manoacteoanóico, na presença de DCC, seguido de solvólise dos grupos acetilo e grupos Boc na presença de amónia metanólica (Chem. Pharm. Bull., 1985, 33:509-514). Os

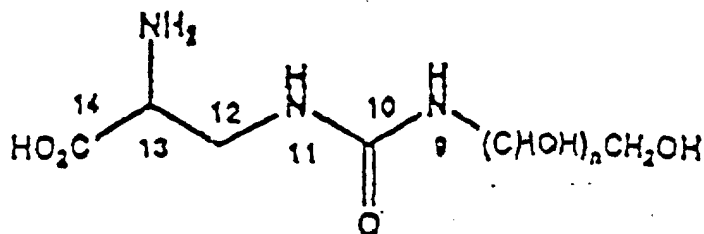


análogos de poli-hidroxiamida com a estrutura (IV) podem ser obtidos por tratamento com ácido moderado



em que n é 1-10. Pode-se aplicar a mesma sequência utilizando ácidos aldéricos per-acetilados, por exemplo, D-glucaro-6,3-lactona, para originar o poli-hidroxi com grupos carboxamida terminais primários.

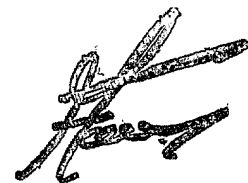
Ainda noutra concretização, faz-se o acoplamento de um derivado de ácido 2,3-diamonopropiónico protegido com um isocianato derivado a partir de um derivado de açúcar aminado com um equivalente de fosgénio. O açúcar aminado, numa concretização, poderá ser uma 1- ou 2-amino-hexose (e.g., 1-amino-1-desoxisorbitol, glucosamina, manosamina) e tem a estrutura (V)



em que n é 1-10.

A purificação do factor de acordo com o presente invento pode ser realizada por vários procedimentos conhecidos na arte, incluindo, mas não se lhes limitando, cromatografia (e.g. cromatografia em coluna de permuta iónica, de afinidade e de exclusão por tamanhos), procedimentos electroforéticos, solubilidade diferencial, extracção ou qualquer outra técnica convencional conhecida na arte.

A actividade potenciadora do factor de acordo com o presente invento,



da actividade pesticida do pesticida relacionado com *Bacillus*, vírus com actividade pesticida ou pesticida químico, contra diversas pragas, pode ser determinada utilizando procedimentos conhecidos na arte, como a incorporação numa dieta artificial para insectos, revestimento de uma dieta artificial, pincelagem de folhas, imersão das folhas e pulverização foliar. Na secção 6, *infra* são fornecidos exemplos específicos destes ensaios.

5.2. COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM O FACTOR

O factor do presente invento descrito *supra* pode ser formulado juntamente com um pesticida relacionado com *Bacillus* e um transportador aceitável numa composição(s) pesticida que é, por exemplo, uma suspensão, uma solução, uma emulsão, um pó pulverulento, grânulos dispersáveis, um pó molhável, um concentrado emulsionável, um aerossol ou grânulos impregnados. Exemplos destes pesticidas relacionados com *Bacillus* incluem, mas não se lhes limitam, pesticidas produzidos por *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (*B.t.k.*) (comercializado como DIPEL™ da Abbott Laboratories, Inc. JAVELIN™ da Sandoz, BIOBIT™ da Novo Nordisk A/S, FORAY™ da Novo Nordisk A/S, MVP™ da Mycogen, BACTOSPEINE™ da Novo Nordisk A/S e THURICIDE™ da Sandoz) e *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai* (*B.t.a.*) (comercializado como FLORBAC™ da Novo Nordisk A/S e XENTAIR™ da Abbott Laboratories, Inc.). Outros exemplos incluem, mas não se lhes limitam, *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* (*B.t.i.*) (comercializado como BACTIMOS™ pela Novo Nordisk A/S e VECTOBAC™ da Abbott Laboratories, Inc.); *Bacillus sphaericus* (*B. sphr.*) (comercializado como SPHERIMOS™ de Novo Nordisk A/S); *Bacillus thuringiensis kurstaki/tenebrionis* (comercializado como FOIL™ da Ecogen); *Bacillus thuringiensis aizawai/kurstaki* (*B.t.a./B.t.k.*) (comercializado como CONDOR™ da Ecogen e AGREE™ da Ciba-Geigy); e *Bacillus thuringiensis kurstaki/kurstaki* (*B.t.k./B.t.k.*) (comercializado como CUTLASS™ da Ecogen). O vírus com actividade contra pragas pode ser um baculovírus, e.g. o vírus de poli-hedrose nuclear (NPV) de *Autographa californica*, NPV de *Syngrapha falcifera*, GV (vírus de granulose) de *Cydia pomonella*, NPV de *Heliothis zea*, NPV de *Lymantria dispar*, NPV de *Orgyia pseudotsugata*, NPV de *Spodoptera exigua*, NPV de *Neodiprion lecontei*, NPV de *Neodiprion sertifer*, NPV de *Harrisina brillians* e NPV de *Endopiza viteana* Clemens.

Em composições que compreendem o factor e um pesticida relacionado



com *Bacillus*, o factor poderá estar presente numa quantidade de pelo menos cerca de 0,002 g/BIU. Numa concretização, o factor pode ter a estrutura Ia e/ou pode estar presente numa quantidade de pelo menos cerca de 0,1 g/BIU ou 0,05 g de factor por g de delta-endotoxina e esporos de *Bacillus*, opcionalmente de cerca de 300 g/BIU ou 150 g de factor por g de delta-endotoxina e esporos de *Bacillus*, de preferência 2 g/BIU ou 1g de factor por g de delta-endotoxina e esporos de *Bacillus*. Tal como aqui definido, "BIU" é a unidade internacional de biliões, determinada por bioensaio. O bioensaio compara a amostra com um material de referência padrão de *Bacillus*, utilizando a *Ttrichoplusia ni* ou outra praga como insecto padrão do teste. A potência é determinada dividindo a LC₅₀ padrão de referência e multiplicando pela potência padrão de referência.

Noutra concretização, a composição poderá compreender o factor de acordo com o presente invento numa forma substancialmente pura, ou um sobrenadante de *Bacillus* na forma seca, concentrada, ou líquida, e um transportador adequado para pesticida, cujos exemplos estão descritos *infra*. Esta composição pode ser aplicada separadamente a uma planta, e.g. plantas transgénicas. Especificamente, a composição pode ser aplicada a uma planta que contém previamente um gene de *Bacillus*, e.g. um gene de *B.t.* Noutra concretização, a composição pode ser aplicada a uma planta previamente exposta a uma composição de *Bacillus*, e.g. *B.t.*, presente numa quantidade de pelo menos cerca de 0,01 % até cerca de 60%.

A composição que compreende o factor e o transportador aceitável para pesticidas para além de controlar a praga, pode também ser utilizada para diminuir a resistência de uma praga a um pesticida. Alternativamente, a composição pode ser utilizada para potenciar um pesticida relacionado com *Bacillus*. Numa concretização, a composição pode ser aplicada ao mesmo tempo que o pesticida numa quantidade de pelo menos cerca de 2 g de factor/BIU até, opcionalmente, cerca de 300 g de factor/BIU. Noutra concretização, a composição pode ser aplicada até cerca de 24 horas após o pesticida, como um adjuvante, para aumentar a eficácia do pesticida residual.

As composições acima descritas podem ser obtidas pela adição de um agente tensioactivo, um transportador inerte, um conservante, um humectante, um estimulante de apetite, um agente de atracção, um agente de encapsulação,



um aglutinante, um emulsionante, um corante, um protector de U.V., um tampão, um agente de fluidez, ou outro componente para facilitar o manuseamento e a aplicação do produto a pragas alvo particulares.

Os agentes tensioactivos adequados incluem, mas não se limitam lhes, compostos aniónicos como um carboxilato, por exemplo um carboxilato de um metal de um ácido gordo de cadeia longa; um N-acilsarcosinato; mono ou di-ésteres de ácido fosfórico com etoxilatos de álcoois gordos ou sais destes ésteres; sulfatos de álcoois gordos, como dodecilsulfato de sódio, octadecilsulfato de sódio ou cetilsulfato de sódio; sulfatos de álcoois gordos etoxilados, sulfatos de alquilfenol etoxilados; sulfonatos de lenhina; sulfonatos de petróleo; alquilarilsulfonatos, como alquilbenzenossulfonatos ou (alquil inferior)naftalenossulfonatos, e.g. butilnaftalenossulfonato; sais de condensados sulfonados de naftaleno-formaldeído, sais de condensados sulfonados de fenol-formaldeído; ou sulfonatos mais complexos como sulfonatos de amida, e.g. o produto de condensação sulfonado de ácido oleico e N-metiltaurino ou os sulfossuccinatos de dialquilo, e.g. o sulfonato de sódio ou succinato de dioctilo. Os agentes não iónicos incluem produtos de condensação de ésteres de ácidos gordos, álcoois gordos, amidas de ácidos gordos ou fenóis gordos substituídos com alquilo ou alcenilo com óxido de etileno, ésteres gordos de éteres de álcool poli-hídrico, e.g. ésteres de ácidos gordos de sorbitano, produtos de condensação destes ésteres com óxido de etileno, e.g. ésteres de ácidos gordos de sorbitano-polioxietileno, copolímeros de blocos de óxido de etileno e óxido de propileno, glicóis acetilénicos como 2,4,7,9-tetraetil-5-decin-4,7-diol, ou glicóis acetilénicos etoxilados. Exemplos de um agente tensioactivo catiónico incluem, por exemplo, uma mono-, di- ou poliamina alifática como um acetato, naftenato ou oleato; uma amina contendo oxigénio, como óxido de amina ou polioxietileno-alquilamina; uma amina ligada a amida, preparada por condensação de um ácido carboxílico com uma di- ou poliamina; ou um sal de amónio quaternário.

