



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0013963-7 B1

(22) Data do Depósito: 13/09/2000

(45) Data de Concessão: 24/01/2017



(54) Título: MACROLÍDEOS PESTICIDAS

(51) Int.Cl.: C07H 17/08; A01N 43/22; C12P 19/62

(30) Prioridade Unionista: 13/09/1999 US 60/153,513

(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC. ELI LILLY AND COMPANY

(72) Inventor(es): PAUL LEWER; DONALD R. HAHN; LAURA L. KARR; PAUL R. GRAUPNER;
JEFFREY R. GILBERT; THOMAS V. WORDEN; RAYMOND C. YAO; DENNIS W. NORTON

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO E PROCESSO INSETICIDA OU ACARICIDA, PROCESSO PARA PROTEÇÃO DE UM LOCAL DA INFESTAÇÃO POR INSETOS, ÁCAROS OU CARRAPATOS, FORMULAÇÃO PARA CONTROLE DE UMA INFESTAÇÃO DE PIOLHOS EM UM SER HUMANO, USO, E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO**".

A presente invenção refere-se a um novo grupo de produtos pesticidas naturais, e a uma nova espécie *Saccharopolyspora* que produz os compostos.

O produto de fermentação A83543 é uma família de compostos, referidos como espinosinas, que são produzidos por determinadas cepas de *Saccharopolyspora spinosa*. As espinosinas produzidas naturalmente descritas anteriormente têm um sistema de anel tricíclico 5,6,5, fundido em uma lactona macrocíclicas de 12 elementos, um açúcar neutro (ramnose) e um açúcar amino (forosamina) (consultar Kirst et al., 1991). As espinosinas conhecidas têm sido referidas como fatores ou componentes, e cada uma delas recebe uma designação de letra de identificação, isto é, espinosina a, B, etc. Os compostos são úteis para o controle de aracnídeos, nematódeos e insetos, em particular as espécies *lepidoptera* e *Diptera*, e são bastante amigáveis do ponto de vista ambiental e têm um perfil toxicológico atrativo.

A patente U.S. 5.362.634 e o pedido de patente européia de N°. 375316 A1 descrevem espinosinas A, B, C, D, E, F, G, H e J. O pedido de patente internacional WO 93/09126 descreve as espinosinas L, M, N, Q, R, S e T. O pedido de patente internacional WO e a patente U.S. 5.6704.486 descrevem as espinosinas K, O, P, U, V, W e Y, e os seus derivados.

Um grande número de modificações sintéticas nos compostos de espinosina foi feito, como descrito no pedido de patente internacional WO 97/00265, mas a modificação das espinosinas na posição C-21 não foi exequível. A C-21 dos compostos conhecidos é substituída com metila ou etila. Se pudessem ser encontrados meios para introduzir um grupo funcional reativo em lugar do grupo metila ou etila, sem provocar mudanças indesejadas em outras partes da molécula, esses possibilitariam a síntese de muitos ou-

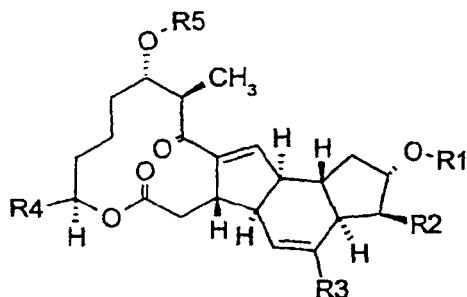
tros compostos de espinosina. Isso tem sido buscado há muito por aqueles que trabalham no campo da síntese de espinosinas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

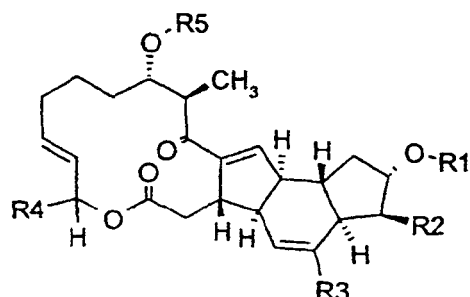
A presente invenção proporciona uma cepa isolada de uma nova

espécie de *Saccharopolyspora* designada LW107129 (NRRL 30141).

A invenção também proporciona compostos que podem ser produzidos por cultura de LW107129 em um meio de cultura adequado, e que podem ter a seguinte fórmula geral 1 ou 2:



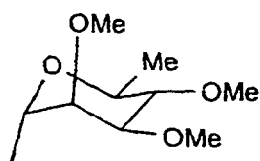
(1)



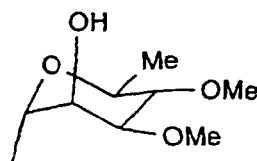
(2)

5 em que:

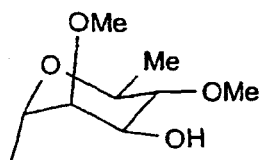
R1 é um grupo de fórmula 2a, 2b ou 2c:



(2a)



(2b)



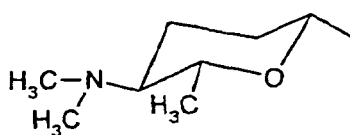
(2c)

R2 é H ou OH;

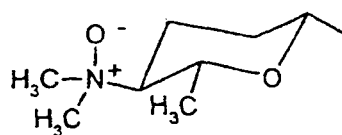
R3 é H ou CH₃;

R4 na fórmula 1 é 1-butenila, 1,3-butadienila, n-butila, 3-hidróxi-
10 1-butenila, ou 1-propenila; e R4 é etila na fórmula 2;

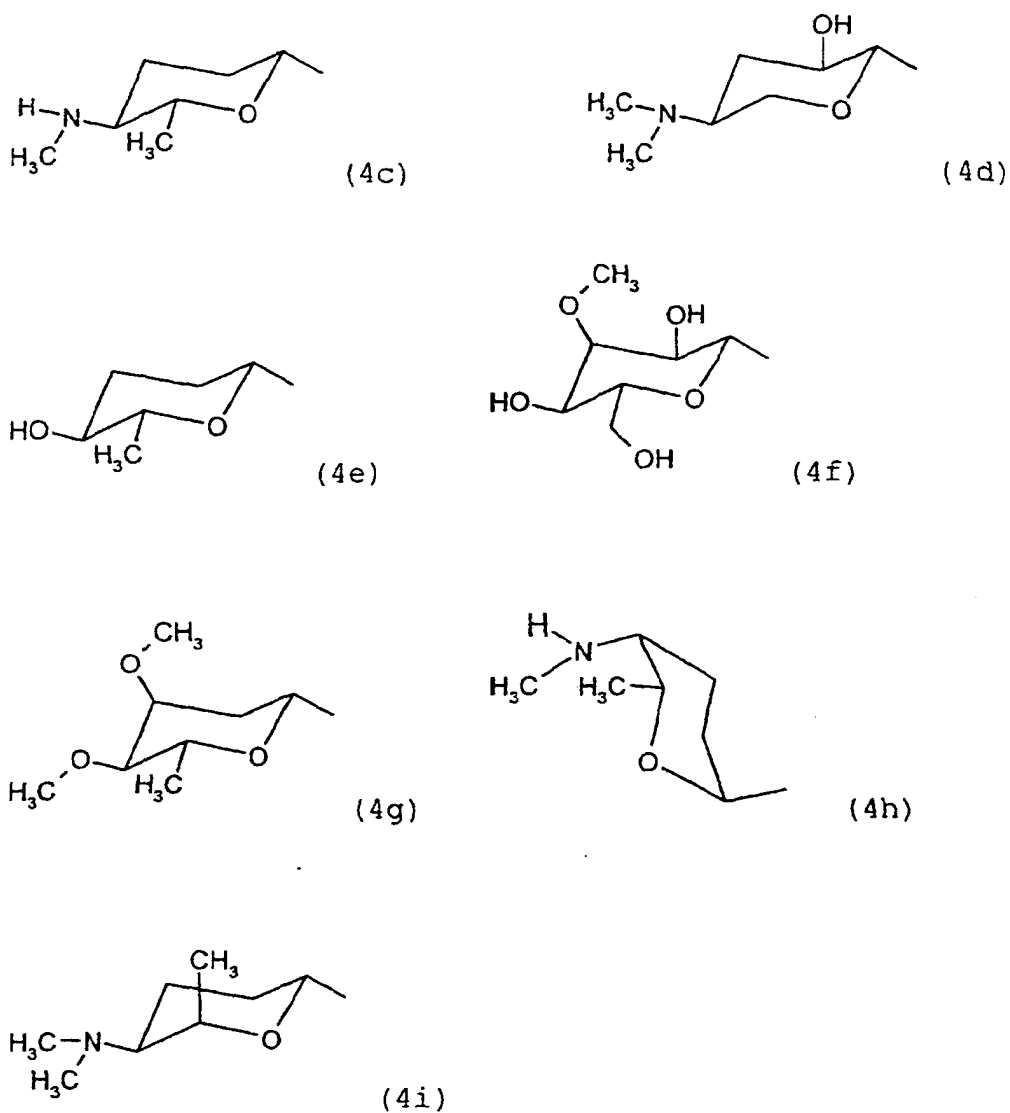
e R5 é H ou um grupo tendo uma das seguintes fórmulas 4a a 4i



(4a)



(4b)



Os compostos específicos de Fórmula 1 ou 2, que foram preparados e isolados por cultura da cepa *Saccharopolyspora* LW107129, são identificados na Tabela I.

