



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 89440 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

A01N037/44 A

A01N043/40 B

A01N043/90 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.01.13

(30) *Prioridade:* 1988.01.13 US 144883

(43) *Data de publicação do pedido:*
1990.02.08

(45) *Data e BPI da concessão:*
03/93 1993.03.19

(73) *Titular(es):*

BOARD OF TRUSTEES UNIVERSITY OF ILLINOIS,
THE
506 SOUTH WRIGHT STR., URBANA URBANA EST.
DE ILLINOIS 61801 US

(72) *Inventor(es):*

(74) *Mandatário(s):*

MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA
RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100
LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE INSECTICIDAS PORFÍRICOS

(57) *Resumo:*

Fig

Patente N^o 89440

MAY 1969

- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE INSECTICIDAS PORFÍRICOS"

Descreve-se um processo para a preparação de composições insecticidas, caracterizado por se incorporar uma quantidade eficaz como insecticida de um ou mais compostos escolhidos do grupo que consiste em ácido delta-aminolevulínico, indutores do ácido delta-aminolevulínico e intensificadores da conversão de ácido delta-aminolevulínico em tetrapirroles fotodinâmicos, sendo a quantidade dos referidos compostos suficiente para fornecer de 113,4 a 907,2 g (0,25 a 2 libras) de ácido delta-aminolevulínico por 4.046,84 m² (1 acre) e/ou de 45,6 a 680,85 g (0,1 a 1,5 libras) de indutor ou intensificador por 4.046,84 m² (1 acre).



1

Descrição do objecto do invento

que

5

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS, Instituição Académica norte-americana (Estado de Illinois), com sede em 506 South Wright Street, Urbana, Estado de Illinois 61801, Estados Unidos da América, pretende obter em Portugal, para : "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE INSECTICIDAS PORFÍRICOS"

10

15

O invento aqui descrito foi concebido no de curso de trabalhos suportados pelos subsídios provenientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, A Fundação Nacional de Ciência, a Universidade de Illinois, a Estação de Experiência Agrícola de Illinois, e da "John P. Trebellas Photobiotechnology Research Endowment".

20

25

O presente invento refere-se a composições e processos insecticidas, e mais particularmente a composições insecticidas e processos para elevar os níveis de tetrapirrole endógenos em insectos.

30

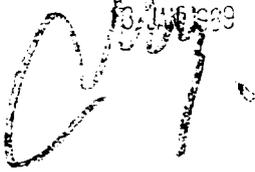
35

O pedido de patente co-pendente norte-americano Nº de Série 895.529 descreve composições herbicidas que compreendem um ou mais compostos escolhidos do grupo que consiste em ácido delta-aminolevulínico, indutores de ácido delta-aminolevulínico em plantas, intensificadores da conversão de ácido delta-aminolevulínico até tetrapirroles fotodinâmicos em plantas, e inibidores de conversão de te-

1 pirroles de divinilo em tetrapirroles de monovinilo em plan-
 5 tas; processos para induzir a acumulação de tetrapirroles
 fotodinâmicos em plantas vivas utilizando as referidas com-
 posições, e processos para exterminar plantas utilizando as
 referidas composições. Todavia, as referidas composições
 não eram anteriormente conhecidas nem tinham sido descritas
 como insecticidas.

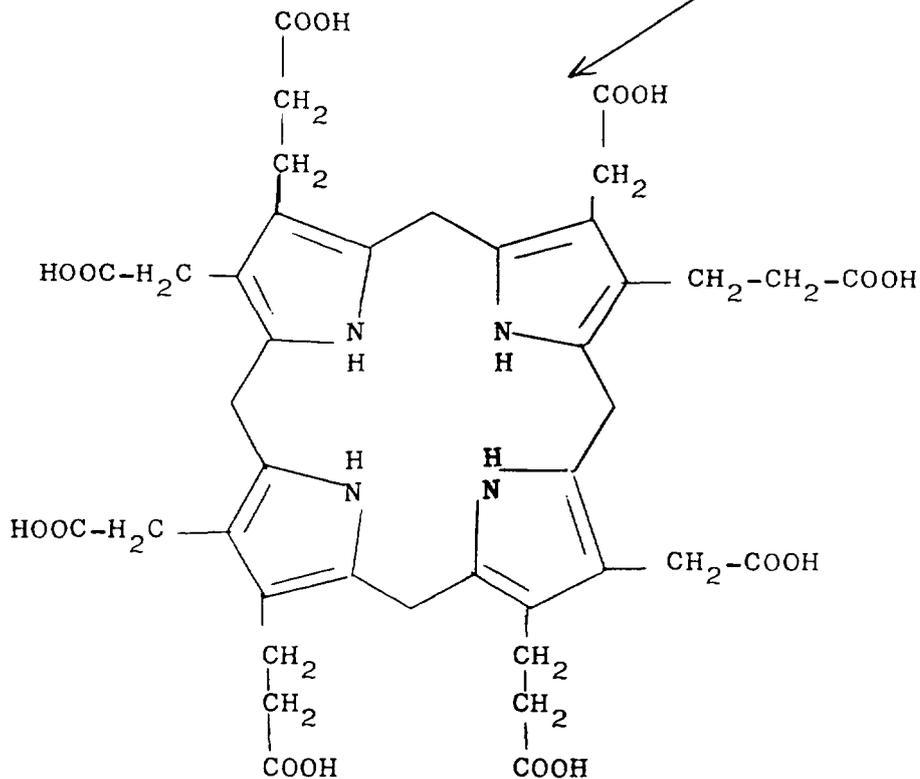
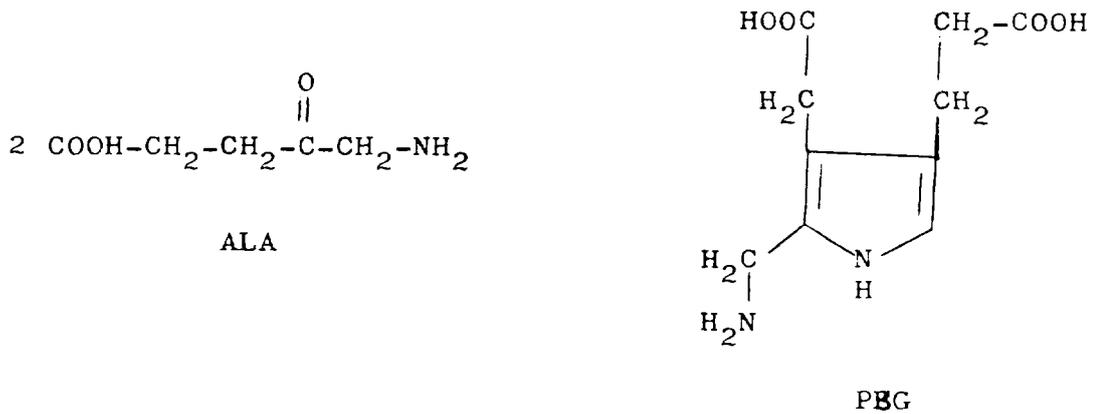
10 Os termos seguintes, como utilizados ante-
 riormente e em seguida, têm o seguinte significado, a menos
 que seja expressamente indicado o contrário: ALA = ácido
 delta-aminolevulínico; Chl = clorofila; Chlide=Clorofilida;
 Coprogen = coproporfirinogeno; DP = dipiridilo; DV = divi-
 nilo; Mg-Proto = Mg-protoporfirina IX; MV = monovinilo;
 15 PA = fenantrolina; PBG = porfobilinogeno; PChl = protoclor-
 fila; PChlide = protoclorodilida; Pheo = feofitina;
 Pheobide = feoforbida; Proto = protoporfirina IX; Proto-
 gen = protoporfirinogeno; Uro = éster octamético de uro-
 porfirina; e Urogen = uroporfirinogeno. Os termos Proto,
 Mg-Proto, PChlide, Chlide, Chl, Pheo, e Pheobide refe-
 20 rem-se a associações compostas por componentes MV e/ou DV a
 menos que precedidos por uma designação MV ou DV.

25 O ácido delta-aminolevulínico, um aminoáci-
 do com cinco átomos de carbono, é encontrado na maior parte
 das células de animais e plantas vivos e é o precursor pri-
 mário de tetrapirrole. O mesmo está disponível a partir de
 uma variedade de fontes da especialidade, por exemplo a
 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Em plantas, ALA é um
 precursor de clorofila através de uma passagem hexagonal
 30 envolvendo protoporfirinogeno, protoporfirina, Mg-protopor-
 firina, metaloporfirinas de mais comprimento de onda, pro-
 toclorofila, e clorofilida [ver Fig. 1 do Pedido de paten-
 te co-pendente norte-americano N° de Série 895.5297]. Em in-
 35 sectos, ALA é transformado em protohema (protoporfirina
 ferrosa IX) através de uma passagem que envolve porfobili-

03/10/1979


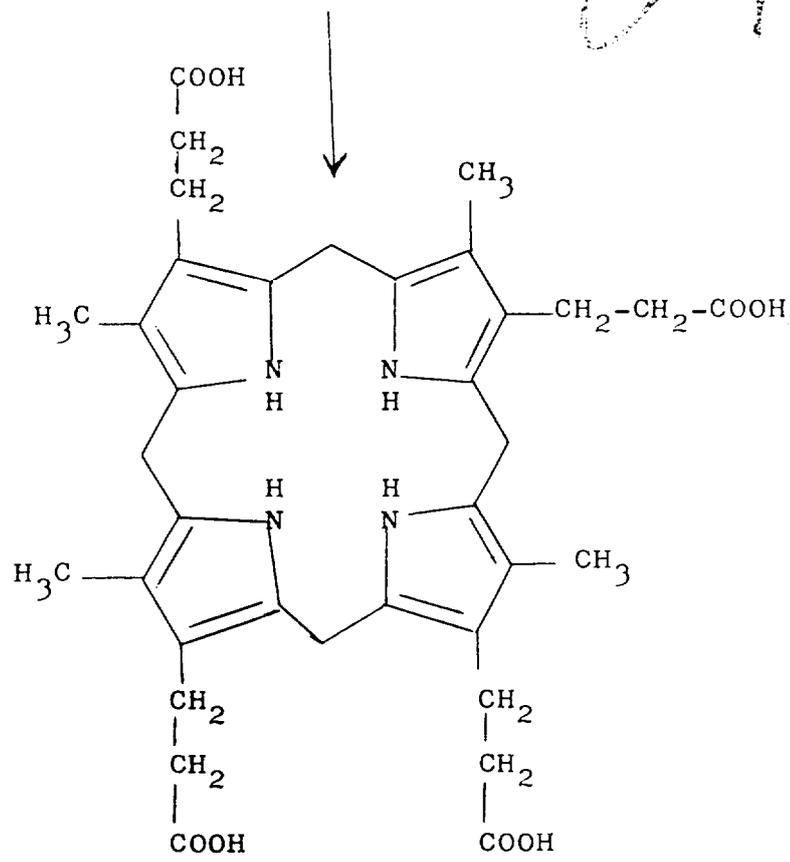
1 nogeno, uroporfirinogeno, ciproporfirinogeno, protoporfiri
 5 nogeno, protoporfirina IX, e protoporfirina ferrosa IX (is-
 to é protoheme):

GRÁFICO DE FLUXO A:

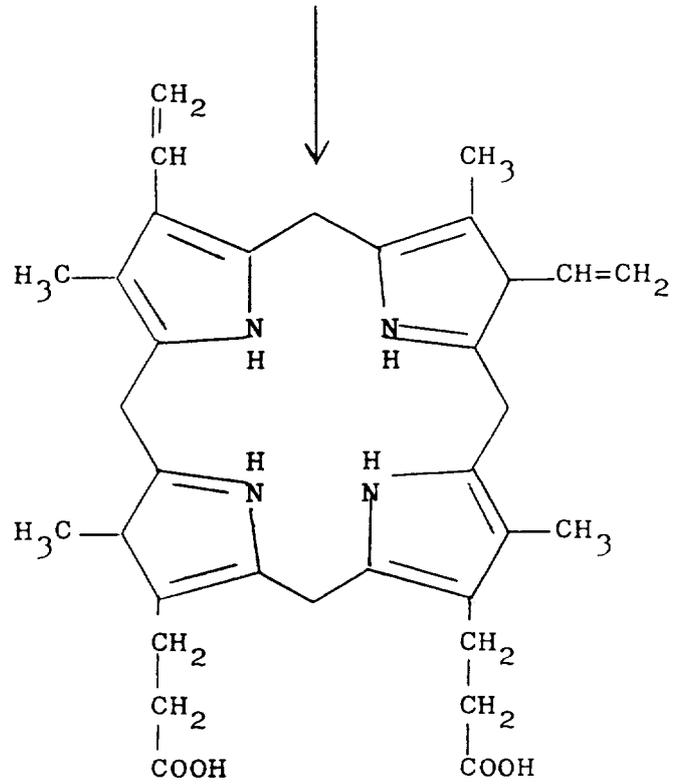


13 JAN 1968
DM

1
5
10
15
20
25
30
35



COPROGEN III

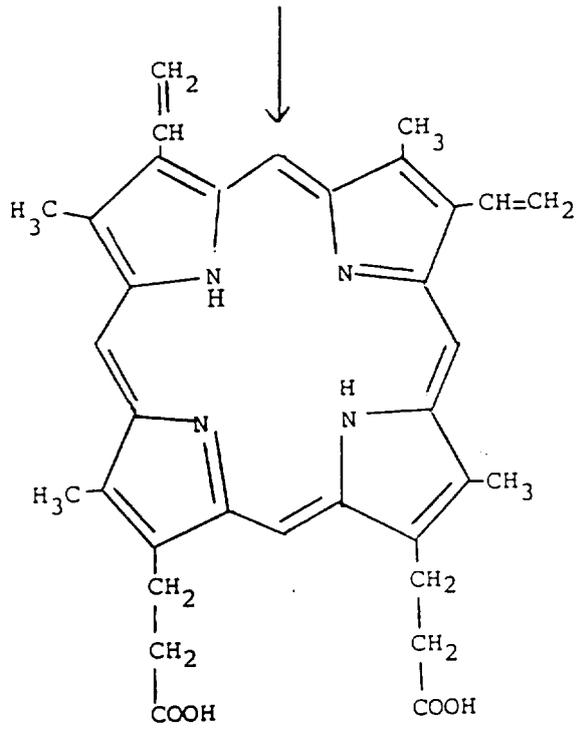


DV PROTOGEN IX

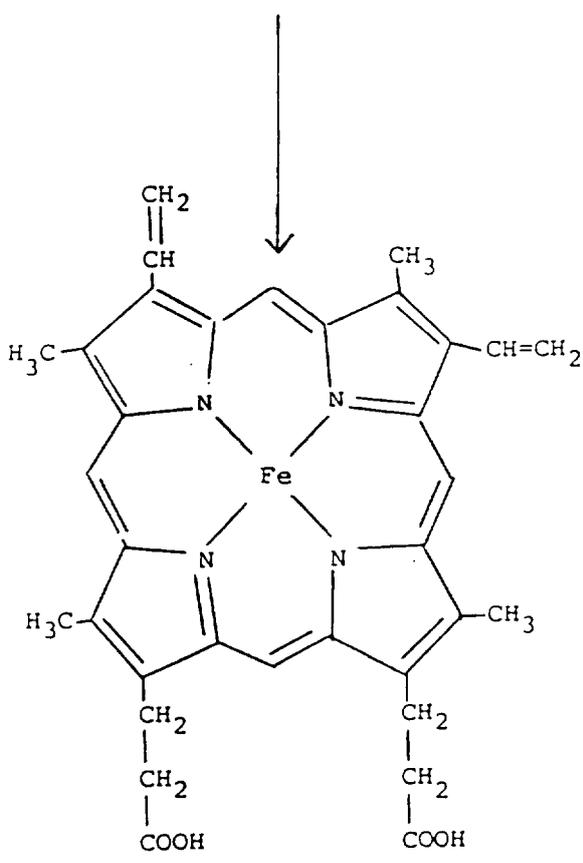
Mod. 71 - 10 000 ex - 4-87

Handwritten signature
13 JUN 1969

1
5
10
15
20
25
30
35



DV PROTO IX



Fe-Proto (Protoheme)

Mod. 71 - 10 000 ex - 4-87

15 JAN 1969

1 / Ver também Granick, S. e D. Mauzerall, em Metabolic Path-
ways, Vol. 2 (D.M. Greenberg, ed.) (Academic Press, NY,
 1961), págs. 525-6167. Protoheme e hemes a e c são gru-
 5 pos próstéticos de todos os citocromas em células de plan-
 tas e animais.

Verificou-se agora que os insectos podem
 ser exterminados pela administração de uma composição que
 compreende um ou mais compostos escolhidos do grupo que con-
 siste em ALA, indutores de ALA em insectos, e intensifica-
 10 dores da conversão de ALA em tetrapirroles em insectos.

Em particular, verificou-se agora que os in-
 sectos vivos podem ser induzidos por exposição a ALA exóge-
 no para acumular artificialmente elevadas quantidades de
 intermediários tetrapirrole em excesso dos níveis normalmen-
 te controlados em tais insectos, e que tais elevados níveis
 15 artificialmente induzidos são tóxicos para o insecto. Isto
 é surpreendente, visto que os insectos sintetizam normalmen-
 te citocromas apenas a uma porção suficiente para manter
 com desenvolvimento e restabelecimento, e não se acredita-
 va anteriormente que esta proporção seria suficiente para
 20 permitir a acumulação de quantidades letais de tais inter-
 mediários tetrapirrol.

Embora o mecanismo exacto de toxicidade não
 25 seja conhecido, parece que os tetrapirroles acumulados po-
 dem actuar de uma ou duas maneiras. À luz, crê-se que os
 tetrapirroles acumulados fotosensitivam a formação de oxi-
 génio singleto, que é um oxidante muito forte. O oxigénio
 singleto oxida rapidamente os componentes de lipoproteína
 30 das membras celulares de insecto, ajustando assim em movi-
 mento uma reacção em cadeia de radical livre altamente des-
 trutivo, que pode ser sumarizado como segue (hv = fotão
 de luz; ^1Tet = tetrapirrole no estado triturado singleto;
 $^3\text{Tet}^*$ = tetrapirrol no estado excitado tripleto $^3\text{O}_2$ = oxi-
 35 génio no estado triturado tripleto; $^1\text{O}_2^*$ = oxigénio no

13 JUN 1989

1 estado excitado singelto; UMLP = lipoproteínas de membrana insaturada):

- | | | |
|----|--|---------------------------------|
| 5 | 1) $^1\text{Tet} + h\nu$ | $^3\text{Tet}^*$ |
| | 2) $^3\text{Tet}^* + ^3\text{O}_2$ | $^1\text{Tet} + ^1\text{O}_2^*$ |
| | 3) $^1\text{O}_2^* + (\text{UMLP})$ | hidroperóxidos |
| | 4) hidroperóxidos | radicais livres |
| 10 | 5) radicais livres + UMPL | mais hidroperóxidos |
| | 6) repetição das fases (4) e (5) até a maior parte de UMPL estar oxidada | |

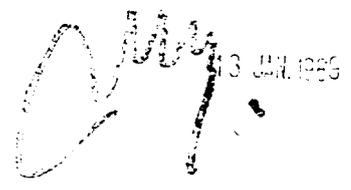
15 A fotossensibilização por meio de tetrapirroles injectados foi descrita em tecidos de animais e seres humanos [ver, por exemplo, Ellefson, R.D., Mayo Clinic Proc. 57:454-458 (1982); Christensen, T., T. Sandquist, K. Feren, H. Waksvik e J. Moan, Br. J. Cancer 48:35-43 (1983); Hopf, F.R., e D.G. Whitten, em The Porphyrins, Vol. 1, Dolphin, D., ed. (Academic Press, Nova Iorque, 1978), págs. 161-195; Sande-
20 berg, S., I. Romslo, G. Hovding, e R. Bjorndal, Acta Dermatovener (Estocolmo) Suppl. 100:75-80 (1982); Latham, P.S., e J.R. Bloomer, Photochem. Photobiol. 37:553-557 (1983); Bickers, D.R., R. Dixit, e H. Mukhtar, Biochim. Biophys. Res. Comm. 108:1032-1039 (1982)] mas este fenómeno de acumu-
25 lação de tetrapirrole ALFA-dependente não tinha sido previamente demonstrado em insectos, mas tinha sido previamente adaptado para exterminar espécies de insectos indesejáveis.

30 No escuro, parece que os tetrapirroles acumulados actuam através de um mecanismo diferente e resultam em níveis aumentados de Zn-protoporfirina. O Zn-Proto não é um intermediário metabólico natural do caminho porfirina-heme. A sua ocorrência em células vivas e tecidos denota
35 usualmente um metabolismo porfirina-heme envenenado [ver



1 por exemplo, Lamolla, A.A., e T. Yamane, Science 186:936-938
(1974)7. A maior parte dos ferroquelatases (os enzimas que
introduzem ferro ferroso em Proto para formar heme) pode in-
5 troduzir Zn em vez de ferro no Proto para dar Zn-Proto, par-
ticularmente sob condições de reacção desfavoráveis [Marks,
G.S., em Heme abd Chlorophyll (Van Nostrand, 1969), págs.
146-147]7. Embora o mecanismo exacto não seja conhecido e a
requerente não deseje ficar ligada a qualquer teoria parti-
cular, crê-se presentemente que a acumulação de Zn-Proto como
10 um resultado dos métodos insecticidas do presente invento
pode ser provocada por dano do sistema ferroquelatase fazendo
com que o enzima introduza zinco em vez de ferro ferroso em
alguns dos Proto. Eventualmente isto significa que zinco em
vez de ferro ferroso é encontrado em alguns grupos prostéti-
15 cos do enzima respiratório crucial citocroma c oxidase. Como
consequência aquelas moléculas de citocroma c oxidase contendo
Zn-Proto em vez de heme não podem manter-se fixas aos ra-
dicais livres tóxicos tais como superóxidos de oxigénio e ra-
dicais livres de hidróxido que são normalmente formados duran-
20 te o ciclo de ácido cítrico de Krebs [Halliwell, B., What's
New in Pant Physiology 15:21-24 (1984)7. Nestas circunstân-
cias os radicais livres destrutivos podem ser libertados no
ambiente da membrana biológica e contribuir para a perda do
radical-dependente livre o que tem como resultado a morte do
25 insecto.

Verificou-se ainda que além da exposição
al ALA exógeno, a exposição de insectos vivos a indutores de
ALA resultará também na acumulação de quantidades maciças de
tetrapirroles nos tecidos dos insectos. Por "indutor de AMA"
30 quer-se significar um compost que, quando aplicado a insectos,
estimula o insecto a produzir uma quantidade superior
à normal de ALA endógeno, o qual tem então o mesmo efeito
que o ALA exógeno descrito acima. Assim, as composições in-
secticidas do presente invento compreendem um ou mais indu-
35 tores de ALA além de, ou no lugar do próprio ALA. Exemplos



13 JUN 1986

1 não limitativos de indutores são 2,2'-dipiridilo; 1,10-fen-
 5 nantrolina; 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina; 4-metil-1,10-
 -fenantrolina; 5-nitro-1,10-fenantrolina; 5-metil-1,10-
 -fenantrolina; 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina; 4,7-dife-
 10 nil-fenantrolina; 5-cloro-1,10-fenantrolina; 3,4,7,8-
 -tetrametil-1,10-fenantrolina; 2,2'-ditiobis(piridina N-ó-
 xido); 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridilo; fenil-2-piridil ce-
 toxima, e 2,2':6',2"-terpiridina.

10 Verificou-se ainda que determinados compos-
 tos funcionam como intensificadores de conversão de conver-
 são ALA até tetrapirroles em insectos. Por "intensificador
 de ALA" ou "intensificador" quer-se significar um composto
 15 que quando aplicado a insectos aumenta a capacidade de os
 insectos tratados transformarem os exógenos ou endógenos ALA
 em tetrapirroles insecticidas. Assim as composições insecti-
 cidas da presente invenção podem também compreender um ou
 mais intensificadores de ALA além de, ou em vez de ALA exó-
 geno ou indutores de ALA. Exemplos não limitativos de in-
 20 tensificadores adequados são 2,2'-dipiridilo; 1,10-fe-
 nantrolina; 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina; 4-metil-1,10-
 -fenantrolina; 5-nitro-1,10-fenantrolina; 5-metil-1,10-
 -fenantrolina; 5,6-dimetil-1,10--fenantrolina; 4,7-dife-
 nil-1,10-fenantrolina; 5-cloro-1,10-fenantrolina; 3,4,7,8-
 25 -tetrametil-1,10-fenantrolina; 2,2'ditiobis-(piridina N-óxi-
 do); 4,4'-dimetil-2,2'-piridilo; fenil-2-piridil cetoxi-
 ma, e 2,2':6',2"-terpiridina. Certos compostos que funcio-
 nam como indutores numa composição podem funcionar como in-
 tensificadores noutra composição ou com diferentes concentra-
 30 ções. Alternativamente, certos compostos (por exemplo 2,2'-
 -piridilo; 1,10-fenantrolina; 4,7-dimetil-1,10-fenantroli-
 na; 4-metil-1,10-fenantrolina; 5-nitro-1,10-fenantrolina;
 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina; 4,7-difenil-1,10-fenantroli-
 na; 5-cloro-1,10-fenantrolina; 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fe-
 nantrolina; 2,2'-ditiobis(piridina N-óxido); 4,4'-dimetil-
 35 -2,2'-dipiridilo; fenil-2-piridil-cetoxima, e 2,2':6',2"-

1 -terpiridina) podem funcionar como indutores e intensifi-
cadores.

5 Os compostos insecticidas do presente in-
vento podem também compreender combinações de dois ou mais
compostos escolhidos do grupo que consiste em ALA, indutores,
e intensificadores, por exemplo ALA + um ou mais indutores
ALA + um ou mais intensificadores ALA + um ou mais indutores
+ um ou mais intensificadores, um ou mais indutores + um
10 ou mais intensificadores; etc.