Exemplos de materiais inertes incluem, mas não se lhes limitam, minerais inorgânicos como o caulino, filossilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos ou materiais botânicos como a cortiça, a espiga do milho em pó, casca de amendoim, casca de arroz e cascas de noz.

As composições de acordo com o presente invento podem estar numa



forma adequada para aplicação directa ou como um concentrado ou composição primária que requer diluição com uma quantidade adequada de água, ou outro diluente, antes de aplicação. A concentração de pesticida varia, dependendo da natureza da formulação particular, especificamente se é um concentrado ou se é para utilização directa. A composição contém 1 a 98% de um transportador inerte sólido ou líquido, e 0 a 50%, de preferência 0,1 a 50%, de um tensioactivo. Estas composições serão administradas à taxa indicada no rótulo para o produto comercial, de preferência cerca de 0,009-4,5 kg/hectare, quando na forma seca, e cerca de 0,012-11,68 litros/hectare, quando na forma líquida.

Numa outra concretização, o *Bacillus*, *e.g.*, a delta-endotoxina cristalina de *B.t.*, e o factor potenciador, podem ser tratados antes da formulação para prolongar a actividade pesticida, quando aplicados num meio ambiente de uma praga alvo, desde que o pré-tratamento não seja prejudicial à delta-endotoxina cristalina ou ao factor. Este tratamento pode ser realizado por meios químicos e/ou físicos, desde que o tratamento não afecte de forma prejudicial as propriedades da(s) composição(ões). Exemplos de reagentes químicos incluem, mas não se lhes limitam, agentes de halogenação; aldeídos como o formaldeído e gluteraldeído; anti-infectantes, como o cloreto de zefiran, álcoois como o isopropanol e etanol; e fixantes histológicos, como o fixante de Bouin e o fixante de Helly (veja-se, por exemplo, Humason, *Animal Tissue Techniques*, W.H. Freeman e Co., 1967)

As composições de acordo com o invento podem ser aplicadas directamente à planta por, por exemplo, pulverização de líquido ou pulverização de pó, na altura em que a praga começa a aparecer na planta, ou antes do aparecimento de pragas, como medida preventiva. As plantas a ser protegidas no âmbito do presente invento incluem, mas não se lhes limitam, cereais (trigo, cevada, centeio, aveia, arroz, sorgo e colheitas relacionadas), beterraba (beterraba sacarina e beterraba de forragem) drupa, pomos e fruta tenra (maçãs, pêras, ameixa, pêssegos, amêndoas, cerejas, morangos, framboesas e amoras), plantas leguminosas (alfafa, feijão, lentilhas, ervilhas, soja), plantas oleosas (colza, mostarda, papoila, azeitonas, girassóis, cocos, plantas com óleo de rícino, sementes de cacau, amendoins), plantas pepinosas (pepino, ervilha de grão, melões), plantas fibrosas (algodão, linho, cânhamo, juta), frutos citrinos (laranjas, limões, toranja, tangerina), vegetais (espinafres, alface, espargos,

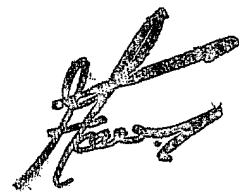
couves e outras brássicas, cenouras, cebolas, tomates, batatas, pimentão doce), lauráceas (abacates, canela, cânfora), árvores de folha caduca e coníferas (e.g. tílias, teixos, carvalhos, amieiros, álamos, videiros, abetos, lariços, pinheiros) ou plantas como o milho, turfa, tabaco, noz, café, cana de açúcar, chá, videira, lúpulo, bananas e plantas de borracha natural, bem como plantas ornamentais. Em todos os casos, o modo preferido de aplicação é por pulverização das folhas. É geralmente importante obter um bom controlo das pragas nas fases iniciais do crescimento da planta, uma vez que esta é a altura em que a planta pode ser danificada de forma mais grave. O líquido ou o pó de pulverização podem conter de forma conveniente, outro pesticida, se for considerado necessário. Numa concretização preferida, a composição de acordo com o invento é aplicada directamente na planta.

As composições de acordo com o presente invento podem ser eficazes contra pragas que incluem, mas não se lhes limitam, pragas da ordem *Lepidoptera*, e.g. *Achroia grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon*, *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatilis*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Colias eurytheme*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia funeralis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Diatraea grandiosella*, *Diatraea saccharalis*, *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Ephestia elutella*, *Erannis tilaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrsisalis*, *Malacosoma* sp., *Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata*, *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta*, *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Ostrinia nubilalis*, *Paleacrita vernata*, *Papilio cresphontes*, *Pectinophora gossypiella*, *Phryganidia californica*, *Phyllonorycter blancardella*, *Pieris napi*, *Pieris rapae*, *Plathypena scabra*, *Platynota flouendana*, *Platynota*



stultana, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella*, *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta*, *Pseudoplasia includens*, *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonota ocellana*, *Spodoptera* sp., *Thaurnstopoea pityocampa*, *Tineola bosselliella*, *Trichoplusia ni*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges curialis*, *Yponomeuta padella*; *Diptera* e.g. *Aedes* sp., *Andes vittatus*, *Anastrepha ludens*, *Anastrepha suspensa*, *Anopheles barberi*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Armigeres subalbatus*, *Calliphora stygia*, *Calliphora vicina*, *Ceratitis capitata*, *Chironomus tentans*, *Chrysomya rufifacies*, *Cochliomyia macellaria*, *Culex* sp., *Culiseta inornata*, *Dacus oleae*, *Delia antiqua*, *Delia platura*, *Delia radicum*, *Drosophila melanogaster*, *Eupeodes corollae*, *Glossina austeni*, *Glossina brevipalpis*, *Glossina fuscipes*, *Glossina morsitans centralis*, *Glossina moristans morsitans*, *Glossina moristans submorsitans*, *Glossina pallidipes*, *Glossina palpalis gambiensis*, *Glossina palpalis palpalis*, *Glossina tachinoides*, *Haemagogus equinus*, *Haematobius irritans*, *Hypoderma bovis*, *Hydoderma lineatum*, *Leucopis ninae*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia shannoni*, *Lycoriella mali*, *Mayetiola destructor*, *Musca autumnalis*, *Musca domestica*, *Neobelleria* sp., *Nephrotoma suturalis*, *Ophyra aenescens*, *Phaenicia sericata*, *Phlebotomus* sp., *Phormia regina*, *Sabethes cyaneus*, *Sarcophaga bullata*, *Scatophaga stercoraria*, *Stomoxys calcitrans*, *Toxorhynchites amboinensis*, *Tripteroidea bambusa*; *Coleoptera*, e.g. *Leptinotarsa* sp., *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus chinensis*, *Epilachna varivestis*, *Pyrrhalta luteola*, *Cylas formicarius elegantulus*, *Listronotus oregonensis*, *Sitophilus* sp., *Cyclocephala borealis*, *Cyclocephala immaculata*, *Macroductylus subsp. inosus*, *Popilla japonica*, *Rhizotrogus majalis*, *Aplphitobius diaperinus*, *Palorus ratzeburgi*, *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum*, *Tribolium destructor*; *Acari*, e.g. *Oligonychus pratensis*, *Panonychus ulmi*, *Tetranychus urticae*; *Hymenoptera*, e.g. *Iridomyrmex humilis*, *Solenopsis invicta*; *Isoptera*, e.g. *Reticulitermes hesperus*, *Reticulitermes flavipes*, *Coptotermes formosanus*, *Zootermopsis angusticollis*, *Neotermes connexus*, *Incisitermes minor*, *Incisitermes immigrans*; *Siphonaptera*, e.g. *Ceratophyllus gallinae*, *Ceratophyllus niger*, *Nosopsylla fasciatus*, *Leptopsylla segnis*, *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Echinophaga gallinacea*, *Pulex irritans*, *Xenopsylla cheopis*, *Xenopsylla vexabilis*, *Tunga penetrans*; *Tylenchida*, e.g. *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus penetrans*.

Os exemplos seguintes são apresentados a título ilustrativo



6. EXEMPLO: CARACTERIZAÇÃO DE Ia

Tal como aqui descrito em pormenor Ia é recuperado e purificado. A caracterização de Ia é descrita em pormenor *infra*.