TABELA I

Composto Nº.	fórmula	R1	R2	R3	R4	R5
1	1	2a	H	H	1-butenila	4a
2	1	2a	H	H	1-butenila	4b
3	1	2a	H	H	1-butenila	4c
4	1	2a	H	H	1-butenila	4d
5	1	2b	H	H	1-butenila	4a
6	1	2c	H	H	1-butenila	4 ^a
7	1	2a	H	Me	1-butenila	4a
8	1	2a	OH	H	1-butenila	4a

9	1	2a	H	H	3-hidróxi-1-butenila	4a
10	1	2a	H	H	3-hidróxi-1-butenila	4c
11	1	2a	H	H	1,3-butadienila	4a
12	1	2a	H	H	1-butenila	4e
13	1	2a	H	H	1-butenila	4f
14	1	2a	OH	H	1-butenila	4e
15	1	2a	OH	H	1-butenila	4g
16	1	2a	OH	H	1-propenila	4a
17	1	2a	H	H	1-butenila	H
18	1	2a	H	Me	1-butenila	H
19	1	2a	OH	H	1-butenila	H
20	1	2a	H	H	3-hidróxi-1-butenila	H
21	1	2a	OH	H	3-hidróxi-1-butenila	H
22	1	2a	H	H	1,3-butadienila	H
23	1	2a	H	H	n-butila	H
24	1	2a	H	H	1-butenila	4h
25	1	2a	H	H	1-butenila	4i
26	1	2a	OH	H	1,3-butadienila	4a
27	1	2a	OH	Me	1-butenila	4a
28	1	2a	OH	H	1-propenila	4a
29	1	2b	H	H	1-butenila	H
30	1	2c	H	H	1-butenila	H
31	2	2a	H	H	etila	4a

- Todos os componentes listados na Tabela I são distintos, estruturalmente, das espinosinas conhecidas previamente porque, com referência ao grupo R4, nenhum dos compostos de espinosina conhecidos anteriormente tinha um grupo 1-butenila, 3-hidróxi-1-butenila, 1,3-butadienila, 1-propenila ou n-butila na posição C-21 do macrolídeo. Ademais, muitos dos compostos na Tabela I diferem de todas as espinosinas conhecidas anteriormente porque, com referência ao grupo R5, esses compostos têm novos grupos ligados ao oxigênio na posição C-17 no macrolídeo. R2 é sempre H nas espinosinas conhecidas, portanto, a variação nessa posição é nova.
- Adicionalmente, o composto 31 tem um novo sistema de anel de macrolídeo de 14 átomos de carbono, desconhecido previamente nos compostos registrados de *S. spinosa*.

Os compostos da invenção podem reagir para formar sais. Os sais que são fisiologicamente aceitáveis são também úteis nas formulações

e nos processos desta invenção. Os sais são preparados usando procedimentos usuais para a preparação de sal. Por exemplo, os compostos da invenção podem ser neutralizados com um ácido apropriado para formar um sal de adição ácido. Os sais de adição ácidos são particularmente úteis. Os

5 sais de adição ácidos adequados representativos incluem os sais formados por reação com um ácido orgânico ou inorgânico, tal como, por exemplo, sulfúrico, clorídrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maléico, fumárico, cólico, pamóico, mícico, glutâmico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, fórmico, láurico, esteárico, salicílico, metanossulfônico, ben-

10 zenossulfônico, sórbico, pícrico, benzóico, cinâmico e ácidos assemelhados.

Outro aspecto desta invenção é um processo para a produção de compostos de fórmulas 1 e 2, que compreende a cultura da cepa *Saccharopolyspora* LW107129 (NRRL 30141) em um meio adequado. Os compostos de fórmulas 1 e 2 são extraídos do caldo de fermentação e do micélio

15 com solventes orgânicos polares. Os compostos podem ser ainda purificados por técnicas bem conhecidas na técnica, tal como cromatografia em coluna.

Os compostos de fórmulas 1 e 2, nos quais R5 é um grupo tendo uma das fórmulas 4a a 4i são úteis para o controle de ácaros, carrapatos e insetos. Portanto, as composições inseticidas e acaricidas e os processos

20 para a redução da populações de insetos, ácaros e carrapatos, usando esses compostos, também são uma parte desta invenção.

Os compostos de fórmulas 1 e 2, nos quais R5 é hidrogênio (C17-pseudoagliconas), são úteis como intermediários na preparação de

25 compostos inseticidas e acaricidas. Por exemplo, esses compostos podem ser glicosilados no grupo hidroxila C-17. A glicosilação pode ser conduzida por síntese química ou por bioconversão microbiana, usando os procedimentos descritos, por exemplo, na patente U.S. 5.539.089.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

30 DESCRIÇÃO DA CULTURA

A nova cepa produtora dos compostos da invenção recebeu a designação LW107129. A cultura LW107129 foi isolada de uma amostra de

solo composta de solos coletados em vários locais. A cultura foi depositada de acordo com os termos do tratado de Budapeste no "Midwest Area Regional Research Center", Serviço de Pesquisa Agrícola, Departamento Norte-Americano de Agricultura, 815 North University Street, Peoria, IL 61604. A
 5 cepa foi depositada em 9 de junho de 1999, e recebeu o número de depósito NRRL 30141.

CARACTERÍSTICAS DA CULTURA

A cepa *Saccharopolyspora* LW107129 produz micélio aéreo e esporos brancos brilhantes nos seguintes meios: Bennett's, ISP2 e ISP5. As
 10 colônias são de cor creme a castanha e o substrato micélio pode assumir uma cor marrom-claro, particularmente em ISP4 & ISP5. A cepa LW107129 não esporula em ISP3 e ISP4. Não foram produzidos quaisquer pigmentos em qualquer meio testado. O micélio da cepa LW107129 sofre fragmentação em cultura líquida.

15 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

A cepa LW107129 produz esporos de ovídeos em cadeias de até 50 esporos. Os esporos são embutidos em uma capa de esporo, e a superfície do esporo é peluda com espinhaços não-freqüentes.

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

20 A cepa *Saccharopolyspora* LW107129 é capaz de produzir ácido dos seguintes substratos: D-arabinose, m-eritritol, D-frutose, D-glicose, glicérol, D-manitol, D-manose, L-ramnose, D-ribose e trealose. A cepa LW107129 não pode produzir ácido de adonitol, L-arabinose, dextrina, dulcitol, etanol, D-galactose, glicogênio, inositol, lactose, maltose, melezitose, melibiose,
 25 rafinose, salicina, D-sorbitol, L-sorbose, sacarose, xilitol e D-xilose. A cepa LW107129 é capaz de assimilar vários ácidos orgânicos, incluindo citrato e succinato, mas não acetato, benzoato, butirato, formiato, oxalato ou tartarato. A cepa LW107129 é capaz de hidrolisar tirosina e uréia, mas não adenina, caseína, esculina, hipurato, hipoxantina, amido ou xantina. LW107129 é
 30 resistente aos seguintes antibióticos: carbenicilina, cefalotina, cicloheximida, geneticina, lincomicina, ácido naladixico, novobiocina, oxitetraciclina, polimixina B, rifampina e espectinomicina, e é sensível à bacitracina, cloroanfeni-

col, eritromicina, higromicina B, estreptomicina, tioestreptona, trimetoprima e vancomicina.

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS

Os metabólitos de fórmulas 1 e 2 são produzidos por cultivo da
 5 cepa LW107129 em meios de fermentação, como descrito abaixo. Uma cul-
 tura de LW107129 é inoculada em meios vegetais e crescida por 48 horas a
 30°C, com agitação a 250 rpm. Sessenta mililitros dessa cultura vegetativa
 de primeiro estágio madura são usados para inocular uma cultura vegetativa
 de meio vegetativo de 2 litros em um balão de cultura de 1 litro. Essa cultura
 10 é incubada a 30°C por 48 horas com agitação a 195 rpm. A semente de se-
 gundo estágio madura é usada para inocular 70 litros de meio em um recipi-
 ente de fermentação de tanque agitado, como descrito no Exemplo 1.

A produção dos compostos de fórmula 1 e 2 pode ser seguida
 durante a fermentação por teste dos extratos do caldo. Um processo preferi-
 15 do para seguir a produção é a análise dos extratos do caldo por cromatogra-
 fia líquida de alto desempenho (HPLC). Um sistema adequado para análise
 é descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 1

PREPARAÇÃO DE METABÓLITOS POR MEIO DE FERMENTAÇÃO

20 Os metabólitos de Fórmulas 1 e 2 são produzidos por cultivo da
 cepa LW107129 em um meio de fermentação, como descrito abaixo. Uma
 cultura vegetativa congelada de 1 ml de LW107129 foi descongelada, ino-
 culada em 100 ml de meios vegetativos em um balão Erlenmeyer de 500 ml
 e crescida a 30°C, por agitação a 250 rpm por 48 horas.

Meio vegetativo	
Ingrediente	Quantidade (g)
Dextrose	9,0
Caldo de soja tripticase	30,0
Extrato de levedura	3,0
Sulfato de magnésio . 7 H ₂ O	2,0
Água desionizada	1.000,0

25 Sessenta mililitros dessa cultura vegetativa de primeiro estágio

- madura foram usados para inocular uma cultura vegetativa secundária de meio vegetativo de 1 litro em um balão de cultura de 2 litros. Essa cultura foi incubada a 30°C por 48 horas de agitação a 195 rpm. A semente do segundo estágio madura foi usada para inocular 70 litros de meio de fermentação em um recipiente de fermentação de tanque agitado.

Meio de fermentação	
Ingrediente	Quantidade (g)
Farinha de soja	5,0
Dextrose	10,0
Glicerina	10,0
Amido solúvel	5,0
Dextrina de batata	20,0
Melaço	10,0
Pó de raspas de milho	5,0
Carbonato de cálcio	3,0
Ácido fítico	1,0
Sulfato de magnésio	0,5
Cloreto férrico . 4 H ₂ O	0,1
Cloreto de zinco	0,1
Cloreto de magnésio . 4 H ₂ O	0,1

A fermentação foi mantida a 30°C, 400 rpm por 7 - 12 dias.

Cerveja de fermentação madura pode ser extraída com um solvente adequado, e os metabólitos recuperados por formação de sal e/ou separação cromatográfica.

10 **EXEMPLO 2**

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO POR HPLC

O método de HPLC a seguir é útil para monitorar a fermentação para a produção de compostos de fórmula 1 e 2.