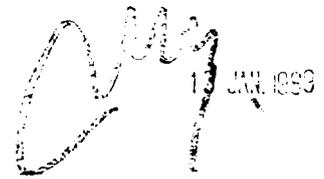
10 A composição pode também conter um ou mais
dos seguintes:

veículo(s) adequado(s) [por exemplo silicato de alumínio
magnésio coloidal, pedra-pomes, talco, ou combinações dos
15 mesmos]; dissolvente(s) [por exemplo água, 0,45 de aceto-
na: 0,45 de etanol:0,1 de Tween 80:9 de água (v/v/v/v),
0,45 de acetona; 0,45 de metanol:0,1 de Tween 80,9 de água
(v/v/v/v), 0,1-1% de Tween 80 em água (v/v), 0,9 de polie-
tileno glicol (PEG): 0,1 de Tween 80:9 de água (v/v/v),
20 0,1-0,7 PEG:0,2-0,8 metanol:0,1 de Tween 80:9 de água (v/v/
/v), 0,45 de acetona:0,45 de etanol:0,2 de Tween 80:9 de
etileno glicol:18 de água (v/v/v/v), ou um ou mais dos se-
guintes: benzeno, tolueno, xileno, queroseno, 2-metoxi-
etanol, propileno glicol, dietileno glicol, éter dietíli-
25 co de dietileno glicol, formamida, metilformamida, ciclo-
hexanona, isoferona; tampões [por exemplo ácido cítrico];
agente(s) molhante(s) [por exemplo N-metilN-oleciltaurato
de sódio, um alquilfenoxi polioxietileno etanol, sulfona-
to alfa-olefina de sódio, sulfonato isopropilnaftaleno de
30 sódio, óleo vegetal polioxietilado]; agente(s) de disper-
são [por exemplo sulfonato de lignina de sódio, o sal de
sódio de um condensado de ácido-formaldeído naftaleno sul-
fónico, hidroxietil celulose]; agente(s) de eliminação de
espuma [por exemplo silicone]; emético(s) [por exemplo
35 tripolifosfato de sódio, pirofosfato de tetrapotássio, are-

1 cotina, apomorfina, sulfato de cobre₇; agente(s) contra
cheiros [por exemplo piridina₇; nenetrante(s); agente(s)
tensioactivo(s); emulsionante(s); adjuvante(s); herbici-
5 da(s); e um ou mais outros insecticidas conhecidos.

5 A composição pode ser formulada de uma ma-
neira convencional utilizada para preparações insecticidas,
por exemplo como um ingrediente no alimento para aplicação
sistémica interna, ou como uma solução, suspensão, emulsão,
10 concentrado fluível, concentrado emulsionável, gel, pasta,
espuma, creme, aerosol, pó molhável, pó, grânulos dispersí-
veis e análogos para aplicação tópica externa, de acordo
com os processos conhecidos dos entendidos na técnica. A for-
mulação é concebida para libertar uma quantidade adequada
15 de um ou mais ingredientes activos para o insecto ou insec-
tos em alvo. Para aplicação tópica, a composição é de pre-
ferência uma solução, suspensão, emulsão, aerosol, concentra-
do fluível ou emulsionável, ou pó molhável. Evidentemente,
a formulação tópica deve ser tal que o(s) ingrediente(s)
20 activo(s) penetre(em) no tecido do insecto e se desloque pa-
ra os locais da síntese de tetrapirrole.

Quando o ingrediente activo é combinado
com um ou mais compostos ou composições activas ou inertes
acima mencionada, a combinação pode ser feita à temperatura
25 ambiente, ou a temperaturas acima ou abaixo da temperatura
ambiente desde que a estabilidade da composição não seja
afectada. Quando a composição compreende ALA, a tempera-
tura é de preferência mantida entre cerca de 4°C e cerca de
75°C. Quando a composição insecticida da presente invenção
30 está em solução aquosa, o pH pode estar no ponto isoeléctri-
co do ingrediente(s) activo(s), ou acima ou abaixo do pon-
to isoeléctrico, desde que a estabilidade e solubilidade do
ingrediente activo não seja tão adversamente afectada que
interfira com a eficácia. Todavia, quando a composição inse-
35 ticida contém ALA, o pH é de preferência ajustado de modo a

A handwritten signature in dark ink is located in the top right corner. To its right is a date stamp that reads "13 JUN 1959".

1 ficar entre cerca de pH e e pH 8.

5 Quando dois ou mais componentes são combinados para formar as composições insecticidas, os mesmos são de preferência combinados sob condições que asseguram uma concentração uniforme através da mistura. Isto é convenientemente feito por técnicas tais como movimentação, agitação, misturação, combinação, etc.

10 Naqueles casos em que o ingrediente activo é para ser o único componente da composição insecticida do presente invento, o ingrediente activo deve ser cuidadosamente preparado para se conseguir a aplicação uniforme. No caso de um ingrediente activo sólido, isto é convenientemente efectuado subdividindo o mesmo até um pó fino. Quando um tal componente único está na forma de um líquido, o mesmo pode convenientemente ser atomizado até nevoeiro ou névoa a temperaturas adequadas por meio de técnicas bem conhecidas para os entendidos nesta matéria. Quando as composições de regime ou tópicas são feitas em solução, as mesmas convenientemente compreendem concentrações de cerca de 2 a cerca de 50 nM ALA e de cerca de 0,1 a cerca de 50 nM indutor ou intensificador.

20 De acordo com os métodos do presente invento, os insectos a ser extirminados são contactados com uma composição insecticida que compreende ALA e/ou indutores de ALA e/ou intensificadores de conversão de ALA em intrapirroles. As composições insecticidas do presente invento podem ser aplicadas topicamente, por exemplo como pó, embebimento, imersão pulverização, nevoeiro ou névoa, numa quantidade suficiente para se conseguirem os níveis laterais internos de tetrapirroles. A quantidade de composição insecticida a ser aplicada topicamente variará conforme o(s) ingrediente(s) activo(s), mas em geral será uma quantidade suficiente para fornecer de cerca de 0,25-2 lb por acre e/ou de cerca de 0,1-1,5 lb de indutor ou intensificador por acre. Meios para a determinação da aplicação de proporções óptimas estão dentro da compe

1 tência dos entendidos nesta técnica.

5 Alternativamente, as composições insecticidas do presente invento podem ser administradas através de dieta, incorporadas em engodo ou outro alimento ou bebida a ser ingerido pelos insectos a serem exterminados. Novamente, a quantidade da composição insecticida a ser administrada variará conforme o(s) ingrediente(s) activo(s) escolhidos, mas em geral estará numa quantidade suficiente para fornecer de cerca de 10 ng a cerca de 5 ug de ALA por mg de peso de corpo, e/ou de cerca de 1 ng a cerca de 5 µg de um indutor ou intensificador por mg de peso de corpo.

15 Se for desejado que o insecto seja morto através do mecanismo de escuro, o insecto pode ser tratado e depois protegido da exposição à luz para permitir a acumulação máxima de tetrapirrole. O insecto pode ser protegido de qualquer maneira conveniente, como por cobertura do chão ou área em que o insecto é para ser encontrada, mediante tecido, papel escuro ou chpa. Nas condições do campo, o método ideal para proporcionar um período de incubação no escuro consiste em aplicar a composição insecticida ao crepúsculo ou durante a noite, num momento escolhido para permitir que os insectos permaneçam no escuro durante pelo menos uma hora. Deve compreender-se que, a fim de facilitar a acumulação de tetrapirrole, a escuridão não necessita ter total ausência de luz, mas antes substancial ausência de luz a comprimentos de onda de 380 a 700 nm. De preferência, os insectos são mantidos no escuro durante cerca de 1 a cerca de 20 horas. De uma a 8 horas é um período de tempo particularmente preferido. Evidentemente, muitos insectos preferem naturalmente os ambientes escuros e não são necessárias fases extra para proteger os mesmos da luz depois do contacto com a composição insecticida.

35 Se os insectos forem para ser extremados através do mecanismo de luz, a composição insecticida é apli-

1 cada ou administrada e os insectos são ao mesmo tempo ou
subsequentemente expostos a velas de cerca de ft. ou mais
de luz a comprimentos de onda de cerca de 380 a cerca de
5 700 nm. A luz pode ser fornecida por qualquer fonte conve-
niente, por exemplo uma lâmpada incandescente, lâmpada de ha-
logeneto metálico, lâmpada solar, ou um bolbo fluorescente
branco ou clarabóia. No campo, evidentemente, a fonte de luz
preferida é a luz do sol. Os insectos são expostos à luz du-
rante um período de tempo suficiente para oxidar a maior par-
10 te das lipoproteínas de membrana insaturadas; prefere-se um
período de cerca de 2 minutos a cerca de 3 dias.

Os insectos a serem tratados pelo presente in-
vento podem adequadamente estar na fase oval, larval ou adul-
15 ta. Em larvas, a fase do instar pode afectar a susceptibili-
dade do tratamento; as larvas em instares posteriores são
relativamente mais susceptíveis ao tratamento que as larvas
nos instares iniciais ou médios. De acordo com isto, pode
ser necessário variar os níveis de dosagem de acordo com a
fase de desenvolvimento da maioria da população larval pro-
20 tegida.

A actividade insecticida é indicada por al-
tera,ção da cor da pele, seguida por dissecação e morte.

Uma outra interpretação do presente invento
25 pode ser tomada a partir dos seguintes exemplos não limita-
tivos, Como utilizada acima e em seguida, a não ser que de
outro modo seja expressamente indicado, em contrário, todas
as temperaturas e parâmetros de temperatura são referidos
ao sistema centígrado e os termos ambiente e temperatura am-
30 biente referem-se a cerca de 20-25°C. O termo percentagem
ou (%) refere-se à percentagem em peso e os termos mole e
moles referem-se a moles por grama. "Nível de significância"
refere-se à probabilidade de para uma população para a qual
o coeficiente de correlação (r) é igual a zero, pode ser to-
35 mada uma amostra de tamanho n , para o qual o coeficiente

1 de correlação iguala ou excede o valor calculado de r re-
portado para a amostra dada. A abreviatura "n.s." quer di-
zer "não significativo".

5 EXEMPLO I

Pigmentos das Dietas em que Larvas *T. ni* foram criadas

10 Ovos de *Trichoplusia ni* (Hubner) (larva da
couve, a peste mais extensiva em culturas vegetais nos Esta-
dos Unidos) foram obtidos por cedência da Sra. Paula Peters
do USDA Insect Biological Control Laboratory, Departamento
de Entomologia na Universidade de Missouri na Columbia. As
15 larvas, ninfas e mariposas adultas, foram criadas em incuba-
doras Percival Modelo I-60 (Percival Mfg. Co., Boone, Iowa
50036) a 25°C e 75 % de humidade com um regime diário de 14
horas de luz e 10 horas de escuridão. As larvas foram manti-
das em dietas artificiais seguindo os métodos descritos por
Waldbauer, G.P., R.W. Cohen e S. Friedman, Great Lakes Ento-
20 mol. (1984) 17:114. Vinte-trinta larvas foram criadas em re-
cipientes de papel de 8-oz com tampas de plástico transpa-
rente vendidos pela Lily-Tulipe, Inc. (Augusta, GA). Para
evitar alterações genéticas na colónia, foram adicionadas
colecções selvagens às culturas em cada varão. Para minimi-
25 zar as doenças microbianas, os ovos e ninfas de cada geração
foram esterilizados superficialmente.

Visto que as larvas *T. ni* criadas numa dieta
contendo farinha de alfalfa verde-amarelada adquirem uma cor
verde-amarelada, enquanto que as larvas *R. ni* criadas sem
30 farinha de alfalfa estavam visualmente isentas de pigmen-
tação, o teor de pigmento endógeno da dieta foi investigado
como uma fase preliminar para estudar a indução de tetrapir-
roles por tratamento químico.

35 A cor verde-amarelada da dieta contendo fari-
nha de alfalfa foi típica da cor verde-amarelada de Pheos

13 JAN 1988

1 (Chls que perderam o seu átomo Mg) e de Pheobides que perde-
ram o seu átomo Mg) e de Pheobides (Chlides que perderam o
seu átomo Mg). Isto foi confirmado por análise espectroflu-
rométrica a 77°C. Quantidades Gram da dieta foram homoge-
5 neizadas em 6 ml de acetona:0,1 N NH₄OH (9:1 v/v) e o extrac-
to de acetona aquosa resultante contendo vários pigmentos
foi limpo de lipoproteínas e fragmentos da célula por centri-
fugação a 39000 g durante 10 minutos a 0°C. Pigmentos opala-
res tais como Chls e Pheos foram removidos da solução de ace-
10 tona aquosa por extracção com hexano. Os pigmentos mais po-
lares di- e monocarboxílicos tais como Proto, Mg-Proto,
PChlides e Pheos permanecem na fracção de acetona aquosa ex-
traída com hexano. Uma pequena parte alíquota do extracto de
hexano contendo os pigmentos clorofilosos foi secada sob gás
15 de azoto e o resíduo foi dissolvido de novo em acetona a 80%
para a determinação espectrofluorométrica das quantidades de
Chls e Pheos de acordo com o método de Bazzaz, M.B. e C.A.
Rebeiz, Photochem. Photobiol. (1979) 30:709.