6.1. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE Ia

Faz-se a fermentação de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* estirpe EMCC0086 (depositada no NRRL como B-21147) durante 72 horas, a 30°C, num meio constituído por uma fonte de carbono, como amido, amido hidrolisado ou glucose, e uma fonte de azoto, como uma proteína, proteína hidrolisada ou extracto solúvel de maceração do milho. A produção de Ia é detectada a 13 horas de fermentação. Verifica-se um pico de actividade a aproximadamente 30 horas.

Recupera-se o sobrenadante da fermentação de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* por centrifugação e em seguida clarifica-se por ultrafiltração através de uma membrana de MW-CO (limite de exclusão de peso molecular) de 30 kDa, utilizando um sistema UF Rhone Poulenc. A filtração de 30 kDa removeu quaisquer restos celulares, delta-endotoxina cristalina, esporos, e proteínas solúveis com uma massa molecular superior a 30 kDa, remanescentes. O permeato é concentrado 10 vezes por evaporação. O permeato é centrifugado e em seguida filtrado através de 0,2 μ para remoção adicional de material insolúvel do caldo, resultando um caldo límpido que contém Ia.

A purificação de Ia até à homogeneidade é conseguida utilizando um processo de purificação de múltiplos passos, apresentado de forma esquemática na Figura 1. Juntamente com o protocolo de recuperação acima descrito, a purificação prosseguiu com um passo de ultrafiltração a 5 kDa. O permeato da ultrafiltração a 5 kDa é adsorvido numa resina de permuta catiónica Sulfopryl (SP) e eluído com uma solução de acetato de amónio. O composto é em seguida concentrado aproximadamente 30x por liofilização, e o sal e outros contaminantes são removidos com uma coluna de exclusão por tamanhos P2 da BioRad. O conjunto reunido da coluna P2 é corrido numa coluna de permuta catiónica SP de HPLC de alta resolução, o que originou um composto



homogêneo. O sal contaminante é removido por liofilização repetida.

A actividade é monitorizada por um micro-bioensaio de *Spodoptera exigua* e a pureza é determinada por electroforese capilar. A amostra que consistia em 50 µl de Ia e 50 µl de proteína CryIA(c) (15 µg/ml) purificada a partir de BIOBIT™ FC (100 µl) é aplicada a poços individuais de um tabuleiro gelatinoso que contém 500 µl de dieta de insecto artificial solidificada. Os tabuleiros que contêm as várias amostras são secos ao ar. Adicionam-se dois a quatro *Spodoptera exigua* da 2ª ou início da 3ª instar aos poços que contêm a amostra seca. Os poços são selados com uma cobertura de "mylar" perfurada e são incubados 2-3 dias a 30°C. O nível de atraso do crescimento e a percentagem de mortalidade são então registados. Tipicamente, correm-se 5 poços réplica para cada amostra.

6.2. ELUCIDAÇÃO DA ESTRUTURA

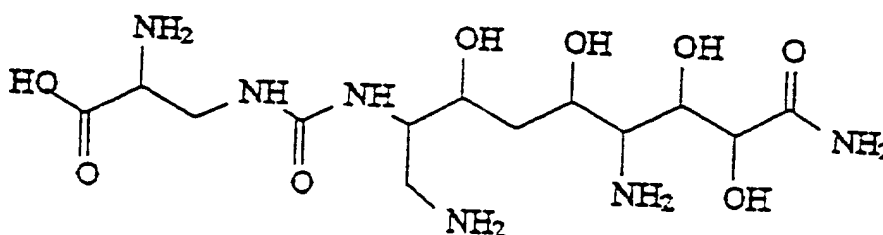
Verificou-se que o composto activo é solúvel em água mas não é solúvel em solventes orgânicos. É carregado positivamente e reagiu com ninidrina, como evidenciado por cromatografia em camada fina de sílica. O RMN de ^{13}C e de protões do composto são apresentados na Figura 2 e 3, respectivamente. As experiências de RMN de ^{13}C revelaram a presença de 13 carbonos. Uma experiência DEPT determinou que existem três carbonos quaternários(C), sete metinos (CH), três metilenos (CH_2) e nenhum grupo metilo (CH_3). Utilizando experiências de acoplamento de protões como o desacoplamento 1-D e COSY, identifica-se um sistema de spin largo contendo oito carbonos. Para além disso, está presente um sistema de spin menor que consiste em dois carbonos. Uma experiência de correlação bidimensional de carbono-protão (HETCOR) permitiu atribuir a ressonância de cada protão na molécula ao seu carbono ligado (veja-se Figura 4).

O tratamento do composto activo (13 mg) com anidrido acético em piridina resultou na formação de um derivado acetilado que é muito menos polar. Este derivado é purificado por HPLC para originar 3 mg de derivado acetilado puro. A análise de espectroscopia de massa revelou que o derivado tem 7 acetatos e um peso molecular de 690, o que origina um peso molecular de 396 e indica que está presente um número par de azotos. Além disso,

também são detectados fragmentos de 6 acetatos e 5 acetatos. Os dados de alta resolução para os iões filhos dos 5 e 6 acetatos são 645,2594 (6 acetatos) e 607,2519 (5 acetatos), o que indica a seguinte fórmula molecular para Ia, $C_{13}H_{28}N_6O_8$.

O tratamento do composto activo (13 mg) com HCl 6N originou um derivado que é positivo para ninidrina. Estes resultados indicam a presença de ligações peptídicas. O derivado tinha o mesmo valor de R_f , tal como determinado por cromatografia em camada fina, que o ácido 2,3-diaminopropiónico. Estes resultados juntamente com os dados de RMN, sugerem a presença de ácido 2,3,-diaminopropiónico.

Foi elucidada a seguinte estrutura para Ia:



Esta pode ser classificada como uma ureidoamida. Os constituintes incluem 2 carboxilos (1 amidado), uma ureia, três grupos amino, e quatro hidroxilo. Contém sete centros quirais.

6.3. PROPRIEDADES DE Ia

Verificou-se que o Ia isolado potencia a actividade das proteínas pesticidas delta-endotoxinas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai* contra *Spodoptera exigua*, independentemente da forma das proteínas pesticidas. A actividade pesticida dos cristais isolados, formulados, de proteínas CryIA de comprimento total (130 kDa de massa molecular) ou truncadas (~65 kDa de massa molecular), de *B.t.k.* são todos potenciados. A actividade de inclusões de CryII e CryIC também é potenciada. Também se verifica que potencia a actividade das proteínas individuais truncadas CryIA(a), (b) e (c). Verifica-se que o tempo de incubação de Ia com a proteína Cry não é crítico para a bioactividade. No entanto, o Ia é



inactivo sozinho. Verifica-se que o nível de potenciação é de 100-200 vezes para as proteínas CryIa truncadas, inclusões CryII e CryIC e aproximadamente de 320 vezes para CryIa(c) de comprimento total (vejam-se as tabelas I e II, respectivamente). Especificamente, para a proteína de comprimento total, 0,75 µg/ml de CryIa(c) produziram a mesma pontuação de mortalidade/atraso do crescimento do insecto quando o Ia está incluso, que 240 µg/ml de CryIa(c) sozinho. No caso de CryIa(c) truncado, uma DO_{280} de 0,0006 resultou na mesma pontuação para o atraso do crescimento em combinação com Ia, do que a mesma amostra de CryIa(c) testada sozinha com uma DO_{280} de 0,075. As inclusões de CryII, numa concentração de 0,6 µg/ml originaram a mesma pontuação para o atraso do crescimento e uma mortalidade semelhante em combinação com Ia, do que a proteína CryII sozinha a 75 µg/ml, uma potenciação de 125 vezes. As inclusões de CryIC, a 0,3 µg/ml com a adição de Ia originaram uma mortalidade e uma pontuação para o atraso do crescimento semelhantes a 75 µg/ml da proteína CryIC sozinha, o que reflecte um nível de potenciação de 250 vezes. A concentração da proteína CryIA que atrasou o crescimento, conduziu à morte por adição de Ia.

Verificou-se que o Ia é estável após fervura durante 5 minutos, mas perde toda a actividade na autoclavagem ($> 190^{\circ}\text{C}$). Além disso, é estável quando submetido à luz solar directa durante pelo menos 10 horas. O Ia é estável a pH 2 durante 3 dias, mas instável a pH 12. Verifica-se que perde toda a actividade quando exposto a ácido periódico ou HCl concentrado.