- Adicionar um volume de etanol desnaturado igual àquele de uma alíquota de caldo de fermentação. Agitar a mistura e deixar em repouso por um mínimo de uma hora. Centrifugar a amostra para remover fragmentos de células volumosos, depois centrifugar uma alíquota de 1 ml. O extrato clarificado é depois analisado pelo seguinte sistema HPLC.

Sistema HPLC:

Fase estacionária da coluna: coluna 250- x 4,6 mm, base de gel de sílica desativada 5 - μm C8 (Hypersil - C8 - BDS).

Fase móvel: gradiente linear de acetato de amônio 10 mM - metanol - acetonitrila resumido abaixo:

Tempo (min)	Solvente A (por cento)	Solvente B (por cento)
0	100	0
20	0	100
25	0	100
30	100	0
35	100	0

- 5 em que o solvente A é acetato de amônio 10 mM e o solvente B é metanol - acetonitrila (1:1)

Vazão: 1 ml/min

Deteção: UV a 250 nm

Os tempos de retenção dos três fatores principais são resumidos

- 10 abaixo:

Composto	Tempo de retenção (min)
7	24,6
1	24,2
3	23,7
12	22,9
15	22,8
18	22,6
8	22,5
17	22,2
13	21,6
14	21,4
19	20,2
20	19,3
21 (ambos C24 epímeros)	16,2

EXEMPLO 3

ISOLAMENTO DE METABÓLITOS INSETICIDAMENTE ATIVOS DE CALDO DE CULTURA

O seguinte exemplo mostra como os compostos de Fórmula 1

mais abundantes foram isolados de uma batelada típica de LW107129 cultivada. O exemplo fornece os procedimentos específicos usados para isolar os compostos 1, 3, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 e 21. Os compostos 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 16, 22 e 23 - 31, produzidos pelo organismo a uma menor abundância do que os compostos listados acima, foram isolados usando processos bastantes similares aplicados em maiores bateladas de extrato de caldo. Em virtude dos processos serem muito similares e familiares àqueles versados na técnica, não são descritos em detalhes aqui.

A cultura total, isto é, as células mais o caldo, da fermentação de cinco litros de meio inoculado tinha um volume total de aproximadamente 3,5 litros após término da fermentação. Essa amostra foi extraída com um volume igual de etanol desnaturado por agitação vigorosa, depois deixar em repouso à temperatura ambiente por duas horas. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação, e os 7 litros de extrato aquoso de etanol foram divididos usando diclorometano (DCM: 2 x 7 litros). O extrato DCM foi concentrado para produzir um óleo amarelo-claro (3,3 g). O óleo foi dissolvido em metanol e dividido em duas alíquotas iguais, cada uma das quais foi cromatografada em uma coluna (4 x 15 cm; 32 - 63 μ m; Biotage, Inc., EUA) de sílica-gel. Cada coluna foi eluída a 20 ml/min usando o seguinte gradiente de solvente linear, depois lavada com um jato de alíquota de solvente G (100 ml):

Tipo e percentual do solvente							
tempo (min)	A	B	C	D	E	F	G
0	100	0	0	0	0	0	0
10	0	100	0	0	0	0	0
15	0	50	50	0	0	0	0
20	0	50	50	0	0	0	0
20.01	0	0	0	100	0	0	0
30	0	0	0	0	100	0	0
40	0	0	0	0	0	100	0
50	0	0	0	0	0	0	100
70	0	0	0	0	0	0	100

em que as composições de solvente (% em volume) eram as seguintes:

	A	B	C	D	E	F	G
Hexano	100%			99,5%			
Tolueno		100%	50%		99,5%		
Acetato de etila			50%			99,5%	70%
Metanol							20%
Água							9,5%
Dietilamina				0,5%	0,5%	0,5%	0,5%

- As frações (30 s; 10 ml cada) foram coletadas durante a eluição. Essas foram analisadas por HPLC de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2, depois as frações de cada perfil de coluna de sílica-gel con-
- 5 tendo os componentes de polaridade similar foram reunidas, como se segue:

Números das frações	Identificador
92-97	SI-1
104-112	SI-2
114-120	SI-3
121-140	SI-4
jato de lavagem	SI-5

Essas frações reunidas foram secas sob vácuo e redissolvidas em metanol, antes de fracionamento adicional, como descrito abaixo.

- As alíquotas da fração SI-1 foram aplicadas a uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partícula) de C-8 sílica-gel de fase reversa
- 10 (Hypersil-BDS-C8). A amostra aplicada foi cromatografada em acetato de amônio (10 mM) - metanol - acetonitrila (30 : 35 : 35), eluindo a 3 ml/min, coletando frações de 0,75 ml. As frações contendo o composto 17 foram reunidas e concentradas à secura, para produzir 14,9 mg do composto 17 puro. As frações contendo o Composto 18 foram reunidas e concentradas à
- 15 secura, para produzir 1,4 mg de Composto 18 puro. As frações contendo o Composto 12 foram reunidas e concentradas à secura, para produzir 4,2 mg de Composto 12 puro.

As alíquotas da fração SI-2 foram aplicadas a uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partícula) de C-8 sílica-gel de fase reversa

(Hypersil-BDS-C8). A amostra aplicada foi cromatografada utilizando o gradiente linear de acetato de amônio (10 mM) - metanol - acetonitrila especificado abaixo eluindo a 3 ml/min, coletando frações de 0,75 ml.

Tempo (min)	Solvente A (por cento)	Solvente B (por cento)
0	60	40
5	60	40
25	0	100
30	0	100
32	60	40
40	60	40

A = acetato de amônio 10 mM

5 B = metanol - acetonitrila (1 : 1)

As frações contendo o Composto 20 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 11,5 mg de Composto 20 puro. As frações contendo o Composto 19 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 3,9 mg de Composto 19 puro. As frações contendo o Composto 14 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 2,0 mg de Composto 14 puro. As frações contendo o Composto 13 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 4,9 mg de Composto 13 puro. As frações contendo o Composto 15 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 2,3 mg de Composto 15 puro. As frações contendo os isômeros 24-epiméricos do Composto 21 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 15 mg de uma mistura dos dois. Essa mistura foi dissolvida em metanol e aplicada a uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partícula) de C-8 sílica-gel de fase reversa (Hypersil-BDS-C8). A amostra aplicada foi cromatografada em acetato de amônio (10 mM) - metanol - acetonitrila (85 : 7,5 : 7,5), eluindo a 3 ml/min, coletando frações de 3 ml. As frações do Composto 21 # 1 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 9,8 mg de Composto 21 # 1 puro. As frações do Composto 21 # 2 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 4,7 mg de Composto 21 # 2.

25 A fração reunida SI-3 foi dissolvida em metanol e cromatografada em uma coluna (4 x 7 cm; 32 - 63 µm; Biotage, Inc., EUA) de sílica-gel. A coluna foi eluída a 20 ml/min usando as seguintes condições do gradiente:

Tempo (min)	Solvente A (por cento)	Solvente B (por cento)
0	100	0
5	100	0
15	60	40
25	0	100
40	0	100

A = hexano - dietilamina (99 : 5 : 0,5)

B = hexano - isopropanol - dietilamina (75 : 25 : 2)

As frações (80 x 0,5 min; 10 ml) foram coletadas e as 46 - 50 foram reunidas e concentradas à secura. A amostra seca foi dissolvida em metanol e aplicada a uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partí-
5 cula) de C-8 sílica-gel de fase reversa (Hypersil-BDS-C8). A amostra aplicada foi cromatografada em acetato de amônio (10 mM) - metanol - acetonitrila (20 : 40 : 40), eluindo a 3 ml/min, coletando frações de 0,75 ml. As frações contendo o Composto 1 foram reunidas e concentradas à secura, para pro-
10 duzir 24,3 mg de Composto 1 puro. As frações contendo o Composto 7 foram reunidas e concentradas à secura, para produzir 1,5 mg de Composto 7 puro.

A fração reunida SI-4 foi dissolvida em metanol e aplicada a uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partícula) de C-8 sílica-gel de
15 fase reversa (Hypersil-BDS-C8). A amostra aplicada foi cromatografada no seguinte sistema de eluição de gradiente linear, a uma vazão de 5 ml/min, coletando 88 frações de 1,25 ml.

Tempo (min)	Solvente A (por cento)	Solvente B (por cento)
0	100	0
20	0	100
25	0	100
30	100	0
35	100	0

A = acetato de amônio 10 mM

B = metanol - acetonitrila (1 : 1)

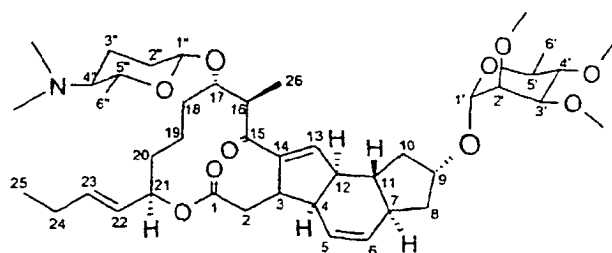
20 As frações contendo o Composto 1 bruto foram reunidas e concentradas à secura, como foram as frações contendo o Composto 8 bruto. Cada uma das frações secas, reunidas originárias como mencionado acima

foi dissolvida em metanol e recromatografada em uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partícula) de C-8 sílica-gel de fase reversa (Hypersil-BDS-C8). As amostras foram eluídas usando acetato de amônio (10 mM) - metanol - acetonitrila (20 : 40 : 40), eluindo a 3 ml/min, coletando frações de 0,75 ml. As frações contendo o Composto 8 foram reunidas e concentradas à securo para produzir 5,8 mg de Composto 8 puro. As frações contendo o Composto 1 foram reunidas e concentradas à securo para produzir mais 7,3 mg de Composto 1 puro.