20 Os espectros de fluorescência foram regista-
dos num medidor de espectro de fluorescência contador de fo-
tões completamente corrigido, Modelo SLM 8000DS como descri-
to em Rebeiz, C.A. Montazer-Zouhoor, H.J. Hpen e S.M. Wu,
Enzyme Microb. Technol. (1984) 6:390. A excitação foi a 400,
420 e 440 nm. Os espectros de absorção foram registados a
25 uma largura de fenda de 2 nm num espectrofotómetro de compri-
mento de onda duplo DW-2, modelo Aminco (Travenol Laborató-
ries Inc., Silver Springs, MD 20910). Os controles foram
MV Pheo a e b preparados a partir de MV Chl a e b, res-
pectivamente, como descritos em Bazzaz, M.B. e C.A. Rebeiz,
30 Photochem. Photobiol. (1979) 30:709. Os resultados estão a-
presentados na Tabela I:

35

13 MAR 1968

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA I
Propriedades Espectrofluorométricas em Éter a 77°K dos Pigmentos
Predominantes da Dieta Contendo Farinha de Alfalfa e de T.
ni Criado sobre essa Dieta

Experi- ência	#	Material	Fluorescência a 77°K		Identificação de Pigmento
			Emissão vermelha	Excitação Soret	
A	1	Autêntico MV Pheo <u>b</u>	656	400 450	
B	1	Autêntico MV Pheo <u>a</u>	666	414	
C	1	Extractoapolar de dieta	655	440 450	MV Pheo <u>b</u>
	2		666-667	414	MV Pheo <u>a</u>
E	3	Extracto apolar de dieta	654-655	440 450	MV Pheobide <u>b</u>
	4		666-667	414-415	MV Pheobide <u>a</u>
E	1	Extracto polar de <u>T. ni</u>	655	440 450	MV Pheobide <u>b</u>
			666-667	414	MV Pheobide <u>a</u>

1983 JUL 1989

1 Excitações sensíveis do copo do éter do extracto polar entre
400 e 450 nm extraíram duas bandas de emissão Chl-análogas
com os máximos a 655 e 666-667 nm respectivamente (Tabela :
C 1, 2). O espectro de excitação Soret da banda de emissão de
5 655 nm apresentou a fenda de excitação máxima Soret a 440 nm
(máximo tamanho) e a 450 nm (o mais pequeno) Tabela I: C 1).
Estes máximos de emissão e excitação foram idênticos aos do
autêntico MV Pheo b (E440 E450F656) (Tabela I: A). Nes-
te contexto "E440 450" refere-se à fenda máxima de excita-
10 ção Soret de MV Pheo b a 77°K em éter, enquanto "F656" se re-
fere ao máximo de emissão de fluorescência de MV Pheo b a
656 nm. A banda fluorescente (E440 E450F656) foi identifi-
cada como MV Pheo b. Pequenas quantidades de MV Chl b esta-
vam também presentes.

15 O espectro de excitação Soret da banda de
emissão de 666 nm, apresentou um máximo de excitação simples
a 414 nm, e era idêntico ao autêntico MV Pheo a (Tabela I:
B, C 2). Este composto fluorescente (E414F666) foi portanto
20 identificado como MV Pheo a.

25 As propriedades espectrofluorométricas da
fracção polar foram muito semelhantes às da fracção apolar
(Tabela I:C 1-4). Todavia, os compostos (E440 E450F655) e
(E414F666-667) eram demasiado polares para a divisão com he-
xano e permaneceu no resíduo aquoso da acetona. Os mesmos
foram identificados com MV Pheobide b e MV Pheobide a, res-
pectivamente. Os Pheobides têm as mesmas propriedades espe-
ctroscópicas electrónicas que os Pheos mas são mais polares
porque eles perderam o álcool de cadeia comprida na posição
30 7 do macrociclo. Foi documentado que a extensão de esterifi-
cação nas posições 6 e 7 do macrociclo não tem efeito nas
propriedades de absorção electrónica e fluorescência de te-
trapirroles (ver, por exemplo, Belanger, F.C. e C.A. Rebeiz,
J. Biol. Chem. (1982) 257:1360).

35 As quantidades de Proto, Mg-Protos,

Handwritten signature and date stamp. The date stamp is partially legible and appears to be "13 JAN 1980".

1 PChlides, Chlides e Pheobides foram determinados por espec-
trofluorometria sobre partes alíquotas da fracção polar he-
xano acetona extraída de acordo com os métodos de Rebeiz,
5 C.A., J.R. Mattheis, B.B. Smith, C.C. Rebeiz, e D.F. Dayton,
Arch. Biochem. Biophys. (1975) 171:549 e Bazzaz, M.B. e C.A.
Rebeiz, Photochem. Photobiol. (1979) 3L:709. Os resultados
estão apresentados na Tabela II:

10

15

20

25

30

35

[Handwritten Signature]
13 JUN 1988

1
5
10
15
20
25
30
35

TABELA II

Teor de Pigmento das Dietas sobre as quais as Larvas foram Criadas

Especi- riên- cia	Dieta	Teor de pigmento em nmoles por 100 mg de protefina									
		Proto	MV Chlide a ₁	MV Chlide b ₁	MV Pheobide a ₁	MV Pheobide b ₁	MV Chl a ₁	MV Chl b ₁	MV Pheo a ₁	MV Pheo b ₁	
A	Dieta + A.M.	0	2,39	5,45	53,28	108,07	0	3,71	31,52	49,54	
B	Dieta - A.M.	0	0	0	0	0	0,15	0,05	0,29	0,74	

1 em que "Diet + A.M." = a dieta contendo farinha de alfalfa,
e "Diet - A.M." = dieta que não contém farinha de alfalfa.

5 As quantidades de MV Pheobide a e b na
dieta contendo farinha de alfalfa estão indicadas na Tabela
II: A. Pequenas quantidades de Chlide a e b estavam tam-
bém presentes (Tabela II: A). A dieta que não continha fari-
nha de alfalfa tinha apenas vestígios de pigmentos clorofí-
10 losos (Tabela II: B).

EXEMPLO II

Pigmentos de T. ni

15 Larvas T. ni no seu quinto instar cria-
das sobre dietas contendo ou não farinha de alfalfa foram
cuidadosamente homogeneizadas quer com argamassa e almofa-
riz quer com um homogeneizador Brinkman modelo PT 10/35
(Brinkman Instrument Co., Westbury, N.I. 11590) em acetona:
20 :0,1 N NH₄OH (9:1 v/v) a uma proporção de 6 ml de dissolven-
te por grama de tecido. Pigmentos polares e apolares foram
extraídos como no Exemplo I. Os resultados estão indicados
na Tabela III:

Handwritten signature and a circular stamp with illegible text.

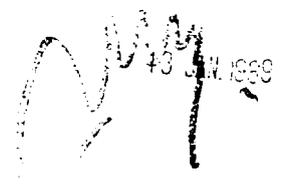
1
5
10
15
20
25
30
35

TABELA III

Teor de Pigmento das Larvas T. ni

Teor de Pigmento em nmoles por 100 mg de proteína

Expe- riên- cia	Dieta	Proto		MV		Pheobide		MV		Chl		MV		Pheo	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
A	<u>T. ni</u> + A.M.	0	0,68	12,31	21,39	45,99	0,12	0,21	0,04	0,21	0,04	0,04	0,07	0,07	1,56
B	<u>T. ni</u> - A.M.	0,2	0,14	0,25	0,04	1,88	0,27	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0



M
13 JUN 1968

1 em que "T. ni + A.M." = a larvas criadas sobre dietas contendo farinha de alfalfa e "T. ni - A.M." = a larvas criadas sobre dieta isenta de farinha de alfalfa.

5 Em contraste com a dieta de farinha de alfalfa que continha quantidades substanciais de MV Pheo a e b além de MV Pheobide a e b, o R. ni continha pequenas quantidades de Pheos, cujo nível parece variar de corte para corte (Tabela III: A; ver também Tabela IV abaixo). Os pigmentos acumulados pelas larvas eram mais polares e consistiam principalmente em MV pheophorbide a e MV pheophorbide b (Tabela I: E; Tabela III: A). Por outro lado, as larvas criadas sobre a dieta que não tinha farinha de alfalfa continham apenas vestígios de pigmentos clorofilosos (Tabela III: B).

15 A fim de determinar o local da acumulação de pigmento, a pele, hemolinfa e entranhas do quinto instar das larvas T. ni criadas sobre a dieta contendo farinha de alfalfa foram separadas e analisadas quanto ao teor de pigmento. A hemolinfa foi reunida a partir de 9 a 10 larvas alimentadas com uma dieta sem alfalfa e de 9 a 10 larvas alimentadas com uma dieta com alfalfa perfurando suavemente a pele sobre o coração compartimentado em um segmento posterior do abdómen das larvas. A hemolinfa extrudida foi recolhida numa ceringa No. 22 e foi imediatamente esguichada em acetona fria: 0,1 N NH₄OH (9:1 v/v). Depois da colheita de hemolinfa, as larvas foram parcialmente descongeladas antes da abertura da pele longitudinalmente com um escalpelo afiado. A pele descongelada (isto é, o tegumento de insecto) foi então cuidadosamente retirada das entranhas ainda congeladas. A pele foi colocada com água destilada arrefecida com gelo para posterior lavagem enquanto as entranhas foram colocadas em acetona arrefecida por gelo: 0,1 N NH₄OH (9:1 v/v). A pele foi enxaguada três vezes com água destilada, depois foi colocada em acetona fria: 0,1 N NH₄OH (9:1 v/v) para homogeneização. A hemolinfa, entranhas e fracções de tegumento foram homogeneizadas em acetona fria: 0,1 N NH₄OH (9:1 v/v) com argamassa

Handwritten signature and a circular stamp with illegible text.

1

e almofariz e extraídas de acordo com o processo do Exemplo I. Os resultados estão apresentados na Tabela IV:

5

10

15

20

25

30

35

Mod. 71 - 10 000 ex - 4-87

13/11/1988

1
5
10
15
20
25
30
35

TABELA IV

Teor de Pigmento de Vários Tecidos de Larvas T. in Criada
sobre uma Dieta Contendo Farinha de Alfalfa

Teor de Pigmento em nmoles por 100 mg de proteína

Proto	MV								
	Chlide	Chlide	Pheobide	Pheobide	Chl	Chl	Pheo		
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>		
							<u>b</u>		
pele	0	0,05	0,12	0,42	1,03	0,13	0,05	0,07	0,08
entranhas	0	0,39	2,61	12,22	18,05	0,38	0,49	9,75	17,32
hemolinfa	0,07	0,25	0,13	0,18	1,19	0,98	0,50	0,18	0



1 Como indicado na Tabela IV, a maior parte do pigmento foi encontrada nas entranhas. Pequenas quantidades de pigmento foram também detectadas no tegumento e na hemolinfa.

5 EXEMPLO III

Acumulação de Protoporfirina IX em T. ni Tratada com Ácido Delta-aminolevulínico e 2,2'-Dipiridilo

10 Um bloco de alimento (2,5 x 1,5 x 1 cm) e 20 a 30 larvas T. ni no seu terceiro instar foram colocados num recipiente de papel 8-oz (9 cm de diâmetro) e o recipiente foi pulverizado com 0,35 ml de 40 mM ALA -30 nM 2,2'-DP em acetona: álcool etílico: Tween 80: água (0,45:0,45:15 :0,1:9 v/v/v/v), ajustado ao pH 3,5. A solução foi aplicada como uma pulverização fina com um diâmetro médio das gotículas de cerca de 50 microns. Isto foi equivalente a uma velocidade de pulverização de 40 galões por acre. Os tratamentos foram repetidos quatro vezes. Os recipientes pulverizados foram cobertos com uma tampa de plástico transparente e as 20 larvas tratadas foram então incubadas durante a noite (17 horas, geralmente das 4 da tarde de um determinado dia até às 9 da manhã do dia seguinte) no escuro a 28°C antes da extração como no Exemplo II. Os resultados estão indicados na Tabela V. 25

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA V

Propriedades de Absorção e Fluorescência do Pigmento Predominante
que Acumula em T. ni depois do Tratamento com ALA + 2,2'-DP

Material	Absorção a 298°K em 80% de acetona (nm)	Fluorescência a 77°K em éter (nm)		Identificação do Pigmento
		Emissão Vermelha	Excitação Soret	
Autêntico Uro	400,498,531,568,622	618	402	
Autêntico Copro	405,496,528,565,619	619	400	
Autêntico Proto	403,503,538,573,629	629	409	
Autêntico Mg-Proto	417,553,592	591	424	
Extracto de <u>T. ni</u>	403,503,538,573,629	629	409	DV Proto IX
Extracto de <u>T. ni</u> depois da inser- ção Mg		591	424	DV Mg-Proto IX

||
28
||



13 JAN. 1968

1 Embora o perfil do pigmento das larvas de
controle, que foram pulverizadas apenas com dissolvente, seja
semelhante ao descrito nas Tabelas I: E e III: A, o perfil de
pigmento das larvas tratadas com ALA - 2,2'-DP foi drastica-
5 mente diferente. A fluorescência de MV Pheobide a e b na
fracção de acetona aquosa extraída com hexano tornou-se com-
pletamente obscura por fluorescência com uma emissão máxima
à temperatura ambiente a 631 nm e uma excitação máxima Soret
a 405 nm. Este perfil de fluorescência foi idêntico ao do au-
10 têntico DV Proto dissolvido em acetona aquosa extraída com
hexano [Fig. 1: (a), extracto extraída com hexano de larvas
de controle; o pico de emissão a 674 nm é o mesmo de MV Pheo
a ; (b) extracto das larvas tratadas; (c) autêntico DV Pro-
to na acetona extraído com hexano]. A confirmação da natu-
15 reza do pigmento acumulado foi conseguida comparando o seu es-
pectro de absorção em acetona a 80% para os de éster octame-
tilo de uroporfirina, coproporfirina, DV Proto, e DV Mg-Proto
(Porphyrin Products, Logan, UT). Como está indicado na Tabe-
la V, o extracto de acetona a 80% de T. ni apresentou um es-
20 pectro de absorção à temperatura ambiente que era idêntica ao
autêntico DV Proto. Depois de transferido para éter, o pig-
mento apresentou a mesma emissão de fluorescência e excita-
ção máxima Soret a 77°K (629 e 409 nm respectivamente) como
Proto autêntico. Depois da inserção de Mg no pigmento (como
25 descrito em Belanger, F.C. e C.A. Rebeiz, J. Biol. Chem.
(1982) 257:1360), o mesmo apresentou a mesma emissão de fluo-
rescência e máxima excitação em éter a 77°K como autêntico
DV Mg-Proto (Tabela V). Conjuntamente estes resultados indi-
cam que o tratamento de larvas T. in com ALA e 2,2'-DP re-
30 sultou na biosíntese e acumulação de DV Proto pelas larvas.