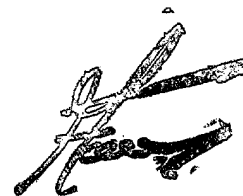


TABELA I
EFEITOS POTENCIADORES DE Ia COM A PROTEÍNA DE *Bt* TRUNCADA PURIFICADA

<u>Proteína de <i>Bt</i></u>		<u><i>Spodoptera Exigua</i></u>		
<u>Tipo</u>	<u>DO280</u>	<u>Ia</u>	<u>Mortalidade*</u>	<u>Pontuação do atraso do crescimento†</u>
CryIa(a)	0,055	-	0/5	2,2
	0,040	-	0/5	2,2
	0,020	-	0/5	2,0
	0,020	+	2/5	0,0
	0,010	+	0/5	0,2
	0,005	+	0/5	0,0
	0,0025	+	0/5	0,4
	0,0012	+	0/5	1,8
	0,0006	+	0/5	1,6
CryIA(c)	0,075	-	0/5	3,4
	0,040	-	0/5	2,6
	0,020	-	0/5	2,8
	0,020	+	1/5	0,0
	0,010	+	0/5	0,2
	0,005	+	1/5	0,0
	0,0025	+	2/5	2,0
	0,0012	+	0/5	1,0
	0,0006	+	1/5	1,0
Nenhum	NA	+	0/5	4,0
Nenhum	NA	-	0/5	4,0

* Mortalidade = #insectos mortos / #total de insectos após 2 dias

† A Pontuação do atraso do crescimento é definida pelo tamanho médio das larvas de insecto vivas no final do bioensaio: 4,0= controlo não tratado, 3,0= 75% do tamanho do controlo não tratado, 2,0= 50% do tamanho do controlo não tratado, 1,0= 25% do tamanho do controlo não tratado, 0,0= nenhum crescimento ou tamanho não alterado desde o início da experiência.



TABELA II
EFEITOS POTENCIADORES DE Ia COM A PROTEÍNA DE *Bt*

<u>Proteína de <i>Bt</i></u>		<u><i>Spodoptera Exigua</i></u>		
<u>Tipo</u>	<u>µg/ml</u>	<u>Ia</u>	<u>Mortalidade*</u>	<u>Pontuação do atraso do crescimento †</u>
CryIA(c)	240	—	1/5	0,5
	120	—	0/5	2,2
	60	—	0/5	2,2
	30	-	0/5	4,0
	60	+	5/5	—
	30	+	5/5	—
	15	+	4/5	0,0
	3	+	4/5	1,0
	0,8	+	2/5	1,6
CryII	300	—	1/5	0,8
	150	—	2/5	0,7
	75	—	1/5	0,2
	38	-	0/5	0,8
	19	-	0/5	1,6
	9	-	0/5	1,8
	5	-	1/5	4,0
	38	+	3/5	1,0
	19	+	2/5	0,5
	9	+	3/5	0,0
	5	+	1/5	0,5
	2,4	+	1/5	0,0
	1,2	+	3/5	0,5
	0,6	+	2/5	0,3
CryII	300	—	2/5	0,3
	150	—	2/5	0,0
	75	—	1/5	0,8
	38	-	0/5	3,2
	38	+	5/5	—
	19	+	5/5	—
	9	+	5/5	—
	5	+	4/5	0,0
	2,4	+	1/5	0,0
	1,2	+	5/5	—
	0,6	+	3/5	1,5
	0,3	+	2/5	1,3
Nenhum	NA	-	0/5	4,0
Nenhum	NA	+	0/5	4,0

* Mortalidade = #insectos mortos / #total de insectos após 2 dias

† a Pontuação do atraso do crescimento é definida pelo tamanho médio das larvas de insecto vivas no final do bioensaio: 4,0= controlo não tratado, 3,0= 75% do tamanho do controlo não tratado, 2,0= 50% do tamanho do controlo não tratado, 1,0= 25% do tamanho do controlo não tratado, 0,0 = nenhum crescimento ou tamanho não alterado desde o início da experiência.



6.4 AVALIAÇÃO DE OUTRAS SUBESPÉCIES DE *Bacillus thuringiensis* E OUTRAS ESPÉCIES DE *Bacilli*

Faz-se a avaliação de várias espécies de *Bacillus* para a produção de Ia. Faz-se a fermentação das estirpes durante 72 horas a 30°C num meio constituído por uma fonte de carbono, como amido, amido hidrolisado ou glucose e uma fonte de azoto, como uma proteína, proteína hidrolisada, ou extracto solúvel de maceração do milho. Testam-se os sobrenadantes quanto à produção de Ia utilizando o micro-bioensaio de *Spodoptera exigua* descrito *supra*. Verificou-se que o *B. thuringiensis* subesp. *aizawai* estirpe EMCC0087 (depositada no NRRL como NRRL B-21148) e o *B. thuringiensis* subesp. *galleriae* (depositada no NRRL) produzem Ia aproximadamente na mesma concentração que o *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*.

O Ia é também produzido em *B. subtilis*, *B. cereus*, *B.t.* subesp. *alesti*, *B.t.* subesp. *canadiensis*, *B.t.* subesp. *darmstadiensis*, *B.t.* subesp. *dendrolimus*, *B.t.* subesp. *entomocidus*, *B.t.* subesp. *finitimus*, *B.t.* subesp. *israelensis*, *B.t.* subesp. *kenyae*, *B.t.* subesp. *morrisoni*, *B.t.* subesp. *subtoxicus*, *B.t.* subesp. *tenebrionis*, *B.t.* subesp. *thuringiensis*, e *B.t.* subesp. *toumanoffi*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* mutante cry- spo-, tal como determinado por electroforese capilar.

Especificamente, utiliza-se um sistema de electroforese capilar P/ACE Beckman, equipado com um capilar não revestido de 50 µm x 57 cm, tampão fosfato 0,2 M pH 6,8, voltagem a 15 KV e detecção a 200 nm para a quantificação do nível de Ia. Os volumes de amostra são de 20 nl com um tempo de operação de 25 minutos.

Constrói-se uma curva padrão utilizando Ia purificado como padrão a níveis de 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml, 0,156 mg/ml e 0,078 mg/ml. Obtém-se uma curva de calibração linear. Utiliza-se a equação $y = mx + b$ resultante para obter a concentração de Ia em cada amostra.

Antes de cada operação, o capilar é passado com tampão de operação (fosfato 0,2 M, pH 6,8) durante três minutos. Após cada operação de 25 minutos, o capilar é passado com NaOH 1N durante 1 minuto, água para HPLC

filtrada durante 1 minuto, ácido fosfórico 0,5 M durante 3 minutos e água para HPLC filtrada durante 1 minuto. Faz-se a integração da área sob cada pico e determina-se a área do pico e calcula-se uma concentração final a partir da curva padrão.

6.5 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS DE B.t.

A quantidade de Ia presente em vários produtos de B.t. comercialmente disponíveis é determinada por electroforese capilar descrita na secção 6.4 *supra*.

O BACTOSPEINE™, o JAVELIN™, o NOVODOR™, o SPHERIMOS™, o BACTIMOS™, o FORAY™, o FLORBAC™ e o BIOBIT™ são obtidos da Novo Nordisk A/S. O XENTARI™ e o DIPEL™ são obtidos da Abbott Laboratories. O AGREE™ é obtido da Ciba-Geigy; o MVP™ é obtido da Mycogen e o CUTLASS™ é obtido da Ecogen.

Os resultados são apresentados na tabela III *infra* e indicam que o Ia está presente em quantidades variáveis, desde menos de 0,001 g de Ia/BIU até 0,71 g de Ia/BIU.

(Segue Tabela III)

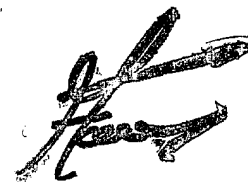
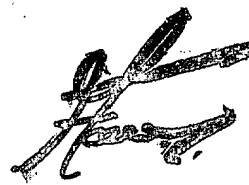


TABELA III
la EM PRODUTOS DE *Bacillus thuringiensis*

PRODUTO	tipo	Número de lote	Potência	g la/BIU
JAVELIN™ WG	<i>Btk</i>	9942281	32000 IU/mg	0,071
XENTARI™	<i>Bta</i>	58715PG	15000 IU/mg	0,06
AGREE™	<i>Bta/Btk</i>	RA208004	25000 IU/mg	0,033
BIOBIT™ HPWP	<i>Btk</i>	5012	48950 U/mg PIA	0,018
BIOBIT™ FC	<i>Btk</i>	AG46669071	8 BIU/L	0,013
FORAY™ 48B	<i>Btk</i>	BBN7018	12,6 BIU/L	0,012
DIPEL™	<i>Btk</i>	58739PG	32 000 IU/mG	0,011
FORAY™ 76B	<i>Btk</i>		20,0 BIU/L	0,007
BACTOSPEINE™	<i>Btk</i>	BOB001	123 653 IU/mg	0,003
BACTOSPEINE™	<i>Btk</i>	KX02A	100 000 IU/mg	0,003
BACTOSPEINE™	<i>Btk</i>	WP	16 000 IU/mg	<0,001
NOVODOR™	<i>Btt</i>	9024	16,3 Milhões LTU/qt	$9,5 \times 10^{-9}$ g/LTU
FLORBAC™	<i>Bta</i>	082-31-1	30 000 U/mg E	<0,001
SPHERIMOS™	<i>B.sphr</i>	BSN006		nenhum
MVP™	<i>Btk</i>	21193542		nenhum
CUTLASS™	<i>Btk/Btk</i>			nenhum
BACTIMOS™	<i>Bti</i>	BIB0024	11 700 IU/mg	nenhum

6.6 BIOENSAIOS DE INCORPORAÇÃO NA DIETA

A actividade do *B.t.k.* é determinada por um bioensaio de incorporação numa dieta artificial utilizando larvas de terceira instar de *Spodoptera exigua*, larvas de segunda instar de *Helicoverpa zea*, larvas de terceira instar de *Spodoptera frugiperda*, larvas de segunda instar de *Heliothis virescens*, larvas de terceira instar de *Trichoplusia ni*, larvas de terceira instar de *Pseuda plusia includens*, larvas de terceira instar de *Plutella xylostella*, larvas de terceira instar



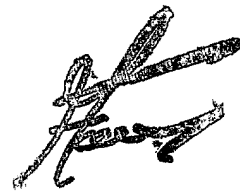
de *Spodoptera littoralis* e larvas de terceira instar de *Mamestra brassicae*.