A fração de lavagem da coluna seca SI-5 foi dissolvida em metanol e aplicada a uma coluna (250 x 10 mm; 8 µm de tamanho de partícula) de C-8 sílica-gel de fase reversa (Hypersil-BDS-C8). A amostra aplicada foi cromatografada em acetato de amônio (10 mM) - metanol - acetonitrila (20 : 40 : 40), eluindo a 3 ml/min, coletando frações de 0,75 ml. As frações contendo o Composto 7 foram reunidas e concentradas à securo, para produzir 3,5 mg de Composto 7 puro.

CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS

As estruturas químicas dos novos componentes foram determinadas por métodos espectroscópicos, incluindo espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa (EM), espectroscopia por ultravioleta (UV) e por comparação com espinosinas A e D e análogos relacionados. Os parágrafos a seguir descrevem as propriedades espectroscópicas dos componentes descritos acima. Nessa discussão, uma análise detalhada das propriedades espectroscópicas do Composto 1 é apresentada. Essa é seguida depois por uma discussão das características espectroscópicas para os outros componentes relacionados, possibilitando que uma pessoa versada na técnica conclua a estrutura química, por comparação com os dados para o Composto 1. Para conveniência para o leitor, o diagrama a seguir do Composto 1 proporciona as designações da posição de todos os dados espectrais de RMN para os fatores naturais apresentados abaixo:



O Composto 1 tem as seguintes características:

Peso molecular: 757

Fórmula molecular: $C_{43}H_{67}NO_{10}$

UV (por detecção de sistema de diodo durante análise LC, solvente = metanol - acetonitrila (1 : 1)): 244 nm

Eletroaspersão EM: m/z para $[M + H]^+ = 758,5$; íon de fragmento de açúcar de forosamina a m/z de 142,1.

ESI - EM preciso: m/z para $[M + H]^+ = 758,4845 \pm 0,0007$ (teoria: 758,4843).

A Tabela II resume os dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C para o Composto 1 em $CDCl_3$.

TABELA II

Dados de deslocamento químico para o Composto 1 ($CDCl_3$)

Posição	1H	^{13}C	Posição	1H	^{13}C
1	-	172,1	22	5,30	128,0
2	3,14	34,5	23	5,66	134,9
	2,39		24	1,99	25,0
3	3,02	47,6	25	0,95	13,1
4	3,42	41,3	26	1,20	16,3
5	5,79	128,7			
6	5,87	129,3	1'	4,86	95,4
7	2,16	41,1	2'	3,50	77,7
8	1,92	36,2	2'-OMe	3,48	59,0
	1,35		3'	3,46	81,0
9	4,30	76,0	3'-OMe	3,48	57,6
10	2,26	37,3	4'	3,11	82,2
	1,34		4'-OMe	3,56	60,9
11	0,90	46,0	5'	3,55	67,9
12	2,86	49,4	6'	1,28	7,8
13	6,77	147,5			
14	-	144,1	1''	4,42	103,6
15	-	202,8	2''	1,98	30,9
16	3,31				
17	3,66	80,8	3''	1,86	18,3
18	1,60	34,2		1,50	

19	1,80	21,4	4"	2,22	64,8
	1,23		4"-NMe ₂	2,23	40,7
20	1,60	31,6	5"	3,50	73,7
21	5,04	76,3	6"	1,26	18,9

Os deslocamentos químicos referidos a TMS a 0 ppm.

As características espectroscópicas de RMN distintas dos outros metabólitos foram como é descrito a seguir.

- Os espectros de RMN das estruturas tendo a estrutura de macrolídeo básica do Composto 7 foram exemplificados pela ausência dos sinais de prótons a 5,8 e 5,7 ppm, e pela presença de uma nova ressonância olefínica a 5,5 ppm. Adicionalmente, uma ressonância de metila a 1,7 ppm indicou a presença de um grupo metila olefínico. Os espectros de RMN das estruturas tendo a estrutura de macrolídeo básica do Composto 8 foram exemplificados por várias características. H-8 apareceu como um duplete a 4,15 ppm, e H-9 apareceu a 4,1 ppm (dd). Não houve qualquer constante de acoplamento mensurável entre H-8 e H-9. O sinal para H-11 foi movimentado campo abaixo para 1,5 ppm. A hidroxilação na posição C24 em quaisquer dessas estruturas de 2-butenila foi indicada por um deslocamento campo abaixo de ambos o H-24 e H-25, que apareceram como um multiplete e triplete, respectivamente. Concorrentemente, H-23 variou para um duplete duplo. Os espectros RMN das estruturas tendo a estrutura de macrolídeo básica do Composto 11 foram exemplificadas pela adição de ressonâncias olefínicas a 5,1, 5,25, e 5,6 ppm, com os modelos de acoplamento consistentes com um grupo olefínico terminal. Adicionalmente, o sinal indicativo de um grupo metila alifático terminal a 0,9 - 1,0 ppm esteve ausente. Os espectros de RMN dos compostos tendo a estrutura de macrolídeo básica do Composto 16 foram exemplificados pelo deslocamento campo abaixo de H-24 e o colapso da estrutura de triplete um duplete a aproximadamente 1,4 ppm. Nesses casos, H-23 mudou para um duplete de quartetos, e análise de um espectro 2D COSY indicou acoplamento desse duplete em outro próton olefínico, indicando a presença de um grupo propenila. Os espectros de RMN dos compostos tendo a estrutura de macrolídeo básica do composto 23 foram exemplificados e foram distintos das espinosinas conhecidas previa-

mente por exame dos experimentos 2D COSY e TOCSY. A análise do caminho de acoplamento originário de H-25 indicou um grupo butila de 4 átomos de carbono ligado na C-21. As subestruturas de glicosídeo presas no oxigênio em C-17 foram identificadas usando vários experimentos de RMN bidimensionais.

Os metil tripletos H-25 e H-24 do macrolídeo de anel expandido 31 lembravam o grupo etila na espinosina A. Adicionalmente, H-21 se movimentou campo acima para 4,8 ppm, em relação à sua posição no composto 1. No entanto, os prótons olefínicos ainda estavam presentes. Um espectro 2D COSY mostrou que ambos o grupo etila e a olefina estavam acoplados ao H-21, indicando que a dupla-ligação nesse composto estava dentro do anel. Isso foi consistente com esse composto sendo um isômero do composto 1, com base no seu peso molecular sendo de 758, do espectro de massa.

Uma lista de todos os metabólitos com o íon aduto molecular observado em ESI-EM, do qual o peso molecular foi deduzido, é mostrada na Tabela III:

Composto N ^o .	Dados espectrais de massa básicos ¹ (m/z)	
1	758,5	[M+H] ⁺
2	774,5	[M+H] ⁺
3	744,5	[M+H] ⁺
4	774,4	[M+H] ⁺
5	744,8	[M+H] ⁺
6	744,8	[M+H] ⁺
7	772,5	[M+H] ⁺
8	774,5	[M+H] ⁺
9	774,7	[M+H] ⁺
10	760,5	[M+H] ⁺
11	756,5	[M+H] ⁺
12	748,5	[M+NH ₄] ⁺
13	810,5	[M+NH ₄] ⁺
14	764,5	[M+NH ₄] ⁺
15	808,5	[M+NH ₄] ⁺
16	744,5	[M+H] ⁺
17	617,4	[M+H] ⁺

18	631,4	$[M+H]^+$
19	633,4	$[M+H]^+$
20	650,4	$[M+NH_4]^+$
21 ²	666,4	$[M+NH_4]^+$
22	615,4	$[M+H]^+$

¹ Íons adutos moleculares observados durante LC/MC com ionização de eletroaspersão.

² dois isômeros, ambos tinham as mesmas características EM.

ATIVIDADE INSETICIDA E ACARICIDA

5 Os compostos da invenção (diferentes daqueles nos quais R5 é H) são úteis para o controle de insetos, ácaros e carrapatos. Portanto, um outro aspecto da presente invenção é direcionado a métodos para inibir um inseto, ácaro ou carrapato, que compreende a aplicação no local do inseto, ácaro ou carrapato de uma quantidade inibidora de inseto, ácaro ou carra-
10 pato de um composto de fórmula 1 ou 2, em que R5 é um grupo tendo uma das fórmulas 4a a 4i.

O "local" do inseto, ácaro ou carrapato se refere ao meio no qual o inseto, ácaro ou carrapato vive ou no qual os seus ovos estão presentes, incluindo o ar que o circunda, a comida que come, ou os objetos que conta-
15 tam. Por exemplo, os insetos ou ácaros que ingerem vegetais podem ser controlados por aplicação do composto ativo nas partes das plantas que os insetos ou ácaros comem ou habitam, particularmente, a folhagem.

Por meio do termo "inibir um inseto, ácaro ou carrapato", quer-se mencionar que há uma diminuição no número de insetos, ácaros ou carra-
20 patos vivos, ou uma diminuição no número de ovos. O grau de redução feito por um composto depende, naturalmente, da taxa de aplicação do composto, do composto particular usado e da espécie de inseto, ácaro ou carrapato alvo. Pelo menos uma quantidade de desativação de inseto, desativação de ácaro ou desativação de carrapato deve ser usada. Por "quantidade de de-
25 sativação", quer-se mencionar que uma quantidade do composto é usada para provocar uma redução mensurável na população de inseto, ácaro ou carrapato tratada. Tipicamente, de cerca de 1 a cerca de 1.000 ppm (ou 0,01 a 1 kg/acre) de composto é usada.

Os compostos mostram atividade contra vários insetos, ácaros e carrapatos. Mais especificamente, os compostos mostram atividade contra os elementos da ordem de insetos Lepidópteros, tais como lagarta das be-
 terrabas, lagarta dos brotos de tabaco, traça de maçãs e mede-palmos de
 5 repolho. Outros elementos típicos dessa ordem incluem a lagarta dos cereais do sul, as lagartas destruidoras, as traças de roupas, as traças de fubá, os enroladores de folha, as minhocas de milho, as lagartas de algodão, as
 brocas de milho europeu, as lagartas de repolho importadas, as lagartas algodoeiras cor-de-rosa, as lagartas de sacas, as lagartas de casulos em for-
 10 ma de tenda orientais, as lagartas de relvas e as lagartas dos cereais de outono.