EXEMPLO IV

Efeitos Insecticidas do Tratamento ALA + 2,2'-DP

35 Para determinar as relações entre o trata-

10 MAR 1969

1 mento ALA + 2,2'-DP, acumulação de pigmento e efeitos insec-
tícidias, larvas T. ni na terceira instar foram pulverizadas
com 40 mM ALA - mM 2,2'-DP a um pH de 3,5 e foram incubadas
5 durante a noite (17 horas) no escuro a 28°C como no Exemplo
III. Na manhã seguinte, uma série de três réplicas foram co-
locadas na estufa a 25°C sob um fotoperíodo de 14 horas de
luz, 10 horas de escuro, a fim de se observar a morte das
larvas. A quarta réplica constitui o controle (pulverizado
10 apenas com dissolvente); o controle e as réplicas tratadas
foram extraídas para determinações quantitativas de pigmen-
to como no Exemplo II. A morte das larvas foi avaliada por
comparação diária das larvas sobreviventes entre os insec-
tos tratados e os de controle. A proteína foi determinada
15 suspendendo o resíduo de acetona insolúvel que foi precipita-
do por centrifugação do homogenato tecido em água destilada
com um triturador de tecido totalmente de vidro. As proteí-
nas totais foram determinadas por biureto numa pequena parte
alíquota depois da aplicação de acordo com o método de Re-
beiz, C.A. e P.A. Castel franco, Plant Physiol. (1965) 40:281.
20 Os resultados de várias experiências estão indicados na Ta-
bela VI:

25

30

35

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA VI

Efeito de ALA + 2,2'-DP sobre a Biosíntese e Acumulação de Proto e sobre a Extensão da Morte Larval em T. ni

Teor de Pigmento passadas 17 horas de incubação no escuro
nmoles por 100 mg de protefina

Ex- peri- ência	Tratamento	MV Chlide		MV Pheo- bide		MV Chl		MV Pheo		morte larval (%)
		a	b	a	b	a	b	a	b	
A	Control	0,1	0,3	5,5	7,8	1,4	0,5	2,9	4,2	3
	Tratado	85,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,6	1,7	80
	Alteração	84,9	-0,3	-5,5	-7,8	-1,0	-0,4	-2,3	-3,5	77
B	Control	0,0	0,2	3,4	5,7	0,1	0,0	2,5	4,8	1
	Tratado	96,7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,4	1,3	4,4	75
	Alteração	96,7	-0,2	-3,4	-5,7	-0,5	0,4	-1,2	-0,4	74
C	Controlo	0,1	0,4	12,1	29,0	0,3	0,1	2,1	4,1	13
	Tratado	12,8	0,3	5,1	9,5	1,9	1,3	2,0	7,4	47
	alteração	12,7	-0,1	-7,0	-19,5	-1,6	-1,2	-0,1	-3,3	34

1 em que "Morte Larval" se refere à percentagem de morte no
início do quarto fotoperíodo, isto é, depois de 3 dias na
estufa, e "alteração Δ " refere-se à diferença em teor de
5 pigmento entre as larvas tratadas com ALA + 2,2'-DP e as lar-
vas de controle depois do período de incubação no escuro de
17 horas após a pulverização.

10 O tratamento ALA + 2,2'-DP resultou em
acumulação maciça Proto e morte larval significativa. A per-
centagem de morte larval apresentou um elevado grau de cor-
relação com a acumulação (Tabela VI). A maior parte das mor-
tes ocorreram durante o período fotoperíodo. Dentro de minu-
tos até poucas horas depois da exposição à luz as larvas tor-
naram-se lentas e flácidas devido à perda de fluídos do cor-
15 po; a morte foi acompanhada por dissecação extensiva.

20 Para determinar o local de acumulação
Proto, o tegumento, hemolinfa e entranhas tratadas com ALA +
+ 2,2'-DP, na sua anterior quinta instar, foram separados e
analisados quanto ao teor de pigmento como no Exemplo II.
Numa base de proteína por unidade, cerca de 59% do Proto a-
cumulado foi observado na Hemolinfa, 35 % nas entranhas e
6% no tegumento.

EXEMPLO V

Efeitos de Acumulação de Protoporfirina sobre a Morte Larval e Alteração de peso do Corpo no Escuro e à Luz

25
30 Durante o curso da experiência, foi obser-
vado que o tratamento com ALA + 2,2'-DP tinha causado de
modo consistente a morte larval tanto no escuro como à luz.
Para determinar se a morte larval depende de ALA + 2,2' foi
ou não um fenómeno fotodinâmico, larvas T. ni na terceira
instar foram pulverizadas quer apenas com dissolvente (con-
35 troles) quer com 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP com o pH ajusta-

11/14/1939

1 do a 3,5 como no Exemplo III. As larvas pulverizadas foram
deixadas acumular Proto durante a noite por incubação no
escuro durante 17 horas a 28 C. Na manhã seguinte, algumas
5 das larvas foram expostas a 0, 3 ou 6 horas à luz, na estu-
fa, antes da extracção do pigmento como no Exemplo II. Amos-
tras em duplicado submetidas ao mesmo tratamento de luz fo-
ram levadas de novo para o escuro durante 48, 45 e 42 horas
respectivamente, antes de controlar a média da morte larval
10 como no Exemplo V. Avaliação posterior dos danos do trata-
mento dependente entre as larvas vivas foi feita por deter-
minação do peso do corpo passados três dias de exposição fo-
toperiódica na estufa. Os resultados das duas experiências
estão indicados na Tabela VII:

15

20

25

30

35

TABELA VII

Efeito de Proto Acumulação sobre a Morte Larval T. ni e Alteração do Peso do Corpo no Escuro e à Luz

Ex- peri- ência	Regime Luz/Escuro depois de pulveriza- ção e incubação de 17 horas no escuro	Teor Proto passadas 17 h de incubação no escuro pós-pulveriza- ção e 0,6 h de ilumina- ção (nmol/100mg proteína)	Morte Larval pós/pulve- rização depois de 17 h de incu- bação no es- curo (%)	Peso do corpo depois do tra- tamento por larva viva de- pois do perío- do total de 65 hr (mg)
A	1 Controlo, dois foto- períodos 14 h à luz + 10 h no escuro	0,2 ^a	1	45,1
A	2 Tratado, 0 horas à luz + 48 h no escuro	62,0 ^a	28	44,5
A	3 Tratado, 3 h à luz + 45 h no escuro	0,4 ^b	21	43,4
A	4 Tratado, 6 h à luz + 42 h no escuro	1,1 ^c	22	26,6
A	5 Tratado, dois foto- períodos 14 h à luz + 10 h no escuro	62,0 ^a	19	16,6

Handwritten signature and a circular stamp with the number 1069.

TABELA VII (Continuação)

Efeito de Proto Acumulação sobre a Morte Larval T. ni e Alteração do Peso do Corpo no Escuro e à Luz

Ex- peri- ência	Regime Luz/Escuro depois de pulveriza- ção e incubação de 17 horas no escuro	Teor Proto passadas 17 h de incubação no escuro pós-pulveriza- ção e 0,6 h de illumi- nação (nmol/100 mg proteína)	Morte Larval pós/pulve- rizaçõ depois de 17 h de incu- bação no es- curo (%)	Peso do corpo depois do tra- tamento por larva viva de pois do perío- do total de 65-h (mg)
B 1	Controle, dois foto- períodos 14 h à luz + 10 h no escuro	0,2 ^a	0	44,1
B 2	Tratado, 0 horas à luz + 48 horas no escuro	40,1 ^a	19	45,7
B 3	Tratado, 3 horas à luz + 45 horas no escuro	1,2 ^b	20	32,1
B 4	Tratado, 6 horas à luz + 42 horas no escuro	0,6 ^c	21	20,5

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA VII (Cont.)

Efeito de Proto Acumulação sobre a Morte Larval T. ni e Alteração do Peso do Corpo no Escuro e à Luz

Ex- peri- ência #	Regime Luz/Escuro depois de pulveriza- ção e incubação de 17 horas no escuro	Teor Proto passadas 17 h de incubação no escuro pós-pulveriza- ção e 0,6 h de ilumina- ção (nmol/100 mg proteína)	Morte Larval pós/pulve- rização depois de 17 h de incu- bação no es- curo (%)	Período total 65 h	Peso do corpo depois do tra- tamento por larva viva de pois do perfó- do total de 65-h (mg)
-------------------------	---	--	---	--------------------------	---

B 5 Tratado, dois foto-
períodos 14 horas à
luz
+ 10 horas no escuro

40,1^a

22

95

3,6

Nível de coeficiente de corre-
lação de significância

0,808^d
5%

-0,851^e
1%

- a Teor de Proto depois de um período de incubação no escuro de 17 horas após a pulverização
- b Teor de Proto depois de um período de incubação no escuro de 17 horas e 3 horas de iluminação
- c Teor de Proto de um período de incubação no escuro de 17 horas e 6 horas de iluminação
- d Correlação entre a morte larval e a extensão da exposição após a pulverização à luz. Computando o coeficiente de correlação, a morte larval do controle foi substituída dos que foram tratados
- e Correlação entre a extensão da exposição após a pulverização à luz e a média de alteração do peso de corpo por larva sobrevivente. Calculado o coeficiente de correlação, a média de peso do corpo das larvas de controle foi subtraída do peso das larvas tratadas.

A handwritten signature in dark ink is located in the top right corner. Below the signature is a circular date stamp containing the text "13 JAN 1968".

1 O tratamento das larvas com ALA + 2,2'-DP
resultou na acumulação de Proto. Um grau significativo da
morte de larvas foi também observado nas larvas tratadas ao
fim de 17 horas depois do período de incubação de pulve-
5 rização no escuro, antes de qualquer exposição à luz (Tabela
VII: A 2, B 2). A incubação adicional no escuro resultou em
posterior morte larval. Este modo de morte larval é aqui re-
ferido como morte larval dependente do escuro. As larvas que
sobreviveram ao período de morte larval no escuro com compre-
10 endem uma perda de peso do corpo detectável (Tabelas VII:
A 1, 2; B 1, 2). Estes resultados indicam que a acumulação
Proto de ALA + 2,2'-DP-dependente foi acompanhada pela morte
larval no escuro.

15 Três ou seis horas de eluminação das larvas
que tinham acumulado Proto durante as 17 horas de incubação
no escuro depois da pulverização resultou na destruição e
desaparecimento do Proto acumulado (Tabela VII: A 2-4,
B 2-4). A mortalidade de larvas tratadas que foram expostas
a 3 ou 6 horas de iluminação antes de serem colocadas de
20 novo no escuro durante 45 e 42 horas, respectivamente, exce-
deu o nível de mortalidade larval no escuro (Tabela VII:
A 2-4, B 2-4). Este modo de morte larval é aqui referido
como morte larval dependente da luz. Esta forma de mortali-
dade apresentou uma correlação significativa com a extensão
25 da iluminação (Tabela VII: coluna 6). Além disso, as larvas
tratadas que sobreviveram ao tratamento de luz apresentaram
uma inibição significativa em ganho de peso de corpo em com-
paração com os controles não tratados que foram pulverizados
apenas com dissolvente (Tabela VII, coluna 7). A correlação
30 entre a extensão da exposição do pós-tratamento à luz e a
inibição no ganho do peso do corpo foi altamente significa-
tiva (Tabela VII, coluna 7).

35 Em conjunto, estes resultados indicaram que
além da morte larval no escuro, a acumulação de Proto resul-
tou numa mortalidade larval dependente da luz ou fotodinâ-

1 mica. Além disso o Proto acumulado desapareceu durante a
iluminação, provavelmente como uma consequência de fotodes-
trição.