A fim de determinar o nível de potenciação por adição de la a produtos de *B.t.* e para estabelecer a gama de insectos afectados, realizam-se bioensaios de incorporação na dieta. Nas experiências com concentrações elevadas de la contra *Spodoptera exigua* (7,4 - 23,7 g la/BIU), utiliza-se la purificado (70% de ingrediente activo, 30% de contra-ção acetato) para potenciar o BIOBIT™ FC (FC representa concentrado fluente). Os restantes dados apresentados na tabela IV mostram que a potenciação de BIOBIT™ HPWP (pó molhável de potência elevada) com la (0,658% de ingrediente activo). O *S. littoralis* e o *M. brassicae* são testados utilizando FLORBAC™ HPWP e la.

Pesam-se os vários produtos de *B.t.* e adiciona-se la de modo a obter 0,1 a 237 g la/BIU. Ajusta-se o volume com Tween™ a 0,1%. As amostras são submetidas a ultra-sons durante 1 minuto e em seguida diluídas para o volume final. Também se preparam amostras simples (sem la) e substâncias de referência. As substâncias referência incluem *B.t.k.* HD-1-S-1980 (obtido da NRRL), a que é atribuída uma potência de 16 000 unidades internacionais (IU) por miligrama e JAVELIN™ WG a que foi atribuída uma potência de 53 000 Unidades de *Spodoptera*/mg (SU).

As dietas artificiais padrão constituídas por água, ágar, açúcar, caseína, gérmen de trigo, metilparabeno, ácido sórbico, óleo de linhaça, celulose, sais e vitaminas são preparadas numa caldeira aquecida de 20 l. Isto proporciona dieta suficiente para testar 10 a 12 amostras com sete concentrações diferentes de cada substância de teste. As soluções de *B.t.* são diluídas em série para originar alíquotas de 16 ml. Cada alíquota é adicionada a 184 g de dieta fundida. A mistura é subsequentemente homogeneizada e em seguida vazada num tabuleiro de plástico com 40 células individuais. Preparam-se três tabuleiros para cada lote de dieta. Após a dieta ter arrefecido e solidificado, adiciona-se um insecto de idade conhecida (2-3 instar) a cada célula e tapam-se os tabuleiros com uma folha de "mylar" transparente, perfurada. Colocam-se os tabuleiros em prateleiras e incubam-se durante quatro dias a 28°C e 65% de humidade relativa.

Após quatro dias, contabiliza-se a mortalidade dos insectos. Cada



tabuleiro é soprado com força contra o topo de uma mesa e as larvas que não se mexem são contabilizadas como mortas. Calcula-se a percentagem de mortalidade e analisam-se os dados por meio de uma análise *probit* paralela. Estimam-se as LC_{50} , LC_{90} , o declive das linhas de regressão, o coeficiente de variação e as potências. As amostras são corridas um mínimo de 3 vezes ou até três potências estarem dentro de 20% da média calculada para cada amostra. Para calcular o aumento na actividade associado com cada concentração de la, corrige-se a LC_{50} da amostra de *B.t./la* para reflectir a quantidade de *B.t.* na amostra. As LC_{50} das amostras simples emparelhadas são divididas pelos valores de LC_{50} corrigidos, para se obter a dimensão da redução da LC_{50} associada com la.

Utiliza-se o processo seguinte para o ensaio de *Lobesia bothrana*. Recolhem-se uvas atacadas pela *Lobesia bothrana* num campo não pulverizado e removem-se as larvas. Fazem-se diluições em série de la (250 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml) em água. Coloca-se uma larva no meio da placa de Petri. Se se verifica que a larva bebe, esta é transferida para uma placa de Petri com bagos de uvas recentemente cortados. As larvas são armazenadas a 22°C durante 3-4 dias.

Como mostrado na tabela IV, observam-se reduções significativas nas LC_{50} para todas as espécies.

(Segue Tabela)

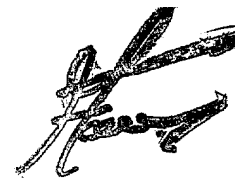
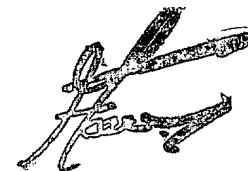


TABELA IV
Bioensaios de incorporação na dieta

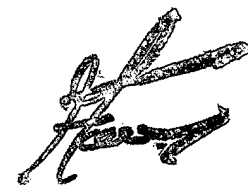
<u>Insecto</u>	<u>g de la por BIU</u>	<u>Aumento na actividade Dimensão da Redução de LC₅₀ (nº de x)</u>
<i>Spodoptera exigua</i> (BIOBIT™ HPWP)	0,1	1,5
	0,2	1,7
	2,0	4,3
	4,0	7,5
<i>Spodoptera exigua</i> (BIOBIT™ FC)	7,4	13
	15	26
	30	34
	118	59
	237	79
<i>Spodoptera frugiperda</i> (BIOBIT™ HPWP)	0,2	2,2
	0,8	3,9
	2,0	7,2
	4,0	11,6
<i>Trichoplusia ni</i> (BIOBIT™ HPWP)	0,1	1,1
	0,2	1,2
	2,0	2,0
	4,0	3,1
<i>Pseudoplusia includens</i> (BIOBIT™ HPWP)	0,1	0
	0,2	1,2
	0,8	2,1
	2,0	2,4
	4,0	3,4
<i>Plutella xylostella</i> (BIOBIT™ HPWP)	0,2	1,6
	0,8	1,3
	2,0	1,4
	4,0	1,9
<i>Helicoverpa zea</i> (BIOBIT™ HPWP)	3,2	12,6
<i>Heliothis virescens</i> (BIOBIT™ HPWP)	3,2	4,2
<i>Lobesia botrana</i> (BIOBIT™ HPWP)	2,0	3,0
<i>Spodoptera littoralis</i> (FLORBAC™ HPWP)	2,0	8,6
<i>Mamestra brassicae</i> (FLORBAC™ HPWP)	2,0	4,9



A potenciação de vários produtos pelo la na *Spodoptera exigua* é determinada utilizando os bioensaios de incorporação em dietas descritos *supra*. As quantidades de la adicionado/BIU de produto são apresentadas na tabela V, *infra*. A mistura de produtos la/B.t. é incorporada numa dieta de caseína de gérmen de trigo à base de ágar. Fornece-se a dieta aos insectos durante quatro dias e mantêm-se a 28°C. Regista-se a mortalidade e analisa-se por meio de uma análise *probit*. Calculam-se a LC₅₀, a LC₉₀ e a potência a partir do produto correspondente que não contém la. Os resultados apresentados na tabela V indicam que o la potencia vários produtos de *B.t.k.* e de *B.t.a.*, obtidos a partir de várias fontes. As estirpes de *B.t.* contidas nestes produtos são descritas na secção 5.2, *supra*.

TABELA V
Potenciação de produtos de *B.t.* na *Spodoptera exigua*

<u>Produto</u>	<u>g de la por BIU</u>	<u>Aumento na actividade</u> <u>Grandeza da redução de LC₅₀</u> <u>(nº de x)</u>
BACTOSPEINE™ WP	0,4	
	1,7	1,04
CONDOR™	0,4	2,3
	1,7	2,4
AGREE™	0,4	5,1
	1,7	1,1
CUTLASS™	0,4	1,6
	1,7	1,1
MVP™	0,4	2,5
	1,7	6,0
FLORBAC™ HPWP	2,0	7,7
		12,1
DIPEL™ 2X	0,2	
	0,8	1,1
	0,2	2,0
JAVELIN™ WG	0,8	1,2
	2,0	2,3
XENTARI™	0,2	3,9
	0,8	0
	2,0	1,08
	0,2	2,9
	0,8	1,2
	2,0	1,6
		2,4



6.7 BIOENSAIOS FOLIARES

Os bioensaios foliares são realizados com larvas de segunda instar de *Spodoptera exigua* em plantas de brócolos, utilizando BIOBIT™ FC e Ia. A razão entre Ia e BIOBIT™ FC é a mesma 2 g Ia/BIU BIOBIT™ FC. Os tratamentos são aplicados aos brócolos através de um "sistema de pulverização em sulcos" num volume de transportador de 20 galões por acre. As folhas são excisadas das plantas após o depósito do pulverizado ter secado e são infestadas com larvas de segunda instar de *Spodoptera exigua*. Os resultados são apresentados na tabela VI, *infra*. Observa-se uma mortalidade de 100% a uma taxa de 8,7 BIU/hectare de BIOBIT™ FC + Ia enquanto que o BIOBIT™ FC sozinho matou 92% das larvas a 58,8 BIU/hectare e 8% a 17,6 BIU/hectare. As plantas tratadas são também colocadas sob luz solar directa durante oito horas, após o que as folhas são excisadas e infestadas. Após oito horas sob luz solar, o BIOBIT™ sozinho a 58,8 BIU/hectare originou 27% de mortalidade, enquanto que o BIOBIT™ FC + Ia originou 100% de mortalidade a 8,7 BIU/hectare.