Os compostos também mostram atividade contra os elementos da ordem dos coleópteros (os besouros e brocas, tais como o besouro da batata do Colorado, os besouros de pepinos manchados e desfolhados, os
 15 besouros japoneses, e os gorgulhos do algodão) e Dípteros (as moscas genuínas, tais como mosca doméstica, mosquitos, moscas de frutas, moscas estáveis e de chifre, e mineiras de folhas).

Os compostos também mostram atividade contra os elementos da ordem dos hemipteros (percevejos genuínos, tais como percevejos de
 20 plantas, percevejos de mau cheiro e percevejos domésticos), homópteros (tais como afídeos, cigarras cicadúlidas, cigarras de plantas, moscas brancas, cochonilas e percevejos farináceos), malófagos (piolhos de mascar), anopluros (piolhos de sucção), tisanópteros (tripse), ortópteros (tais como baratas de aves, gafanhotos e grilos), sifonápteros (pulgas), isópteros (cupins) e elementos dos formicidas da ordem dos himenópteros (formigas).

Os compostos também mostram atividade contra ácaros e carrapatos da ordem dos acarídeos, por exemplo, os ácaros de tripé de dois pontos. Outros elementos típicos dessa ordem incluem parasitas de plantas, tais como ácaros vermelhos cítricos, ácaros vermelhos europeus e ácaros
 30 chatos cítricos, e parasitas animais tais como ácaros de sarna, ácaros de feridas, ácaros de feridas de ovelhas, ácaros de galinhas, ácaros de infestação de piolhos, ácaros de depenação e ácaros de folículos de cães.

As pestes humanas representativas específicas, que podem ser controladas pelos presentes compostos, incluem as seguintes: *Amblyomma americanum* (carrapato de estrela solitária), *Amblyomma maculatum* (carrapato da costa do golfo), *Argas persicus* (carrapato de aves comestíveis), *B*
 5 *ophilus microplus* (carrapato de gado), *Choriotptes* spp. (ácaro de sarna), *Demodex bovis* (ácaro de folículo de gado), *Demodex canis* (ácaro de folículo de cães), *Dermacentor andersoni* (carrapato de febre manchado das Montanhas Rochosas), *Dermacentor variabilis* (carrapato de cães norte-americanos), *Dermanyssus gallinae* (ácaro de galinhas), *Ixodes ricinus* (car-
 10 rapato de ovelhas comum), *Knemidokoptes gallinae* (ácaro de depenação), *Knemidokoptes mutans* (ácaro de pema piolhenta), *Otobius megnini* (carrapato do ouvido), *Psoroptes equi* (ácaro de ferida), *Psoroptes ovis* (ácaro de ferida), *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato de cão marrom), *Sarcoptes scabiei* (ácaro de sarna), *Aedes* (mosquitos), *Anopheles* (mosquitos), *Culex*
 15 (mosquitos), *Culiseta*, *Bovicola bovis* (piolhos mordedores de gado), *Callitroga homnivorax* (mosca-varejeira), *Chrysops* spp. (mosca de cervo), *Cimex lectularius* (percevejo), *Cochliomyia* spp. (verme roedor), *Ctenocephalides canis* (pulgas de cães), *Ctenocephalides felis* (pulgas de gatos), *Culicoides* spp. (mosquitos, mosquitos pólvoras "punkies" ou "no-see-ums"), *Damalinia*
 20 *ovis* (piolhos mordedores de ovelhas), *Dermatobia* spp. (mosca-do-berne), *Gasterophilus haemorrhoidalis* (mosca pica-boi do nariz), *Gasterophilus intestinalis* (mosca pica-cavalo comum), *Gasterophilus nasalis* (mosca chinesa), *Glossina* spp. (mosca tsé-tsé), *Haematobia irritans* (mosca de galho de veado, mosca de búfalo), *Haematopinus asini* (piolho sugador de cavalo),
 25 *Haematopinus ovillus* (piolho corpóreo), *Haematopinus suis* (piolho de suínos), *Hydrotaea irritans* (mosca da cabeça), *Hypoderma bovis* (mosca de bomba), *Hypoderma lineatum* (mosca do calcanhar), *Linognathus ovillus* (piolho corpóreo), *Linognathus pedalis* (piolho do pé), *Linognathus vituli* (piolho de gado de nariz longo), *Lucilla* spp. (piolho de gusano), *Melophagus ovinus*
 30 (bicho de curral de ovelha), *Musca* spp. (mosca doméstica, mosca da face), *Oestrus ovis* (mosca pica-boi de nariz), *Pediculus* spp. (piolhos), *Phlebotomus* spp. (mosquito-pólvora), *Phorina regina* (mosca-varejeira), *Psoropha*

spp. (mosquito), Pthirus spp. (piolhos), Reduvius spp. (percevejo assassino), Simulium spp. (mosca preta), Solenopotes capillatus (piolho de gado azul pequeno), Stomoxys calcitrans (mosca estável), Tabanus spp. (mosca de cavalo), Tenebrio spp. (larvas de farinha), Triatoma spp. (percevejos beijadores).

Os compostos são úteis para a redução das populações de insetos, ácaros e carrapatos, e são usados em um processo de inibição de uma população de insetos, ácaros e carrapato, que compreende a aplicação em um local de uma quantidade efetiva de desativação de inseto, ácaro ou carrapato de um composto ativo da invenção. Em uma concretização preferida, a presente invenção é dirigida a um processo para a inibição de um inseto suscetível da ordem dos lepidópteros, que compreende a aplicação a uma planta de uma quantidade eficaz de desativação de inseto de um composto ativo da invenção. Uma outra concretização preferida da invenção é dirigida a um processo para inibir as moscas mordedoras da ordem dos dípteros em animais, que compreende a administração de uma quantidade inibidora de peste de um composto oral, parenteral ou topicamente no animal. Outra concretização preferida da invenção é dirigida a um processo para inibir ácaros ou carrapatos da ordem dos acarinos, que compreende a aplicação no local do ácaro ou carrapato de uma quantidade inibidora de ácaro ou carrapato de um composto ativo da invenção.

Os compostos aqui descritos não são apenas úteis na produção de produtos agrícolas, os sais de adição ácidos desses compostos, quando possível, também são produtos úteis. Esses sais são úteis, por exemplo, na separação e purificação dos compostos de fórmulas 1 e 2. Além disso, alguns desses sais podem ter uma maior solubilidade em água. Os sais de adição ácidos podem ser preparados dos compostos descritos na Fórmula 1, em que R5 é uma molécula de açúcar contendo nitrogênio básico, tal como forosamina. Os sais dos compostos são preparados usando tecnologia usual para a preparação de sais, que são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Os sais de adição ácidos, que são particularmente úteis incluem, mas não são limitados aos sais formados por reações usuais com ambos os

ácidos orgânicos e inorgânicos, tais como sulfúrico, clorídrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maléico, fumárico, cólico, pamóico, mícico, glutâmico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, fórmico, láurico, esteárico, salicílico, metanossulfônico, benzenossulfônico, sórbico, pícrico, benzóico, cinâmico e ácidos assemelhados.

Exemplo 4

Telas de insetos

A. Ensaio de encharcamento de lagarta de broto de tabaco recém-nascida (*Heliothis virescens*).

Para comparar as atividades inseticidas dos compostos de fórmula 1 em *Heliothis virescens* larvais recém-nascidas (< 6 h pós-eclosão), soluções de acetona a 1 µg/µl de cada dos metabólitos foram primeiramente preparadas. As soluções de acetona foram depois diluídas com Millipore H₂O contendo 0,025% de tensoativo Triton X-100, para produzir tratamentos de 25 ou 50 ppm. Um mililitro de quaisquer das concentrações de cada metabólito foi depois diretamente pipetado em e sobre um papel de filtro qualitativo Whatman nº 1 circular de diâmetro de 100 mm, sobre o qual foram colocados suavemente larvas recém-nascidas de lagarta de broto. Cada papel de filtro tratado e as suas larvas associadas foi depois colocado em uma placa Petri de plástico descartável de 20 mm x 100 mm. Uma hora depois, uma parte de 1 cm³ de dieta de lepidópteros à base de ágar (dieta Shorey modificada, Southland Products, Lake Village, AR) foi colocada em cada cápsula como uma fonte de alimento larval. As placas Petri foram mantidas a 27°C por 24 h e depois a mortalidade larval percentual em cada tratamento foi determinada. Os resultados são apresentados a seguir na Tabela IV.

B. Ensaio tópico de lagarta de beterraba (*Spodoptera littoralis*).

Uma medida adicional das atividades inseticidas relativas dos compostos de fórmula 1 foi gerada por uso de uma solução de metanol a 1 µg/µl de cada composto aplicado a 1 µl por larva de *Spodoptera littoralis* cultivado em laboratório, (peso médio de 43 mg). Cada composto foi aplicado ao longo do dorso de cada uma das seis larvas. As larvas tratadas foram depois mantidas por cinco dias a 21°C, 60% de umidade relativa em placas

de cultura plásticas de seis cavidades. As larvas foram todas supridas com um 1 cm³ de dieta de lepidópteros à base de ágar, para sustentação durante o intervalo pós-exposição de 5 dias.

- 5 A mortalidade percentual foi determinada ao final de um período de cinco dias. Os resultados são apresentados na Tabela IV.