5 EXEMPLO VI

Efeitos Sinérgicos de ALA e 2,2'-DP sobre Acumulação de
Proto e Morte Larval em T. ni

10 Os efeitos relativos de ALA e 2,2'-DP sobre
acumulação de Proto e morte larval na terceira instar T. ni
tratada como no Exemplo III e ensaiada como no Exemplo II
estão descritos na Tabela VIII: A:

15 TABELA VIII

Efeitos Sinérgicos de ALA e 2,2'-DP que Provocam a
Acumulação Proto e Morte Larval em T. ni

Ex- peri- ência	#	Tratamento	Teor de Proto (nmol/ 100 mg proteína)	Morte larval passados 3 dias na estufa (%)
A	1	Controle	0	6
	2	40 mM ALA	2,5	26
	3	30 mM 2,2'-DP	15,5	41
	4	40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	80,4	90
B	1	Controle	0	2
	2	30 mM 2,2'-DP	11	61
	3	30 mM 2,2'-DP + 10 mM ALA	75	86
	4	30 mM 2,2'-DP + 20 mM ALA	89	76
	5	30 mM 2,2'-DP + 40 mM ALA	73	92

1

TABELA VIII (Continuação)

Efeitos Sinérgicos de ALA e 2,2'-DP que Provocam a
Acumulação Proto e Morte Larval em T. ni

5

Ex- peri- ência	#	Tratamento	Teor de Proto (nmol/ 100 mg proteína)	Morte larval passados 3 dias na estufa (%)
	1	Controle	0	7
	2	15 mM 2,2'-DP	1	22
	3	15 mM 2,2'-DP + 10 mM ALA	8	42
	4	15 mM 2,2'-DP + 20 mM ALA	34	40
	5	15 mM 2,2'-DP + 40 mM ALA	27	43
	1	Controle	0,2	5
	2	40 mM ALA	1,1	7
	3	40 mM ALA + 5 mM 2,2'-DP	3,8	4
	4	40 mM ALA + 10 mM 2,2'-DP	6,7	18
	5	40 mM ALA + 20 mM 2,2'-DP	12,1	34
	6	40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	15,3	71
		Correlação entre o teor de Proto e a morte larval		0,857
		Nível de significância		0,1 %

30

35

1 O ácido delta--aminolevulínico isolado resultou no modesto
nível de acumulação Proto e morte larval (Tabela VIII: A 2).
2,2'-Dipiridil na ausência de ALA adicionado foi mais efi-
caz que ALA para provocar a acumulação Proto e morte larval
5 (Tabela VIII: A 2, 3); isto é, na ausência de ALA adiciona-
do, o 2.2'-DP actuou como um indutor de acumulação de Pro-
to. Finalmente, os efeitos sinérgicos de ALA + 2,2'-DP
foram manifestados quando os dois produtos químicos foram
utilizados conjuntamente no tratamento das larvas T. ni.
10 Sob estas condições a acumulação Proto (80,4 nmoles) Sob
estas condições a acumulação Proto (80,4 nmoles) e morte
larval (90%) excedendo largamente a soma de acumulação Pro-
to (2,5 + 15,5 = 18 nmoles) e a morte larval (26 + 41 = 67%)
15 provocada pelos tratamentos separados com ALA e 2,2'-DP
(Tabela VIII: A 2-4).

EXEMPLO VII

Aumento de Conversão ALA até Protoporfirina por meio de

2,2'-Dipiridilo

20 Para determinar se além das suas proprie-
dades de indução (Tabela VIII: A 3) a propriedades de aumen-
to de 2,2'-DP apresentadas como sugeridas pela Tabela VIII;
A, os seus efeitos sobre a acumulação de proto e sobre a
25 concomitante morte larval foram examinados na presença de
várias quantidades de ALA adicionada. As larvas na sua ter-
ceira instar foram pulverizadas como no Exemplo III e ensai-
adas como no Exemplo II. A concentração alta (30 mM) e a
média (15 mM), de 2,2'-DP apresentaram propriedades aumenta-
30 das além das suas propriedades indutoras de Proto. As pro-
priedades indutoras de Proto 2,2'-DP foram demonstradas pe-
lo aumento na acumulação de Proto e a morte larval concomi-
tante na ausência de ALA adicionado (Tabela VIII: B 2, C 2).
35 As propriedades melhoradas de 2,2'-DP foram evidenciadas
pelo aumento dramático em acumulação Proto e morte larval

13/10/1989

1 nas larvas tratadas com ALA + 2,2'-DP, sobre a para além
das tratadas apenas 2,2', como resultado da conversão gran-
demente melhorada de ALA exógeno até Proto (Tabela VIII:
5 B 3-5, C 3-5). Finalmente a dependência das propriedades de
intensificação do 2,2'-DP sobre a concentração de 2,2'-DP
está descrito na Tabela VIII: D.

O conjunto dos resultados anteriores indi-
ca que embora na ausência da adição de ALA, o 2,2'-DP ac-
tuou como no indutor de acumulação de Proto, na presença de
10 ALA exógeno e também actuou como um intensificador da con-
versão de ALA até Proto. 2,2'-DP é assim um exemplo de um
indutor-intensificador de biosíntese de tetrapirrole.

15 EXEMPLO VIII

Efeito de pH sobre a Acumulação de Proto Dependente de ALA -2,2'-DP e sobre a Morte Larval em *T. ni*

20 O ácido delta-aminolevulínico é um Zwitterion, isto é, a sua carga líquida é uma função do pH. Visto que o seu ponto isoiónico é a um pH 6,47, o mesmo adquire uma carga positiva abaixo do pH 6,47 e uma carga negativa acima desse pH. Visto que a translocação de Zwitterions nos tecidos biológicos é influenciada pela magnitude da carga eléctrica líquida sobre o ião, a influência deste parâmetro sobre a translocação de ALA e 2,2'-DP nas larvas tratadas foi examinada. A extensão de translocação de ALA e 2,2'-DP nas larvas *T. ni* foi inferida a partir da extensão da acumulação de Proto e morte larval.

30 As larvas *T. ni* na terceira instar foram pulverizadas com soluções de 30 mM 2,2'-DP + 40 mM ALA ao pH 3,5 e 5,5 (ALA carregado positivamente) e ao pH 7,5 (ALA carregado negativamente) de acordo com o processo do Exemplo III. Como é usual os controles foram pulverizados com apenas o dissolvente. Passadas as 17 horas do período



13 JAN. 1969

1 pós-pulverização de incubação no escuro, algumas das larvas
foram extraídas para determinação Proto de acordo com o pro-
cesso do Exemplo II, enquanto as amostras em duplicado foram
5 expostas à luz na estufa. A morte das larvas foi determinada
passados 3 dias na estufa. Os resultados estão indicados na
Tabela IX:

TABELA IX

10 Efeito de pH sobre ALA + 2,2'-DP Acumulação Dependente
de Proto em larvas T. ni

15 Ex- peri- ência	#	Tratamento	Teor de Proto (nmol/ 100 mg proteína)	Morte larval passados 3 dias na estufa (%)
20	A 1	Controle	0,1	3
	2	Tratado, pH 3,5	85,0	81
	3	Tratado, pH 5,5	73,8	85
	4	Tratado, pH 7,5	108,5	80
25	B 1	Controle	0,0	1
	2	Tratado, pH 3,5	96,7	75
	3	Tratado, pH 5,5	110,4	82
	4	Tratado, pH 7,5	73,7	85
Coeficiente de correlação			0,007 ^a	0,540 ^b
Nível de significância				

30 ^a Correlação entre o pH e o teor Proto em larvas tratadas
com ALA + 2,2'

^b Correlação entre o pH e a morte larval em larvas tratadas
com ALA + 2,2'-DP.



1 Como está representado na Tabela IX, quanti-
dades consideráveis de Proto foram formadas pelas larvas
tratadas a todos os valores de pH. A morte larval foi tam-
bém substancial a todos os valores de pH. Entre o pH 3,5 e
5 7,5, nem a acumulação Proto nem a morte larval mostraram es-
tar correlacionadas com o pH. Em conjunto estes resultados
indicam que a translocação de ALA + 2,2'-DP em larvas T. ni
e subsequente conversão de ALA em Proto pelas larvas não es-
tava estritamente dependente do pH na gama de 3,5 a 7,5.

EXEMPLO IX

Dependência da Morte Larvar em T. ni Tratadas com

ALA - 2,2'-DP sobre a Idade das Larvas

15 A dependência da morte larval T. ni trata-
das com ALA + 2,2'-DP sobre a idade das larvas tratadas foi
investigada. As larvas T. ni, na primeira, segunda, tercei-
ra e quarta instar foram tratadas com 40 mM ALA + 30 mM 2,2'
-DP ao pH 3,5 como no Exemplo III. Depois de um período de
20 incubação no escuro de 17 horas, as larvas tratadas e de
controle foram expostas à luz na estufa. A morte larval foi
avaliada passados 3 dias na estufa. Os resultados estão in-
dicados na Tabela X:

25

30

35

TABELA X

Dependência da Susceptibilidade de T. ni para o Tratamento
ALA + 2,2'-DP sobre o Instar das Larvas Tratadas

Experi- ência	#	Instar ^a	Morte larval sobre e para além dos controles depois de 3 dias na estufa (%)
A	1	1	76
	2	2	42
	3	3	43
B	1	1	64
	2	2	63
	3	3	27
C	1	2	75
	2	3	28
	3	4	11
D	1	2	70
	2	3	23
	3	4	11
Coeficiente de correlação entre o grau da instar e a morte larval			-0,897
Nível de significância			0,1%

^a1, 2, 3 referem-se à primeira, segunda e terceira instar, respectivamente

A Tabela X mostra que a susceptibilidade de T. ni para o tratamento ALA - 2,2'-DP foi inversamente proporcional ao grau do instar, sendo as larvas do instar mais jovens as

13 JUN 1959

1 mais susceptíveis e sendo as da quarta instar as menos susceptíveis.

5 Para determinar se a susceptibilidade ao tratamento ALA + 2,2'-DP depende da fase de desenvolvimento dentro de uma instar particular, larvas T. ni nas fases inicial, média e final da terceira e quarta instares foram tratadas com ALA + 2,2'-DP como acima. Os resultados são mostrados na Tabela XI:

10 TABELA XI

Dependência da Susceptibilidade de T. ni para ALA -
- 2,2'-DP sobre o Estágio de Desenvolvimento dentro
de uma Instar Particular

15

Ex- peri- ência	#	Estágio de instar	Grau de suscep- tibili- dade	Morte larval sobre e para além dos contro- les depois de 3 dias na estufa	
				Antes de normali- zação (%)	Depois de normali- zação (%)
A	1	Terceiro médio	1	47	52
	2	Terceiro primitivo	2	60	66
	3	Terceiro tardio	3	91	100
B	1	Terceiro médio	1	47	92
	2	Terceiro primitivo	2	39	76
	3	Terceiro tardio	3	51	100
C	1	Terceiro médio	1	21	57
	2	Terceiro primitivo	2	18	49
	3	Terceiro tardio	3	27	100
D	1	Terceiro médio	1	26	54
	2	Terceiro primitivo	2	35	73
	3	Terceiro tardio	3	48	100
Correlação entre o estágio de desenvolvimento dentro de uma instar e a morte larval				0,739	
Nível de significância				1%	

20

25

30

35

1 Os resultados sugerem que, para uma instar particular, o último estágio foi o mais susceptível, seguido pelos estágios primitivo e médio. Isto por sua vez sugere que quanto mais próximas as larvas estiverem da apólise (separação do cutículo da epiderme), mais susceptíveis as mesmas são ao tratamento com ALA - 2,2'-DP. Os estágios médio, primitivo e tardio de cada instar particular foram assinalados com um grau de 1, 2 ou 3, indicando "1" o estágio menos susceptível e "3" o estágio mais susceptível. Para eliminar as diferenças estatísticas em susceptibilidade entre as terceira e quarta instars (ver Tabela X), todos os valores de percentagem de morte dentro de cada experiência foram normalizados para o mesmo valor. O último foi escolhido como 100, e representou a percentagem de morte para o último estágio dentro de cada instar (Tabela XI, última coluna). Deste modo tornou-se possível testar a relação entre a morte larval e os estágios primitivos, médio e tardio da instar, indendentemente do grau da instar. Como está indicado na Tabela XI, esta relação foi altamente significativa com os estágios primitivo e médio da instar a ser menos susceptíveis ao tratamento com ALA + 2,2'-DP que o estágio tardio da instar. Este período de máxima susceptibilidade corresponde ao período em que as larvas são imóveis e a nova cutícula para a instar seguinte está sendo activamente sintetizada por baixo da cutícula velha.

EXEMPLO X

Relação entre as espécies Larvais, ALA + 2,2'-DP

Proto-acumulação Dependente, e Morte Larval

30 Para determinar se ALA + 2,2'-DP-acumulação Proto dependente e morte larval foram fenómenos gerais comuns a todas as larvas de insectos ou específicos para determinadas espécies particulares de insectos, foi realizado um estudo da resposta de várias espécies larvais ao trata-

35

13 JAN 1979

1 mento com ALA + 2,2-DP.

5 Colônias do perfurador do milho Heliothis zea (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) foram desenvolvidas a partir de ovos proporcionados pelo Dr. Gilbert Waldbauer, no Departamento de Entomologia da Universidade de Illinois em Urbana Champaign. As larvas foram alimentadas com a mesma dieta que as T. ni acima.

10 As larvas de H. Zea foram pulverizadas como no Exemplo III; todavia, ao contrário das T. ni, as larvas H. zea são canibalísticas e têm de ser tratadas de maneira diferente. Vinte e cinco larvas com 1 cm de comprimento (mistura da terceira e quarta instar) foram colocadas individualmente com um cubo de dieta em compartimentos individuais (3 x 5 x 1,5 cm) de um tabuleiro de plástico com 25 células (Bioserve, Inc., Frenchtown, NJ 08825). Para confinar as larvas aos seus compartimentos individuais, o tabuleiro plástico foi coberto com uma placa de vidro. A placa de vidro foi removida antes da pulverização e foi colocada de novo imediatamente depois. A pulverização foi como se descreveu para T. ni. Os recipientes pulverizados foram cobertos com uma placa de vidro antes de ser colocadas no escuro a 25° durante 17 horas.