Num teste foliar realizado com larvas do início do quarto instar que receberam BIOBIT™ FC sozinho obteve-se 75% de mortalidade a 52 BIU/hectare e o BIOBIT™ FC (FC é concentrado fluente) + Ia originou 100% de mortalidade a 13 BIU/hectare.

TABELA VI
Bioensaios foliares

<u>Tratamento</u>	<u>BIU/hectare</u>	<u>% mortalidade</u>	<u>"instar" larvar</u>
BIOBIT™ FC	58,8	92%	2
BIOBIT™ FC	17,6	8%	2
BIOBIT™ FC + Ia	8,7	100%	2
BIOBIT™ FC + 8h de luz solar	58,8	27%	2
BIOBIT™ FC + Ia + 8h de luz solar	8,7	100%	2
BIOBIT™ FC	52	75%	4
BIOBIT™ FC + Ia	13	100%	4

6.8 ENSAIOS DE CAMPO

Os ensaios de campo em sementes de garbonzo (*Spodoptera exigua*) demonstraram que o BIOBIT™ FC sozinho a 70 BIU/hectare originou 51% do controlo, enquanto que 2 g de la/BIU BIOBIT™ a 40 BIU/hectare originaram 89% do controlo (relativo a nenhum tratamento). O JAVELIN™ WG a 45 BIU/hectare originou 51% do controlo. Os ensaios de campo com milho doce (*Spodoptera frugiperda*) demonstraram que a 39,5 BIU/hectare, 2 g la/BIU BIOBIT™ FC proporcionaram 84% do controlo.

6.9 RAZÕES DE RESISTÊNCIA

Fazem-se bioensaios em colónias de *Plutella xylostella* susceptíveis e resistentes. As traças resistentes são amostras colhidas em campo na Florida, que desenvolveram resistência a *B.t.* após exposição intensiva a JAVELIN™ WG. Analisa-se o BIOBIT™ HPWP com la, utilizando um bioensaio de imersão da folha. A resistência a JAVELIN™ e a XENTARI™ é testada sem la. Mergulham-se discos de folha de couve de seis cm de diâmetro durante 10 segundos numa de oito concentrações diferentes de produtos de *B.t.* ou formulações de *B.t.*/la. As concentrações variam entre 1 a 1000 ppm. Os discos de folha são deixados secar ao ar durante duas horas e são colocados em placas de Petri de plástico com larvas de segunda instar (0,2 a 0,4 mg). Fazem-se duas réplicas de vinte e cinco insectos/dose/dia, de modo a obter 50 insectos/dose. Após 72 horas a 27°C regista-se a mortalidade. A regressão entre a dose e a mortalidade é analisada por análise *probit*. As razões de resistência são calculadas dividindo os valores de LC₅₀ e LC₉₀ das traças susceptíveis. Os resultados são apresentados na tabela VII e indicam que o BIOBIT™ HPWP é potenciado com 2 g de la/BIU e 4 g la/BIU. Especificamente, com 4 g de la/BIU há um decréscimo de 2 vezes na razão de resistência LC₅₀ e um decréscimo de 10 vezes na razão de resistência LC₉₀.

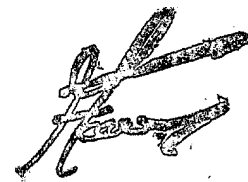


TABELA VII
Razões de resistência de *Plutella xylostella*
(resistente a B.t.k.)

PRODUTO TESTADO	RR LC ₅₀	RR LC ₉₀
JAVELIN™ WG	302,6	3829,7
BIOBIT™ HPWP	20,5	98,5
2,0 g la/BIU BIOBIT™ HPWP	23,2	88,0
4,0 g la/BIU BIOBIT™ HPWP	10,4	11,5
XENTARI™	9,7	8,2

7. DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

As estirpes seguintes de *Bacillus thuringiensis* foram depositadas de acordo com o tratado de Budapeste na Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA.

<u>Estirpe</u>	<u>Número de acesso</u>	<u>Data de depósito</u>
EMCC0086	NRRL B-21147	6 de Outubro, 1993
EMCC0087	NRRL B-21148	6 de Outubro, 1993

As estirpes foram depositadas sob condições que asseguram que o acesso à cultura estará disponível durante o período de pendência deste pedido de patente, a quem de direito, determinado pelo Comissário para Patentes e Marcas Registradas, nos termos de 37 C.F.R. §1.14 e 35 U.S.C. §122. O depósito representa uma cultura substancialmente pura de cada estirpe depositada. O depósito é disponibilizado quando solicitado por legislação estrangeira sobre patentes em países onde sejam apresentadas contrapartidas do pedido em questão, ou a sua progenia. No entanto, deverá entender-se que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar o presente invento com prejuízo dos direitos de patente concedidos por acção governamental.

Lisboa,

17. ABR. 2000

Por ABBOTT LABORATORIES
- O AGENTE OFICIAL -



O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Factor que se obtém a partir do sobrenadante da fermentação de uma estirpe de *Bacillus* e que potencia a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis*, em que o referido factor contém 13 carbonos, é solúvel em água, é estável a 100°C durante pelo menos 5 minutos, é estável quando submetido a luz ultravioleta durante pelo menos 10 horas e é estável a pH 2, durante 3 dias.

2. Factor de acordo com a reivindicação 1 em que o referido factor tem desvios de ^1H RMN a 1,5, 3,22, 3,29, 3,35, 3,43, 3,58, 3,73, 3,98, 4,07, 4,15, 4,25, 4,35.

3. Factor de acordo com a reivindicação 1, em que o factor tem um peso molecular de 350 a 700.

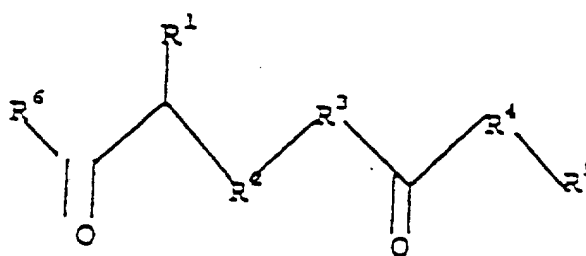
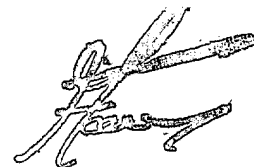
4. Factor de acordo com a reivindicação 1 em que o pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis* compreende uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* e um transportador aceitável.

5. Factor de acordo com a reivindicação 1 em que o pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis* compreende um esporo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* e um transportador aceitável para pesticidas.

6. Factor de acordo com a reivindicação 1 em que o pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis* compreende uma proteína de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* ou um seu fragmento, com actividade contra uma praga, e um transportador aceitável para pesticidas.

7. Factor de acordo com a reivindicação 6 em que a proteína de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* é uma delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

8. Factor com a estrutura (I)



em que R^1 é amino, hidroxi, alquilo C_{1-10} , benzamida, 3,5-dinitrobenzamida, p-nitrobenzamida, halobenzamida, alquilbenzamida, tiofenamida, furanamida, pirrolamida, imidazolamida, pirazolamida, alquil C_{1-10} amino, dialquil C_{1-10} amino, éster de alquilo C_{1-10} ou benzilo, halogéneo ou alcoxi C_{1-10} ;

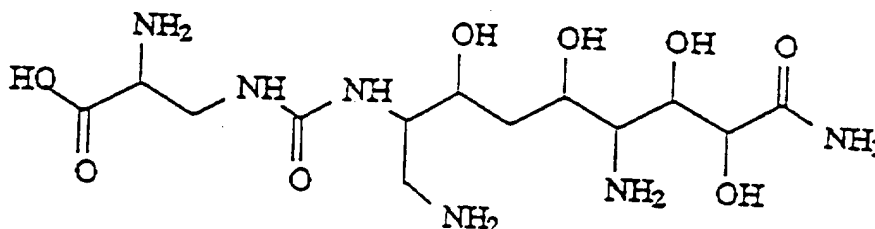
R^2 é $(CH_2)_n$, em que n é um número inteiro de 0-10;

R^3 e R^4 são independentemente $(NH)_p$, em que p é 0 ou 1;

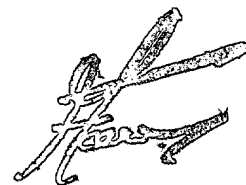
CH_2X^1
||
 R^5 é $CH-CHX^2-CH_2-CHX^3-CHX^4-CHX^5-CHX^6-CX^7$ ou $(CHOH)_qCH_2OH$ em que X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 e X^7 são independentemente NH_2 , OH , acetilo, halogéneo ou alcoxi C_{1-10} e q é um número inteiro de 1-10;

R^6 é hidroxilo, amino, um alcoxi C_{1-10} ou benzoxi, éster benzílico, éster 3,5-dinitrobenzílico, éster p-nitrobenzílico, éster halobenzílico, éster alquilbenzílico, éster de tiofeno, éster de furano, éster de pirrolo, éster de imidazolo, ou um sal seu derivado aceitável para pesticidas.