TABELA IV

Composto	Encharcamento de lagarta de broto recém-nascida de tabaco (24 h)		Lagarta de beterraba tópica (120 h)	
	Taxa (ppm)	Mortalidade (%)	Taxa (ug/larva)	Mortalidade (%)
1	50	100	1	100
2	50	100	1	100
3	-	NT	1	100
4	50	100	1	100
5	-	NT	-	NT
6	-	100	-	NT
7	50	NT	1	100
8	-	NT	1	100
9	50	100	1	33
10	50	100	1	0
11	50	100	1	100
12	50	100	1	50
13	25	45	1	0
14	25	100	1	NT
15	25	100	-	67
16	50	100	1	100
17	25	10	1	0
18	25	0	1	0
19	25	93	1	0
20	25	20	1	0
21 n°1	25	4	1	0
21 n°2	25	7	1	0
23	-	NT	-	NT
24	50	100	1	50
25	50	100	1	17
26	50	100	1	100
27	50	100	1	100
28	50	100	1	17
29	-	NT	-	NT

30	-	NT	-	NT
31	50	100	1	100

COMPOSIÇÕES INSETICIDAS

Os compostos são aplicados na forma de composições, que também são uma parte desta invenção. Essas composições compreendem uma quantidade de desativação de inseto ou ácaro ou carrapato de um composto da invenção em um veículo inerte fitologicamente aceitável. O(s) ingrediente(s) ativo(s) pode(m) estar presente(s) como um composto único, uma mistura de dois ou mais compostos, ou uma mistura de um ou mais compostos da invenção juntamente com a parte seca do meio de fermentação no qual é produzido.

As composições são preparadas de acordo com os procedimentos e fórmulas que são convencionais na técnica de controle agrícola ou de peste, mas que são novas e importantes, por causa da presença de um ou mais dos compostos desta invenção. As composições podem ser formulações concentradas, que são dispersas em água, ou podem estar na forma de uma formulação em pó, de isca ou granular usada sem tratamento posterior.

As dispersões nas quais os compostos ou o material seco bruto são aplicados são tipicamente suspensões ou emulsões aquosas, preparadas de formulações concentradas dos compostos ou de material bruto. As formulações solúveis em água ou em suspensão em água ou emulsificáveis são sólidos, pós molháveis ou líquidos, conhecidos como concentrados emulsificáveis ou suspensões aquosas. Os pós molháveis podem ser aglomerados ou compactados, para formar grânulos dispersíveis em água. Esses grânulos compreendem misturas de composto ou material seco bruto, veículos inertes e tensoativos. A concentração do composto ou material seco bruto é, tipicamente, entre cerca de 0,1% a cerca de 90% em peso. O veículo inerte é, tipicamente, argilas de atapulgita, argilas de montmorillonita e terras diatomáceas ou silicatos purificados.

Os tensoativos compreendem, tipicamente, cerca de 0,5% a cerca de 10% do pó molhável, em que os tensoativos são, tipicamente, ligninas

sulfonadas, sulfonatos de naftaleno condensados, sulfonatos de naftaleno, benenosulfonatos de alquila, sulfonatos de alquila ou tensoativos não-iônicos, tais como adutos de óxido de etileno de alquilfenóis ou as suas misturas.

5 Os concentrados emulsificáveis dos compostos reivindicados variam, tipicamente, de cerca de 50 a cerca de 500 gramas de composto por litro de líquido, equivalente a cerca de 10% a cerca de 50% dissolvido em um veículo inerte que é uma mistura de um solvente imiscível em água e emulsificantes. Os solventes orgânicos incluem orgânicos, tais como xilenos,
10 e frações de petróleo, tais como as partes de petróleo olefínicas e naftênicas de alto ponto de ebulição, que incluem nafta pesado e aromático. Outros orgânicos também podem ser usados, tais como solventes terpênicos - derivados de breu, cetonas alifáticas, tal como cicloexanona, e álcoois complexos. Os emulsificantes para os concentrados emulsificáveis são, tipicamente,
15 tensoativos iônicos e/ou não-iônicos misturados, tais como aqueles aqui mencionados ou os seus equivalentes.

As suspensões aquosas podem ser preparadas contendo compostos insolúveis em água desta invenção, em que os compostos são dispersos em um veículo aquoso, a uma concentração tipicamente na faixa entre cerca de 5% a cerca de 50% em peso. As suspensões são preparadas
20 por moagem fina do composto e mistura intensa em um veículo de água, tensoativos e dispersantes, como aqui discutido. Os ingredientes inertes, tais como os sais inorgânicos e as gomas naturais ou sintéticas, também podem ser empregados para aumentar a densidade e/ou a viscosidade do veículo
25 aquoso, como é desejado.

Os materiais fluidos precipitados podem ser preparados por dissolução da molécula ativa em um solvente miscível em água e tensoativos ou polímeros superficialmente ativos. Quando essas formulações são misturadas com água, o composto ativo precipita com o tensoativo, controlando o
30 tamanho do precipitado microcristalino resultante. O tamanho do cristal pode ser controlado por meio da seleção das misturas específicas de polímero e tensoativo.

Os compostos também podem ser aplicados como uma composição granular, que é aplicada ao solo. A composição granular contém, tipicamente, de cerca de 0,5% a cerca de 10% em peso do composto. O composto é disperso em um veículo inerte, que é, tipicamente, argila ou uma substância equivalente. De um modo geral, as composições granulares são preparadas por dissolução do composto em um solvente adequado, e aplicação dele em um veículo granular, que tenha sido pré-formado no tamanho de partícula desejável. O tamanho de partícula é, tipicamente, entre cerca de 0,5 mm a 3 mm. As composições granulares também podem ser preparadas por formação de uma massa ou pasta do veículo e do composto, secagem da mistura combinada, e trituração da massa ou pasta no tamanho de partícula desejado.

Os compostos também podem ser combinados com um solvente orgânico apropriado. O solvente orgânico é, tipicamente, um óleo de petróleo brando, que é amplamente usado na indústria agrícola. Essas combinações são tipicamente usadas como um spray. Mais tipicamente, os compostos são aplicados como uma dispersão em um veículo líquido, em que o veículo líquido é água. Os compostos também podem ser aplicados na forma de uma composição em aerossol. O composto é dissolvido em um veículo inerte, que é uma mistura propelente geradora de pressão. A composição em aerossol é acondicionada em um recipiente, em que a mistura é dispersa por meio de uma válvula de atomização. As misturas propelentes contêm quaisquer halocarbonetos de baixo ponto de ebulição, que podem ser misturados com solventes orgânicos ou suspensões aquosas pressurizadas com gases inertes ou hidrocarbonetos gasosos.

A quantidade de composto aplicada nos locais de insetos, ácaros e carrapatos não é crítica e pode ser facilmente determinada por aqueles versados na técnica. Geralmente, concentrações de cerca de 10 ppm a cerca de 5.000 ppm dos compostos proporcionam o controle desejado. Para cultivos, tais como de soja e algodão, a taxa de aplicação é de cerca de 0,01 a cerca de 1 kg/ha, em que o composto é aplicado em uma formulação de spray de 18,92 a 189,25 litros (5 a 50 galões) / A. Os compostos podem ser

aplicados em qualquer local habitado por um inseto, ácaro ou carrapato. Esse local é, tipicamente, cultivos de algodão, soja e vegetais, árvores frutíferas e de nozes, videiras, plantas domésticas e ornamentais.

Os compostos da presente invenção também são úteis no tratamento de animais, para controlar os artrópodos, isto é, os insetos e os aracnídeos, que são pestes em animais. Essas pestes de artrópodos atacam, tipicamente, os seus hospedeiros na superfície externa ("ecto"); os agentes que controlam essas pestes são referidos como "ectoparasitoides". Todos os animais são sujeitos a ataque por essas pestes, ainda que os problemas sejam mais graves entre os hospedeiros vertebrados. Os seres humanos são hospedeiros potenciais para muitas parasitas, e em áreas tropicais e em áreas com sanitização mínima, as infecções parasíticas são um problema habitual na prática médica. Também são bastantes sujeitos a ataque por parasitas, vários animais de criação, tais como gado, ovelhas, porcos, cabras, búfalos, búfalos-da-índia, cervos, coelhos, galinhas, perus, patos, gansos, avestruzes e assemelhados. Cavalos e outros animais a gosto estão sujeitos a ataque parasítico, como estão as martas e outros animais criados para obtenção de pele, e ratos, camundongos e outros animais usados em laboratório e como cobaias de pesquisa. Os animais de companhia, tais como cães e gatos, estão bastante sujeitos a ataque por parasitas, e por causa do relacionamento estreito deles com seres humanos, esse parasitismo possui problemas para os seres humanos com os quais estão associados. Peixes, crustáceos e outras espécies aquáticas também estão sujeitos a ataque parasítico. Em suma, o parasitismo envolve como hospedeiros essencialmente toda a gama de animais.

O tributo econômico das infestações ectoparasíticas é grande. No domínio da criação, os animais sofrem de menor eficiência alimentícia e taxas de crescimento. A produção de leite e de lã sofre, e há dano na toquia, couro e pele. Os animais ficam suscetíveis às infecções microbiológicas secundárias e a um ataque parasítico adicional. As ectoparasitas também provocam um desconforto considerável, mesmo quando não são bastante nocivas à saúde e à produção.

Embora vários parasiticidas estejam em uso, sofrem de vários problemas, incluindo um espectro de atividade limitado, toxicidade ambiental, a necessidade para um tratamento repetido e, em muitos casos, resistência às ectoparasitas. Portanto, há uma necessidade persistente para novos ectoparasiticidas.

Os compostos da invenção proporcionam uma nova ferramenta nas armas para o controle de ectoparasitas. Nesta concretização, a presente invenção é dirigida a um processo para inibir ou exterminar uma peste artrópoda em um animal hospedeiro, que compreende o contato da peste com uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção.

A atividade ectoparasiticida dos presentes compostos é obtida quando os compostos entram em contato com as pestes. O contato pode ser no estágio de vida de ovos, larvas, adulto ou outro. "Contato" inclui ingestão do composto pela peste.