25 Os resultados são apresentados na Tabela XII:

TABELA XII

Dependência de ALA + 2,2'-DP - Acumulação Proto Dependente e Morte Larval sobre as Espécies Larvais

Ex- peri- ência	Tratamento de H. zea	Teor de Proto (nmol/100 mg proteína)	Morte Larval em <u>H. zea</u> dos 3 dias na estufa (%)
	Controle	0	0
A	Tratado	2,5	7
	alteração	2,5	7
	Controle	0	0
B	Tratado	1,4	33
	alteração	1,4	33

011
3 JUN 1959

1 Os tratamentos com ALA 40 mM + 30 mM 2,2'-DP que resultaram
em quantidades maciças de acumulação e em morte significati-
va larval em T. ni (Tabelas VI-OX), resultaram num baixo
nível de acumulação Proto em H. Zea. A morte larval foi
5 também muito mais baixa que em T. ni (Tabela XII). Não se
sabe presentemente se a proporção mais baixa de acumulação
Proto e a concomitante proporção mais baixa de morte de lar-
vas H. Zea tratadas com ALA - 2,2'-DP em comparação com T.
ni é devida a(a) diferenças na transposição dos produtos
10 químicos aplicados aos tecidos internos do insecto ou (b)
a algumas outras diferenças fioquímicas básicas na regula-
ção da passagem porfirina-heme entre as duas espécies. Nos
T. ni tratados com ALA + 2,2'-DP, a maior parte de proto
acumulou-se na hemolinfa. Isto por seu turno indicou uma
15 transposição adequada de ALA e 2,2'-DP para os locais pre-
tendidos. Se estes produtos químicos se transpõem do mesmo
para os tecidos interiormente de H. zea não é conhecido.

Estes resultados mostram que algumas espé-
cies de larvas são mais susceptíveis que outras ao tratamen-
20 to com ALA - 2,2'-DP. Visto que é muito desejável extermi-
nar insectos nocivos enquanto se defendem os benefícios, a
susceptibilidade diferencial das diferentes espécies de in-
sectos para os insecticidas porfíricos pode ser explorada
concebendo insecticidas porfíricos para espécies específi-
cas.
25

EXEMPLO XI

Eficácia do Tratamento com ALA + 2,2'-DP na Ausência
30 de um Período de Incubação no Escuro Pós-
-Pulverização

Larvas de T. ni na segunda instar foram
pulverizadas com ALA + 2,2'-DP e foram submetidas a um pe-
río de incubação no escuro de 17 horas antes da exposição
35 à luz na estufa (pulverização no escuro). Larvas semelhan-

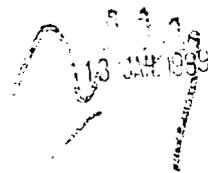
tes foram pulverizadas com ALA + 2,2'-DP na estufa, no início da fase de luz do fotoperíodo 14 horas de luz-10 horas de escuro (pulverização à luz). Os resultados de quatro experiências estão indicados na Tabela XIII:

TABELA XIII

Comparação da Eficácia de ALA + 2,2'-DP Pulverização com Luz e Pulverização no Escuro em T. ni

Es- peri- ência	Tratamento	Morte Larval passa- dos 3 dias na estufa (%)
	DSP Controle	21
A	DSP 20 mM ALA + 15 mM 2,2'-DP	90
	DSP de alteração	69
	LSP Controle	25
B	LSP 20 mM ALA + 15 mM 2,2'-DP	94
	LSP de alteração	69
	DSP controle	14
C	DSP 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	93
	DSP de alteração	79
	LSP controle	5
D	LSP 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	83
	LSP de alteração	78

em que "DSP" = pulverização no escuro e "LSP" = pulverização à luz. As pulverizações à luz foram tão eficazes a provocar a morte larval como as pulverizações no escuro. Estes resultados foram por sua vez muito semelhantes aos dos tratamentos herbicidas fotodinâmicos no escuro e à luz apresentados na patente norte-americana Número de Série 895.529.



1

EXEMPLO XII

1,10-Fenantrolina como um Inibidor/Intensificador

5

10

15

Para determinar se os produtos químicos que apresentaram propriedades indutoras ou intensificadoras apresentariam propriedades semelhantes em insectos, foi examinado o efeito sobre acumulação em T. ni de vários intensificadores e indutores de acumulação de tetrapirrole em plnatas conhecidas. As larvas T. ni na terceira instar foram pulverizadas com uma solução de 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA como descrito no Exemplo III para ALA + 2,2'-DP. As larvas de controle e as larvas tratadas foram trabalhadas e analisadas como descrito no Exemplo II. Os resultados destas experiências são apresentados na Tabela XIV:

TABELA XIV

Efeitos Sinérgicos de ALA + 1,10-PA ao Provar Acumulação Proto e Zn-Proto e a Morte Larval em T. ni

20

Ex- peri- ência	#	Tratamento	nMoles/100 mg proteína		Morte Larval passa dos 3 dias na estufa (%)
			Teor de Proto	Teor de Zn-Proto	
A	1	Controle	0,19	0	0
	2	40 mM ALA	3,18	0	16,8
	3	30 mM 1,10-PA	35,26	4,45	69,6
	4	40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	151,92	3,75	93
B	1	Controle	0	0	6,1
	2	40 mM ALA	2,08	0	5,3
	3	30 mM 1,10-PA	18,55	1,08	74,7
	4	40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	227,77	6,15	93,3
Coeficiente de correlação			0,78 ^a	0,862 ^b	
Nível de significância			5%	1%	

25

30

^aCorrelação entre morte larval e acumulação Proto

^bCorrelação entre morte larval e acumulação Zn-Proto.

35

01134 W 1989

1

Como foi observado com 2,2'-DP (Tabela VIII), o 1,10-PA apresentou propriedades muito fortes de indução-intensificação de tetrapirrole, como é mostrado pelo muito forte sinergismo em acumulação Proto que foi observada quando ALA e 1,10-PA foram utilizados conjuntamente.

5

10

Além disso, para a acumulação maciça de Proto, o tratamento com 1,10-PA na presença ou na ausência de ALA, resultou na formação de quantidades mais pequenas de Zn-Proto. A correlação entre a acumulação Zn-Proto e a morte larval foi altamente significativa. Isto, por sua vez, sugeriu que a formação de Zn-Proto estava de algum modo fortemente relacionada com a morte larval.

15

20

Outras experiências foram designadas para determinar se o Zn-Proto foi de facto formado enzimaticamente ou não. Por exemplo, a adição de 1,10-PA a Proto dissolvidos em acetona a 80% não resultou na formação de Zn-Proto depois de 17 horas de incubação. Noutras experiências, larvas T. ni vivas e mortas foram tratadas com 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA exactamente como descrito na Tabela XIV. As larvas vivas foram mortas por fervura em água a 100°C durante 5 minutos antes da pulverização. Os resultados estão apresentados na Tabela XV:

25

TABELA XV

Efeito do tratamento com ALA + 1,10-PA sobre Zn-Proto e Acumulação do Proto em Larvas T. ni vivas contra as mortas

30

Ex- peri- ência	≠ Tratamento	nMoles/100 mg proteína		Morte Larval pas- sados 3 dias na estufa (%)
		Teor de Proto	Teor de Zn-Proto	
	1 Controle	0,	0	0
	2 Larvas mortas tratadas com			
A	40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	0	0	-

35

13 JAN 1998

TABELA XV (Continuação)

Efeito do tratamento com ALA + 1,10-PA sobre Zn-Proto e Acumulação do Proto em Larvas T. ni vivas contra as mortas

Ex- peri- ência	Tratamento	nMoles/100 mg proteína		Morte Larval pas- sados 3 dias na estufa (%)
		Teor de Proto	Teor de Zn-Proto	
3	Larvas vivas tratadas com 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	242,7	3,25	93,4
1	Controle	0,11	0	0
2	Larvas mortas tratadas com 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	0	0	-
3	Larvas vivas tratadas com 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	251,23	4,43	100

Como está apresentado, apenas insectos vivos com metabolismos activos foram capazes de acumular Proto e Zn-Proto. O conjunto destes resultados indica fortemente que a formação de Proto e Zn-Proto pelos insectos tratados foi uma consequência da actividade enzimática.

EXEMPLO XIII

Administração do Tratamento ALA + 1,10-PA na Dieta

Sob certas condições de campo é por vezes preferível administrar um insecticida como um engodo em vez de como uma pulverização. As seguintes experiências foram portanto concebidas para demonstrar a eficácia de insecticidas porfíricos quando administrados como engodo.

1
5
10
15
20
25
30
35

mero de mortes ocorrendo durante os primeiros 2 minutos à luz.

Noutra experiência, o ALA e 1,10-PA foram incorporados na dieta a uma velocidade de 16 a 12 mM respectivamente. A dieta foi misturada com o ALA e 1,10-PA num misturador a 37°C durante 5 minutos. As larvas foram colocadas na dieta engodada durante 17 horas no escuro antes de serem expostas à luz. Os resultados estão apresentados na Tabela VII:

TABELA XVII

Efeito da Adição de ALA + 1,10-PA à Dieta na Morte Larval de T. ni

# Tratamento	Morte Larval dentro dos primeiros 8 minutos à luz (%)	Morte Larval passados 3 dias na estufa (%)
1 Control	0	4
2 Dieta contendo 16 mM ALA + 12 mM 1,10-PA	91,9	100

Noutra experiência, a dieta foi aquecida num forno de convecção e o ALA e 1,10-PA foram adicionados à dieta aquecida a 57°C. A mistura foi então amalgamada durante 45 segundos num Sorval Omnimixer (Omni Co. International, CT 06706). Os resultados são apresentados na Tabela XVIII:

TABELA XVIII

Efeito da Adição de ALA + 1,10-PA à Dieta na Morte Larval de T. ni

#	Tratamento	Morte Larval dentro dos primeiros 8 minutos à luz (%)	Morte Larval passados 3 dias na estufa (%)
1	Controle	0	14,5
2	Dieta contendo 16 mM ALA	0	5,2
3	Dieta contendo 12 mM 1,10-PA	0	40,4
4	Dieta contendo 16 mM ALA + 12 mM 1,10-PA	94,4	94,4

EXEMPLO XIVAdministração de Indutores e/ou Intensificadores Alternativos

O meio de Waldbauer foi aquecido num forno de convecção a 57-65°C e combinado com 4 mM de ALA e 3 mM de um dos vários compostos de teste. A mistura foi então combinada durante 2 minutos num Omnimixer Sorval.

Larvas T. ni foram colocadas com a dieta tratada no escuro durante 17 horas como acima. A morte das larvas foi determinada ao fim do período de escuridão (antes da exposição à luz) e depois de três dias na estufa.

Um controle que consiste em dieta em branco (não tratada) foi passado por cada composto testado.

Os resultados são apresentados na Tabela XIX:

[Handwritten signature]
13 JAN 1988

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA XIX

Efeito de ALA + Vários Indutores e/ou Intensificadores Alternativos na Dieta sobre a Morte de T. ni Larval

	Controle	Morte Larval ao fim do período no escuro (%)	Morte larval pas-sados 3 dias na estufa (%)
1,10-fenantrolina	0	0	100
4,7-dimetil-1,10-fenantrolina	0	0	100
4-metil-1,10-fenantrolina	0	0	99
5-nitro-1,10-fenantrolina	0	0	99
5-metil-1,10-fenantrolina	0	0	97
5,6-dimetil-1,10-fenantrolina	0	0	97
4,7-difenil-1,10-fenantrolina	0	0	97
5-cloro-1,10-fenantrolina	0	0	96
3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina	0	0	85
2,2'-ditiobis(piridina N-óxido)	0	0	73
4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil	0	0	71
fenil 2-piridil cetoxima	0	0	70
2,2':6,2"-terpiridina	0	0	70

13 5 1968

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA XIX (Continuação)

Efeito de ALA + Vários Indutores e/ou Intensificadores Alternativos na Dieta sobre a

Morte de T. ni Larval

	Controle (%)	Morte Larval ao fim do período no escuro (%)	Morte larval pas-sados 3 dias na estufa (%)
4,7-dihidróxi-1,10-fenantrolina	0	0	49
ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina niflúmico	0	0	39
monohidrato de brometo de N-nicoti-nocotinamida dimídio	0	0	35
ácido nicotínico	0	0	34
Brometo de etídio	0	0	24
fenantreno	0	0	22
nicotinato de etilo	0	0	16
ácido 3-hidroxipicolínico	0	0	13
ácido batocuproinodissulfônico	0	0	9
ácido 2-hidroxinicotínico	0	0	9
ácido 4-hidróxi-7-metil-1,8-naftiri-dino-3-carboxílico	0	0	8
ácido 1-isoquinolina carboxílico	0	0	8

MMA
3 JAN 1969

35 30 25 20 15 10 5 1

TABELA XIX (Continuação)

Efeito de ALA + Vários Indutores e/ou Intensificadores Alternativos na Dieta sobre a Morte de T. ni Larval

	Controle (%)	Morte Larval ao fim do período no escuro (%)	Morte larval pas-sados 3 dias na estufa (%)
ácido picolínico	0	0	5
ácido 2-hidroxi-6-metilpiridina-3-carboxílico	0	0	4
N-metilnicotinamida	0	0	4
Monohidrato de dicloreto de benzilviologeno	0	0	0
1,1-difenil-4,4'-bipiridínio dibrometo	0	0	0
ácido 4-hidroxi-7-trifluorometil-3-quinolina carboxílico	0	3	16
dicarboxilato de dietil-3,4-piridina	0	3	11
nicotinato de metilo	0	1	9

= 59 =



1

70°C, depois foi adicionado abd à mistura resultante a partir da fase (2) acima.

5

4. A mistura resultante da fase (3) acima foi deixada arrefecer até 40°C e foram adicionados 18 g de ácido ascórbico como um retardador de oxidação.