9. Factor de acordo com a reivindicação 8, em que o factor tem a estrutura (Ia)



10. Factor que potencia a actividade pesticida de um pesticida



relacionado com *Bacillus*, em que o referido factor ou seu derivado é obtido por (a) fermentação de uma estirpe de *Bacillus*; (b) recuperação do sobrenadante da fermentação de (a); e (c) isolamento do factor ou seu derivado do sobrenadante de (b).

11. Factor de acordo com a reivindicação 10, em que o factor é obtido de um sobrenadante de fermentação de *Bacillus subtilis*.

12. Factor de acordo com a reivindicação 10 em que o factor é obtido a partir do sobrenadante da fermentação de *Bacillus cereus*.

13. Factor de acordo com a reivindicação 10 em que o factor é obtido a partir do sobrenadante da fermentação de *Bacillus thuringiensis*.

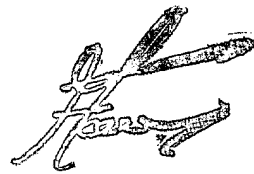
14. Factor de acordo com a reivindicação 13, em que o factor é obtido a partir do sobrenadante da fermentação de uma subespécie de *Bacillus thuringiensis* seleccionado a partir do grupo constituído por *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subesp. *galleriae* ou seus mutantes, que têm substancialmente a mesma actividade pesticida.

15. Factor de acordo com a reivindicação 13 em que o factor é obtido a partir de um sobrenadante da fermentação de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*, ou de um seu mutante com actividade pesticida.

16. Factor de acordo com a reivindicação 13 em que o factor é obtido a partir de um sobrenadante da fermentação de um mutante cry-spo⁻ de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*.

17. Composição pesticida que compreende (a) o factor de acordo com a reivindicação 1 e (b) um pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis*, em que o factor está presente na referida composição numa quantidade de pelo menos 0,1 g por BIU.

18. Composição pesticida que compreende (a) o factor de acordo com a reivindicação 1 e (b) um pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis*, em



que o factor está presente na referida composição numa quantidade de pelo menos 0,05 g por g de delta-endotoxina e esporo de *Bacillus thuringiensis*.

19. Composição de acordo com a reivindicação 17 ou 18 em que a referida composição compreende ainda um vírus com actividade contra uma praga e em que o referido factor potencia também a actividade pesticida de um vírus com actividade contra uma praga.

20. Composição de acordo com a reivindicação 17 ou 18 em que o *Bacillus thuringiensis* é seleccionado de entre o grupo constituído por *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai*.

21. Composição pesticida que compreende (a) o factor de acordo com a reivindicação 1 e (b) um vírus com actividade contra uma praga.

22. Composição pesticida que compreende (a) o factor de acordo com a reivindicação 1 e (b) um transportador para pesticida em que o factor está presente na referida composição numa quantidade de pelo menos 0,01% em peso.

23. Método para o controlo de uma praga que compreende expor a praga a uma quantidade eficaz para o controlo da praga, da composição pesticida de acordo com a reivindicação 17, 18, 21 ou 22.

24. Método de acordo com a reivindicação 23 em que a praga está presente numa planta transgénica.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que a planta transgénica contém um gene de *Bacillus thuringiensis*.

26. Método de acordo com a reivindicação 24 em que a planta foi previamente exposta a um pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis*.

27. Método para potenciar a actividade pesticida de um pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis* que compreende administrar a uma praga exposta a um pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis* a composição de

acordo com a reivindicação 22, numa quantidade eficaz, para potenciar a actividade pesticida do referido pesticida relacionado com *Bacillus thuringiensis*.

28. Método para obter o factor de acordo com a reivindicação 1 que compreende

- (a) fermentação de uma estirpe de *Bacillus*;
- (b) recuperação do sobrenadante da fermentação de (a); e
- (c) isolamento do factor do sobrenadante de (b), para obter o factor substancialmente puro.

29. Método para identificar o factor de acordo com reivindicação 1 que compreende

- (a) fermentação de uma estirpe de *Bacillus*;
- (b) recuperação do sobrenadante da fermentação de (a); e
- (c) ensaio do sobrenadante de (b) para potenciação de um pesticida relacionado com *Bacillus*.

30. Mutante ou variante de uma estirpe de *Bacillus* que produz o factor de acordo com a reivindicação 1.

31. Método para a obtenção do mutante ou variante de acordo com a reivindicação 30 que compreende:

- (a) tratar a estirpe progenitora com um mutagénio,
- (b) crescer a estirpe progenitora mutada num meio adequado para a selecção de uma estirpe mutante; e
- (c) seleccionar a estirpe mutante.

Lisboa, 17. ABR. 2000

Por ABBOTT LABORATORIES
- O AGENTE OFICIAL -



○ ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA Ag. Of. Pr. Ind. Rua das Flores, 74 - 4.º 1200 LISBOA
--