EXEMPLO 5

Ensaio in vivo de camundongo / mosca estável adulta (ASF)

No dia 0 de estudo, seis camundongos brancos de laboratório de trinta gramas (*Mus musculus*) (8 - 10 semanas de idade, fêmeas ICR, Harlan-Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, IN.) por tratamento foram dosados com o artigo ou solvente de teste (90% de oleato de etila / 10% de DMSO), oral ou topicamente. No dia de estudo 1, dois camundongos de cada tratamento foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 0,25 ml de uma combinação de 1,0 ml de cetamina (Fort Dodge, Ketaset[®], injeção de cetamina HCl, 100 mg/ml) e 1,0 ml de xilazina (Bayer, Rompun[®], 20 mg/ml injetável) em 4,5 ml de água estéril. Os camundongos anestesiados foram colocados nas caixas de moscas contendo 30 moscas estáveis adultas. Os camundongos anestesiados foram deixados nas caixas por até 60 minutos, e as moscas deixadas chupar sangue tranquilamente. Após remoção das caixas de mosca, os camundongos inconscientes foram eutanizados imediatamente com CO₂. As caixas de mosca foram expostas a um ciclo de 12 horas dia / 12 horas noite por todo o período de estudo. A temperatura no ambiente do ensaio foi de 20 - 22,2°C (68 - 72°F) e a umidade foi de 50 - 60%.

- Esses procedimentos foram repetidos exatamente nos dias de estudo 2 e 3 com os camundongos tratados remanescentes. A cada dia, o número de moscas mortas foi registrado e as caixas de mosca descartadas. A percentagem mortalidade total das moscas foi determinada para cada tratamento e comparada com a mortalidade das moscas das ASF alimentadas continuamente e de ASF alimentadas a camundongos de controle tratados com solvente. Os resultados dos compostos de teste 1 e 8 são os seguintes:

tratamento	% de mortalidade			
	dia 1	dia 2	dia 3	total
100 mg solvente / kg	6	10	10	10
Composto 1	16	53	86	86
Composto 8	13	46	76	76

EXEMPLO 6

Ensaio in vitro de teste de pacote larval (LPT) de carrapatos

- Os níveis titulados dos compostos experimentais foram dissolvidos em uma combinação de azeite de oliva e tricloroetileno e pipetados em quadrados de papel de filtro de laboratório. Após deixar cerca de uma hora para evaporação do tricloroetileno, os papéis de filtro foram dobrados à metade e dois lados presos com grampos, formando pacotes. Aproximadamente, 100 carrapatos larvais (*Amblyomma americanum*) foram colocados dentro de cada pacote e o lado aberto remanescente fixado com um grampo. Os pacotes foram incubados por 24 horas a aproximadamente 22,2°C (72°F) e 95% de umidade. Cada pacote foi aberto separadamente e o número de larvas vivas e mortas determinado. A mortalidade percentual foi determinada para cada composto. Os resultados dos compostos de teste 1 e 8 são os seguintes:

Composto	0,5% / 5000 ppm	0,1% / 1000 ppm	0,05% / 500 ppm
1	100%	100%	93,58%
8	100%	69,87%	12,47%

EXEMPLO 7

Ensaio in vitro de mosca estável adulta

Carrapatos dentais foram saturados com soro contendo níveis titulados de compostos experimentais começando em 100 ppm. Os carrapatos dentais foram colocados em cápsulas Petri, juntamente com 10 moscas estáveis adultas 10 (*Stomoxys calcitrans*), resfriados previamente para um manuseio mais fácil. A mortalidade percentual foi determinada após 24 e 48 horas de incubação a aproximadamente 25°C e umidade de 75 - 85%, quando comparada com uma cápsula contendo uma mecha com apenas soro de controle. Os resultados dos compostos de teste 1 e 8 são os seguintes:

Composto	Dia	% de mortalidade			
		5,0 ppm	1,0 ppm	0,5 ppm	0,1 ppm
1	24hr	60	10	20	10
	48hr	70	30	20	10
8	24hr	90	30	10	0
	48hr	100	80	10	0

10 EXEMPLO 8

Ensaio in vitro de mosca-varejeira larval

Insertos de filtro foram colocados individualmente em placas de microtítulos de 96 cavidades. Cada inserto foi saturado com soro bovino combinado com níveis titulados de compostos experimentais iniciando a 100 ppm. Aproximadamente 30 moscas-varejeiras larvais (*Phormia regina*) foram colocadas em cada cavidade e toda a placa selada. As placas foram incubadas por até 48 horas de incubação a aproximadamente 25°C e 75 - 85% de umidade, após o que a eficiência foi determinada por inspeção visual de cada cavidade para movimento das larvas. Os resultados dos compostos de teste 1 e 8 são os seguintes (ambos os compostos eram ativos acima de 5 ppm):

Composto	5ppm	2,5ppm	1,25ppm	0,62ppm	0,31ppm	0,15ppm
1	A	A	A	N	N	N
8	A	N	N	N	N	N

A indica mortalidade, como indicado pela ausência de movi-

mento de larvas. N indica que foi observado movimento de larvas.

As técnicas para transferir ectoparasitocidas são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Em geral, um presente composto é aplicado na superfície externa de um animal, com o que entra em contato com as pestes já presentes no hospedeiro, bem como aqueles que chegam no corpo do hospedeiro dentro do período de eficiência do composto. Tipicamente, o composto é formulado em uma formulação líquida, que é aspergida na superfície do animal ou despejada na superfície do animal. Outro tratamento convencional é por "imersão", em que o gado é tratado por uma imersão substancial em uma solução diluída de um ectoparasitocida. Para alguns hospedeiros e pestes, a formulação pode ser um pó, que é borrifado no hospedeiro, ou um xampu ou creme, que é empregado no banho dos animais. Colares em gatos e cães também são empregados como um meio de transferência de um ectoparasitocida diretamente na superfície do animal.

Em uma outra concretização, os compostos da invenção podem ser transferidos para os animais usando marcadores de orelha, um processo de transferência descrito na Patente U.S. 4.265.876.

Em uma outra técnica, um ectoparasitocida é aplicado em locais freqüentados por animais, de modo que as pestes são, desse modo, postas em contato uniformemente, como em aplicação direta com o hospedeiro. A aplicação no local em que dorme o animal doméstico é bem conhecida, como é a aplicação em tapetes. Para gado, os sacos de empoeiramento são bem conhecidos. Esses são posicionados em um vão ocupado pela porta, no qual o gado inevitavelmente se esfrega contra o saco, e as pestes são postas em contato pelo presente composto.

Ainda em uma outra concretização, os presentes compostos podem ser usados para controlar as pestes humanas nas fezes de gado e de outros animais. Nesta concretização, os compostos são administrados oralmente e os compostos se deslocam pelo trato intestinal e emergem nas fezes. O controle de pestes nas fezes protege, indiretamente, os animais das pestes.

Os compostos são formulados para uso como ectoparasitocidas

em maneiras conhecidas por aqueles versados na técnica. Em geral, uma formulação vai incluir um composto da presente invenção e um ou mais auxiliares fisiologicamente aceitáveis. As formulações incluem versões concentradas, nas quais o presente agente ativo está presente em uma concentração de 0,001 a 98,0 por cento, com o teor remanescente sendo veí-
culos fisiologicamente aceitáveis. Essas formulações, especialmente aque-
las com menos do que 50 por cento do presente composto, podem ser, al-
gumas vezes, usadas diretamente mas estas formulações podem também
ser diluídas com outros veículos fisiologicamente aceitáveis, para formar
formulações de tratamento mais diluídas. Essas últimas formulações podem
incluir o agente ativo em concentrações mais baixas de 0,001 a 0,1 por
cento.

Os compostos da invenção também são úteis como substâncias farmacêuticas para seres humanos para o controle de parasitas, por exem-
plo, piolhos. Os compostos podem ser usados, por exemplo, nas formula-
ções para controle de piolhos, que são descritas no Pedido de Patente Inter-
nacional WO 00/01347.

Os anopluros, ou piolhos sugadores, são parasitas encontrados em quase todos os grupos de mamíferos. Das 15 famílias reconhecidas de
anopluros, duas famílias, *Pediculidae* e *Pthiridae*, têm espécies encontradas
em seres humanos. *Pediculus humanus* é a única espécie na família *Pedicu-
lidae* que infesta seres humanos. Inclui piolhos do couro cabeludo, *Pediculus
humanus capitis*; e o piolho do corpo ou da roupa, *Pediculus humanus hu-
manus*, algumas vezes denominados *Pediculus corporis*. Os piolhos pubia-
nos, *Pthirus pubis*, são uma espécie distinta, e é o único elemento da família
Pthiridae que infesta seres humanos. Como aqui usado, o termo "piolho ou
piolhos humanos" inclui um elemento de *Pediculus humanus* ou *Pthirus pu-
bis*.

Conseqüentemente, em um dos seus aspectos, a invenção pro-
porciona formulações pediculicidas / ovidicidas (antipiolhos), para controlar
uma infestação de piolhos em um ser humano, que compreende como um
ingrediente ativo uma espinosina, ou um derivado fisiologicamente aceitável

ou um sal dele, e um veículo fisiologicamente aceitável. As formulações especialmente úteis desta invenção são as formulações para cuidado do cabelo. As formulações de cuidado do cabelo especialmente úteis são xampus. A invenção também proporciona processos de uso dessas formulações para
5 controlar espécies de piolhos de infestação de seres humanos. Essas formulações e processos controlam os piolhos de uma maneira mais efetiva, mais segura do que as formulações e processos antipiolho conhecidas anteriormente.

As formulações antipiolho desta invenção podem ser formuladas
10 de várias maneiras. As formulações particularmente úteis são xampus, condicionadores e loções do tipo descrito no Pedido de Patente Internacional WO 00/01347.

Quando usada em uma formulação de xampu, formulação de condicionador de cabelo ou em uma loção, o componente espinosina está
15 presente a um nível de cerca de 0,1% a cerca de 30%, de preferência, de cerca de 1% a cerca de 10%.

Com relação à atividade contra piolhos, as concretizações específicas da invenção incluem as seguintes.

A. Uma formulação para controlar uma infestação de piolhos em
20 um ser humano, que compreende como um ingrediente ativo um composto de fórmula 1 ou 2, em que R5 é um grupo tendo uma das fórmulas 4a a 4i, ou um derivado ou sal fisiologicamente aceitável dele, e um veículo fisiologicamente aceitável.