Sobrenadante da produção de *Btk* NB75 10x



agitação



filtro de 0,2 μ

Sobrenadante de 0,2 μ em bruto



ultrafiltração a 5 k

Permeado de 5 k



permuta catiónica SP

Conjunto de SP



conc. por liofilização



filtração em gel P2

Conjunto de P2



HPLC SP

Conjunto de HPLC SP



liofilização múltipla

Composto puro

FIG. 1

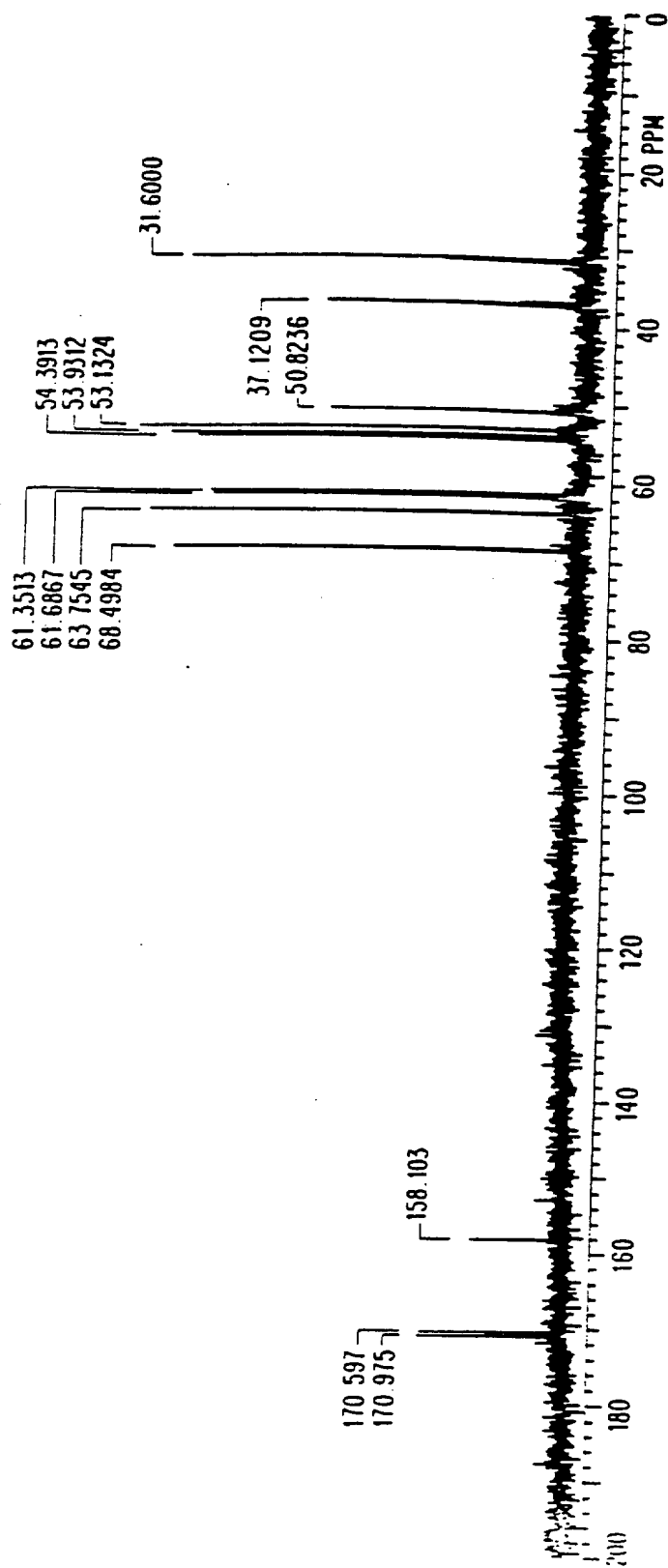


FIG.2

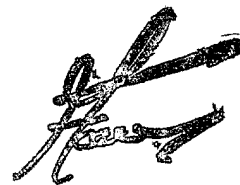
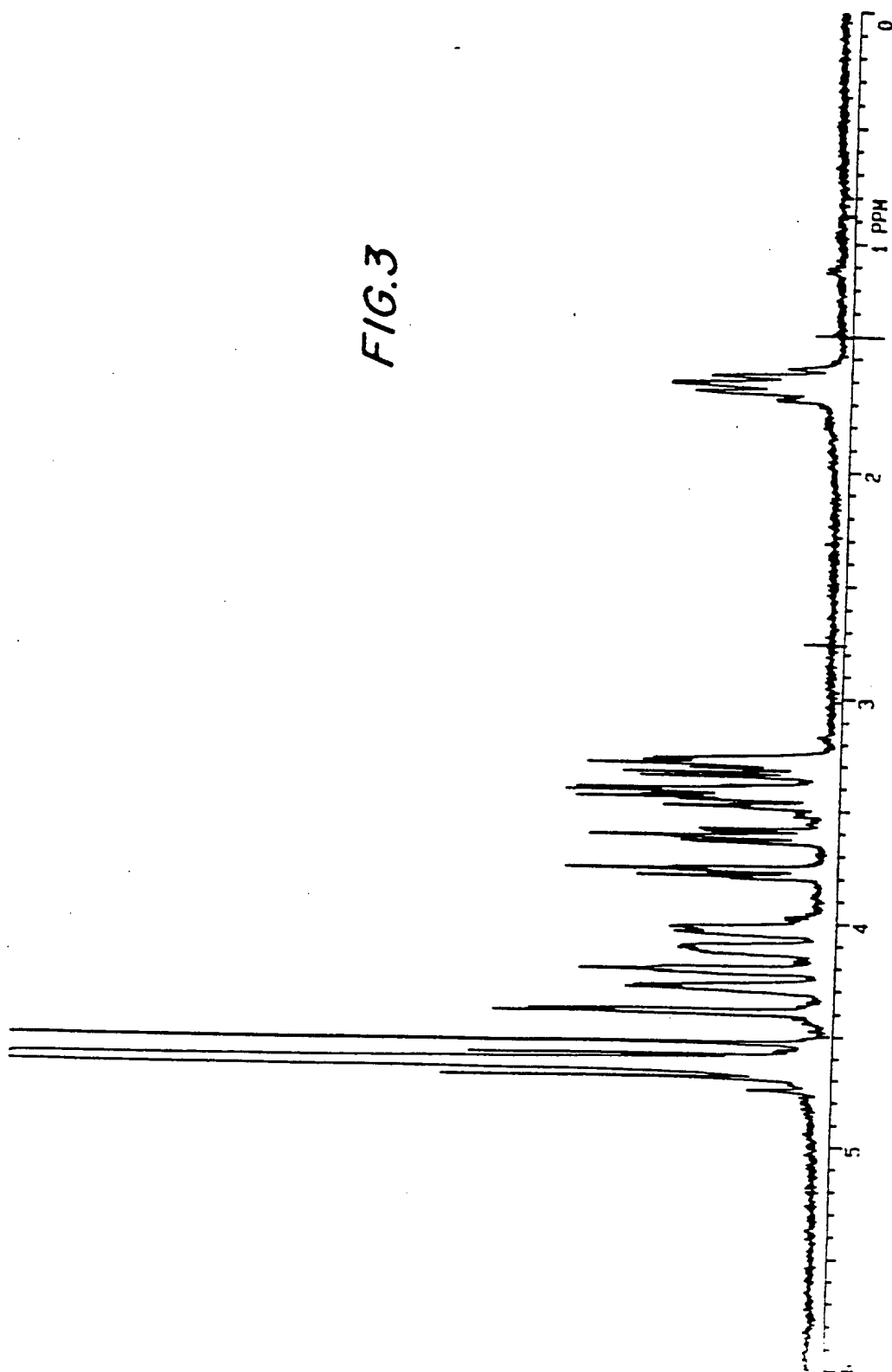


FIG. 3





<u>Posição</u>	<u>RMN de ^1H</u> <u>δ ppm em D_2O</u>	<u>RMN de ^{13}C</u> <u>δ ppm em D_2O</u>	<u>Multiplicidade</u>
1		171,3	C
2	4,35	68,6	CH
3	4,01	34,1	CH
4	3,35	54,4	CH
5	4,15	61,8	CH
6	1,5	31,6	CH_2
7	3,98	61,5	CH
8	3,22	53,3	CH
8	3,58; 3,73	54,0	CH_2
10		158,3	C
12	3,29; 3,43	37,2	CH_2
13	4,25	51,1	CH
14		170,7	C

FIG. 4

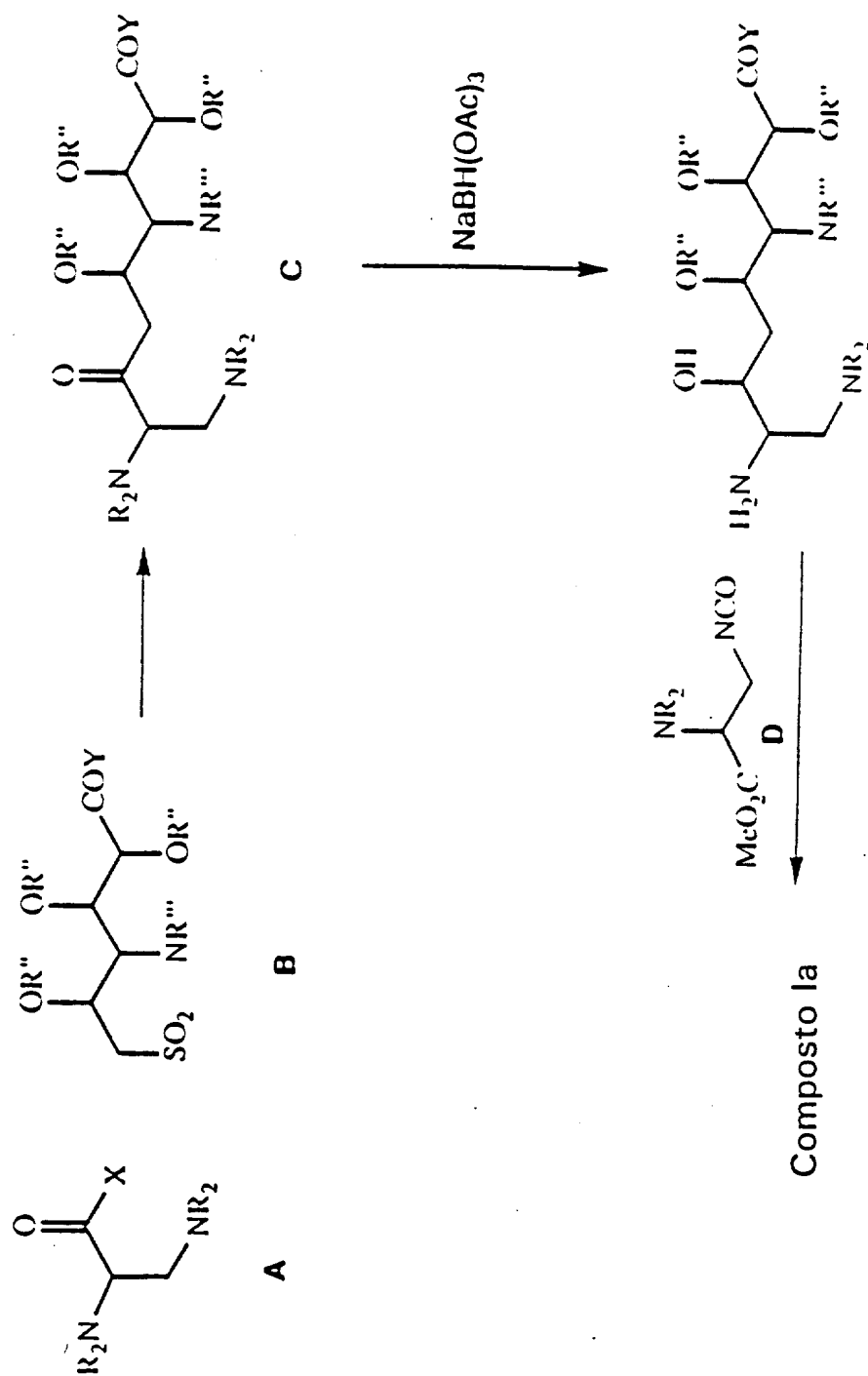
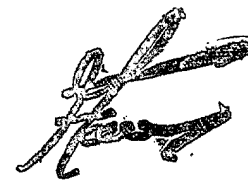


FIG. 5