B. Uma formulação da concretização A, que é uma formulação
25 de cuidado de cabelo.

C. Um xampu pediculicida que compreende:

- (a) de cerca de 0,1% a cerca de 30% de um composto de fórmula 1 ou 2, em que R5 é um grupo tendo uma das fórmulas 4a a 4i, ou um derivado ou um sal dele fisiologicamente aceitável;
30 (b) de cerca de 5% a cerca de 30% de um tensoativo sintético;
(c) de cerca de 1% a cerca de 7% de uma amida; e
(d) água.

D. Um xampu da concretização C, em que o tensoativo sintético é aniônico, anfotérico, catiônico, zwitteriônico ou não-iônico, ou uma mistura deles.

5 E. Um xampu da concretização D, em que a amida é monoetanolamida de coco, dietanolamida de coco ou uma mistura delas.

F. Um xampu da concretização D, que compreende, adicionalmente, de cerca de 1% a cerca de 10% de um material de silicone não volátil.

10 G. Um xampu da concretização F, em que o silicone não volátil é um polialquilsiloxano, polialquilarilsiloxano, copolímero de poliétersiloxano, ou uma mistura deles, cuja viscosidade é de 100 centipoises a cerca de 150.000 centipoises a 25°C.

15 H. Um xampu da concretização G compreendendo adicionalmente de cerca de 0,5% a cerca de 5% de um agente de suspensão selecionado do grupo que consiste em materiais anfifílicos cristalinas tendo estruturas em agulhadas ou em plaquetas, materiais poliméricos, argilas, óxidos metálicos defumados e as suas misturas.

20 I. Um xampu da concretização H, em que o agente de suspensão é um material anfifílico cristalino selecionado do grupo que consiste em derivados de acila de cadeia longa de 16 a 22 átomos de carbono, alcanolamida de cadeia longa de 16 a 22 átomos de carbono de ácidos graxos, e as suas misturas.

J. Um xampu da concretização I, em que o agente de suspensão é um diéster de etileno glicol.

25 K. Um xampu da concretização D, em que a proporção de uma espinosina, ou um derivado ou sal dela, é a um nível de cerca de 0,25% a cerca de 1,5%.

30 L. Um processo para controlar uma infestação de piolhos em um ser humano, que compreende administrar topicamente uma formulação da concretização A a um ser humano.

M. O processo da concretização L, em que a infestação de piolhos é *Pediculus humanus capitis*.

N. O processo da concretização L, em que a infestação de piolhos é *Pediculus humanus humanus*.

O. O processo da concretização L, em que a infestação de piolhos é *Pthirus pubis*.

5 P. Um método para tratar cabelo humano, para matar e facilitar a remoção de piolhos e dos seus ovos, que compreende as etapas de:

(a) aplicar de cerca de 10 g a cerca de 30 g de uma formulação, que compreende um composto de fórmula 1 ou 2, em que R5 é um grupo que tem uma das fórmulas 4a a 4i, ou um derivado ou sal fisiologicamente aceitável dele, e um veículo fisiologicamente aceitável para molhar o
10 cabelo;

(b) aplicar a formulação pelo cabelo e couro cabeludo;

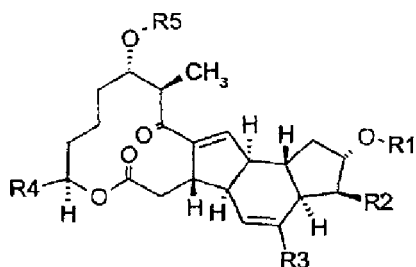
(c) deixar a formulação no cabelo e couro cabeludo por cerca de 6 a 10 minutos;

15 (d) remover a formulação do cabelo por enxaguadura com água.

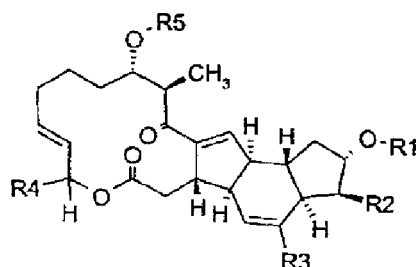
Q. O uso de um composto de fórmula 1 ou 2, em que R5 é um grupo tendo uma das fórmulas 4a a 4i, ou um derivado ou sal dele fisiologicamente aceitável, ou uma formulação contendo qualquer entidade, para a
20 manufatura de um medicamento para controlar piolhos em um ser humano.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição inseticida ou acaricida, caracterizada pelo fato de que compreende um composto de fórmula (1) ou (2):



(1)

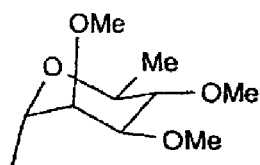


(2)

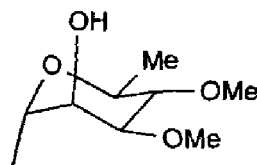
ou um sal dele,

5 nas quais

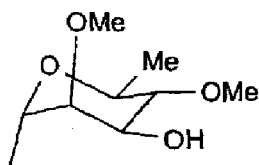
R1 é um grupo de fórmula (2a), (2b) ou (2c):



(2a)



(2b)



(2c)

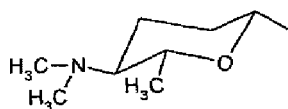
R2 é H ou OH;

R3 é H ou CH₃;

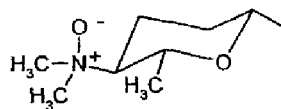
R4, na fórmula 1, é 1-butenila, 1,3-butadienila, n-butila, 3-hidróxi-

10 1-butenila, ou 1-propenila; e R4 é etila, na fórmula 2; e

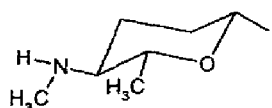
R5 é H ou um grupo apresentando uma das seguintes fórmulas (4a) a (4i):



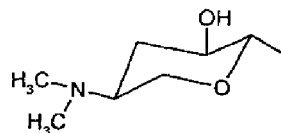
(4a)



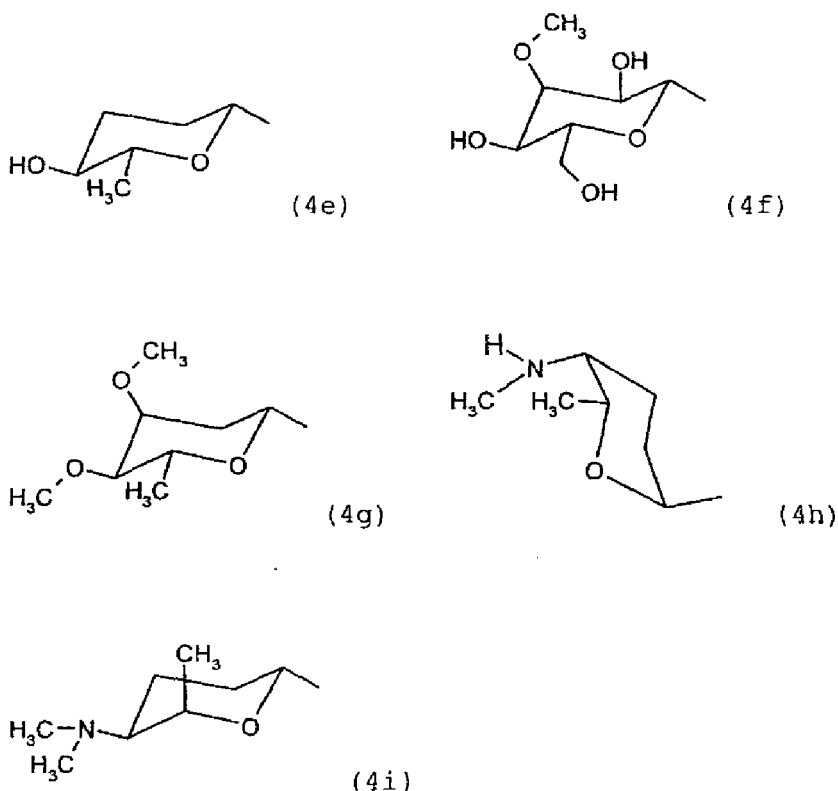
(4b)



(4c)



(4d)



em combinação com um veículo fitológica ou fisiologicamente aceitável, que selecionado dentre argilas de atapulgita, argilas de montmorillonita e terras, diatomáceas ou silicatos purificados, ou é uma mistura de um solvente imiscível em água e emulsificantes.

2. Processo inseticida ou acaricida, caracterizado pelo fato de que compreende aplicar ao local de um inseto, ácaro ou carrapato, um composto, como definido na reivindicação 1, excluído o tratamento em humanos e/ou animais.

3. Processo para proteção de um local da infestação por insetos, ácaros ou carrapatos, caracterizado pelo fato de que compreende aplicar ao local de um inseto, ácaro ou carrapato, um composto, como definido na reivindicação 1, excluído o tratamento em humanos e/ou animais.

4. Formulação para controle de uma infestação de piolhos em um ser humano, caracterizado pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, um composto, como definido na reivindicação 1, ou um derivado ou sal fisiologicamente aceitável dele, e um veículo fisiologicamente aceitável, , que selecionado dentre argilas de atapulgita, argilas de montmo-

rillonita e terras, diatomáceas ou silicatos purificados, ou é uma mistura de um solvente imiscível em água e emulsificantes.

5. Uso de um composto, como definido na reivindicação 1, ou um derivado ou sal fisiologicamente aceitável dele, ou de uma formulação, como definida na reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é para manufatura de um medicamento para controlar piolhos em um ser humano.

6. Processo para preparar um composto, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a cultura de espécie *Saccharopolyspora* NRRL 30141, ou uma cepa derivada dela que produza um composto, como definido na reivindicação 1, em um meio de cultura adequado sob condições de fermentação aeróbica submersa, até que uma quantidade recuperável de um composto, como definido na reivindicação 1, seja produzida, e recuperar um composto, como definido na reivindicação 1, do meio de cultura.