10

5. A mistura resultante foi homogeneizada e armazenada para utilização como dieta padrão.

15

A dieta tratada foi preparada dissolvendo uma quantidade apropriada(s) de ingrediente(s) activo(s) em etanol e adicionando 1 ml desta solução a 9 ml de água desmineralizada. Todos os 10 ml da solução etanol:água (1:9 v/v) resultante contendo a quantidade(s) apropriada(s) de ingrediente(s) activo(s) foram então adicionados à mistura resultante da fase (3) acima, antes da adição de ácido ascórbico.

20

Colónias de M. brassicae foram criadas em massa sobre dieta padrão (não tratada). À medida que as larvas se aproximavam da terceira instar, porções de 20 larvas cada foram desviadas da dieta padrão para várias dietas de teste contendo ingrediente(s) activo(s). Os discos foram cobertos com folha de alumínio e as larvas foram deixadas alimentar-se sobre a dieta de teste ad libitum durante um período no escuro de 16 horas. Depois a folha foi removida e as larvas foram expostas a luz artificial (lâmpada de vapor de Mercúrio de 400 watts a 50 cm). Os controles foram alimentados com dieta não tratada. Os resultados estão indicados na Tabela XX:

30

35

13 JAN 1999

TABELA XX

Efeito de ALA e 1,10-Fenantrolina sobre Larvas de
M. brassicae

	Antes da exposi ção à luz	Depois da exposição à luz durante 2 minutos
16 mM ALA + 12 mM 1,10-fenantrolina	0	100
2 mM ALA + 1,5 mM 1,10-fenantrolina	0	100
Controle	0	0

O efeito da exposição à luz é dramático: ime-
diatamente depois da exposição, os insectos tratados começa-
ram a torcer-se e morreram. 100% dos insectos tratados es-
tavam mortos num espaço de dois minutos. Esta experiência
foi repetida três vezes com resultados idênticos.

EXEMPLO XVI

Efeito de ALA e 6-Aminonicotinamida sobre Blatella
germanica adultos

O efeito de insecticida ingerido compreenden-
do ALA e 2-aminonicotinamida foi testado sobre a peste do-
méstica Blatella germanica (barata germânica).

A dieta padrão compreendeu uma mistura de
grãos triturados (milho, trigo, arroz e farelo), açúcar de
cana, proteína de soja, ovos, extracto de erva doce, ali-
mento completo para ratos de laboratório, e água desminera-
lizada.

O alimento tratado foi preparado dissolvendo

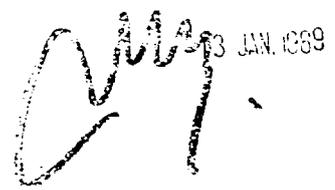
1 quantidade apropriada de ingredientes activo(s) em etanol,
 combinando uma parte desta solução de etanol com 19 partes
 de água, e adicionando 1 ml de solução resultante a 5 g de
 5 alimento. O alimento foi deixado secar antes de ser utiliza-
 do.

Colónias de B. germanica foram desenvolvidas
 em massa sobre dieta padrão (não tratada) até à fase adulta.
 Num princípio de tarde em Novembro, em Marselha, França,
 dez machos adultos foram colocados em cada um dos discos de
 10 Petrie juntamente com 5 g de uma das dietas de teste. Os dis-
 cos foram deixados assentar sobre o topo da bancada, recebe-
 ndo a luz do dia), durante o resto do dia (cerca de 3,5 ho-
 ras). Os discos foram depois deixados assentar sob condições
 15 ambientes normais (luz e temperatura ambiente) durante qua-
 tro dias para simular as condições domésticas normais. Os
 mesmos foram expostos à escuridão natural durante, cada noi-
 te, 13 horas e à luz ambiente durante cerca de 11 horas cada
 dia. Um quarto disco de controles foi alimentado com dieta
 padrão (não tratada). As contagens de mortalidade foram con-
 20 duzidas em cada tarde. Os resultados estão indicados na Ta-
 bela XXI:

TABELA XXI

Efeito de ALA e 6-Aminomicotinato sobre B.
germanica Adultas

Ingrediente activo	Concen- tração (mg/g de alimento)	% de Mortalidade			
		Dias de Exposição			
		1	2	3	4
Controle	0	0	0	0	0
ALA	1	0	0	0	0
6-Aminonicotinato	1	0	0	0	0
ALA + 6-Aminonicotinato	1 + 1	50	70	90	100

A handwritten signature in dark ink is located in the top right corner. To its right is a date stamp that reads "JAN. 1969".

1

Estes resultados mostram claramente que o 6-aminonicotinato é um indutor e/ou intensificador de ALA, e as composições insecticidas do presente invento podem ser eficazes contra insectos sob condições normais no interior de luz e escuridão ambientes.

5

10

A indução química das larvas de insecto para Proto e Zn-Proto acumulados que provocam a morte larval no escuro e à luz do dia proporciona novas composições e métodos insecticidas. Propõe-se a expressão "insecticidas porfíricos" para referir este fenómeno. À luz o Proto e Zn-Proto acumulados desaparecem dos tecidos dos insectos dentro de horas. Esta aproximação é semelhante à concepção dos herbicidas fotodinâmicos apresentada na patente norte-americana No. de Série 895.529. Todavia, o dano nas plantas tratadas com os referidos herbicidas ocorreu apenas à luz do dia e foi apenas de natureza fotodinâmica. Além disso, os tetrapirroles que mais danificaram foram Mg-tetrapirroles que pertenciam ao caminho biosintético Chl.

15

20

Crê-se que o ramo Mg do caminho biosintético de tetrapirrole que conduz à biosíntese de Chl não é funcional em insectos. Como consequência a biosíntese de intermediários contendo Mg do caminho biosintético Chl não pode ser detectada em T. ni tratadas com ALA ou com ALA + + 2,2'-DP. Portanto, os pigmentos de clorofila que dão às larvas a sua cor verde amarelado são muito provavelmente derivados de pigmentos de clorofila da dieta (Tabelas II, III, IV). Todos os insectos, contudo, devem conter citocromas que actuam como veículos de electrões em fosforilação oxidativa. Crê-se presentemente que a metade heme de citocromas é formada a partir de Proto que é sintetizada por sua vez a partir de ALA através do caminho biosintético de porfirina [Flowchart A acima]. A acumulação dependente de ALA de Proto por Ti. ni é completamente compatível com esta hipótese.

25

30

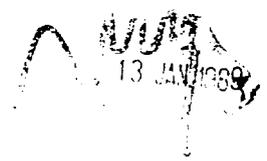
35

Ao contrário do que foi observado em plan-

13 JAN 1963

1 tas a acumulação no escuro de Proto em T. ni é acompanhada
pela morte larval no escuro (Tabela VII). À luz, uma forma-
ção maciça de Proto não parece ser obrigatória, todavia,
5 para a ocorrência de dano fotodinâmico (Tabelas VII, XIII).
Esta conclusão é baseada em duas observações: (a) à luz, a
acumulação maciça de Proto não é observada, provavelmente
como uma consequência do estado uniforme de foto-destruição
do Proto biosintetizado (Tabela VII), e (b) pulverizações à
10 luz (que não envolvem um período de incubação pós-pulveriza-
ção durante o qual o Proto se pode acumular) foram tão efi-
cazes em provocar a morte larval como as pulverizações no
escuro que não incluíam um tal período de incubação no es-
curo pós-pulverização antes da exposição à luz (Tabela XIII).
Em todos os casos estes resultados sugerem que o que é neces-
15 sário para a ocorrência de dano fotodinâmico em insectos tra-
tados é uma formação de estado uniforme de pequenas quanti-
dades de Proto em proporções suficientemente grandes para
iniciar as reacções em cadeia de danificação de radical li-
vre.

20 Um dos maiores problemas em relação à in-
dústria dos insecticidas é a alarmante velocidade à qual os
insectos desenvolvem resistência contra os insecticidas. Isto
é normalmente uma consequência de mutações que podem aumen-
tar os mecanismos de desintoxicação dos insectos ou altera-
25 ção das propriedades liofílicas da toxana, reduzindo assim
a sua permeabilidade de membrana. Isto por sua vez encurta
consideravelmente o tempo de vida útil de insecticidas re-
centemente introduzidos e reduz o seu valor comercial. Crê-
-se que visto que a modulação química do caminho porfirina-
30 -heme de acordo com o presente invento parece envolver mais
que uma fase metabólica, será mais difícil para os insectos
desenvolver resistência contra insecticidas porfíricos. Mes-
mo se alguns insectos tiverem êxito em desenvolver contra a
acumulação de tetrapirrolepor desenvolvimento de meios para
35 rapidamente destruírem os tetra-pirroles acumulados, isto



13 JAN 1989

1 não é suficiente para proteger os insectos mutados contra o
dano fotodinâmico à luz. Como é sugerido pelas Tabelas VII e
XIII, à luz o Proto é mais provavelmente destruído quase tão
5 rapidamente como é formado; ainda, tal acumulação mínima é
suficiente para provocar o dano fotodinâmico extensivo às
larvas. Ainda, uma mutação que bloqueia o Proto e a biosín-
tese de citocroma em conjunto seriam analogamente mais le-
tais.

10 Outros exemplos de composições e aplicações
dentro do espírito e âmbito do presente invento tornar-se-ão
evidentes para os entendidos nesta técnica tendo em consi-
deração o que antecede e conseqüentemente apenas tais limi-
tações como aparecem nas reivindicações anexas deverão ser
15 colocadas ao mesmo.

O depósito do primeiro pedido para o inven-
to acima descrito foi efectuado nos Estados Unidos da Amé-
rica em 13 de Janeiro de 1988 sob o Nº 144 883.

MAY 1989

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1
5
10
15
20
25
30
35

1ª - Processo para a preparação de uma com posição insecticida, caracterizado por se incorporar uma quantidade eficaz como insecticida de um ou mais compostos que consistem em ácido delta-aminolevulínico, indutores de ácido delta-aminolevulínico, ou intensificadores da conversão de ácido delta-aminolevulínico em tetrapirroles.

2ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se incorporar ácido delta-aminolevulínico.

3ª - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por compreender um ou mais indutores de ácido delta-aminolevulínico.

4ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado por se incorporar um ou mais in tensificadores de conversão de ácido delta-aminolevulínico em tetrapirroles.

5ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a quantidade dos referidos compostos ser suficiente para fornecer de 113,4 a 907,2 g (0,25 a 2 libras) de ácido delta-aminolevulínico por 4.046,84 m² (1 acre) e/ou de 45,6 a 680,85 g (0,1 a 1,5 libras) de indutor ou intensificador por 4,0,46,84 m² (1 acre).

6ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se incorporar um ou mais dos seguintes: veículo(s), dissolvente(s), tampão(ões), agente(s) de humedecimento, agente(s) de dispersão, agente(s) de eliminação de espuma, emético(s) agente(s) contra cheiros, penetrante(s), agente(s) tensioactivo(s), emulsionante(s), adjuvante(s), herbicida(s) e um ou mais de outros insecticida(s).

1 7ª - Processo de acordo com a reivindica-
ção 6, caracterizado por os referidos compostos estarem con-
tidos numa solução que tem uma concentração de cerca de 2 a
cerca de 50 mM de ácido delta-aminolevulínico e/ou de cerca
5 de 0,1 a cerca de 50 mM de indutor ou intensificador.

8ª - Processo de acordo com a reivindica-
ção 6, caracterizado por os referidos compostos estarem con-
tidos numa preparação a ser ingerida por insectos e a quanti-
dade dos referidos compostos ser suficiente para fornecer de
10 cerca de 10 ng a cerca de 5 ng de ácido delta-aminolevulíni-
co por mg de peso do corpo do insecto e/ou de cerca de 1 ng
a cerca de 5 microgramas de indutor ou intensificador por mg
de peso do corpo do insecto.

15 9ª - Processo de acordo com qualquer uma
das reivindicações anteriores, caracterizado por a referida
composição compreender um ou mais compostos que consistem em
ácido delta-aminolevulínico; 2,2'-dipiridilo; 1,10-fenantro-
lina; 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina; 4-metil-1,10-fenantroli-
na; 5-nitro-1,10-fenantrolina; 5-metil-1,10-fenantrolina;
20 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina; 4,7-difenil-1,10-fenantroli-
na; 5-cloro-1,10-fenantrolina; 3,4,7,8-tetra-metil-1,10fenan-
trolina; 2,2'-ditiobis(piridina N-óxido); 4,4'-dimetil-2,2'-
-dipiridil; fenil 2-piridil cetoxima, e 2,2':6',2"-terpiri-
dina.

25 10ª - Processo para a preparação de uma
composição insecticida de acordo com as reivindicações ante-
riores, caracterizado por se formular a referida composição
de modo a incluir uma quantidade eficaz como insecticida de
30 um ou mais compostos que consistem em ácido delta-aminolevu-
línico, indutores de ácido delta-aminolevulínico, ou intensi-
ficadores da conversão de ácido delta-aminolevulínico em te-
trapirroles.

35 11ª - Processo de acordo com a reivindica-
ção 10, caracterizado por se utilizar ácido delta-aminolevu-



1 línico.

5 12ª - Processo de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado por compreender a utilização de um ou mais indutores de ácido delta-aminolevulínico.

10 13ª - Processo de acordo com a reivindicação 10, 11 ou 12, caracterizado por se utilizar um ou mais intensificadores da conversão de ácido delta-aminolevulínico em tetrapirroles.

15 14ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 10 a 13, caracterizado por a quantidade dos referidos compostos ser suficiente para fornecer cerca de 113,4 a 907,2 g (0,25 a 2 libras) de ácido delta-aminolevulínico por 4.046,84 m² (1 acre) e/ou de cerca de 45,6 a 680,85 g (0,1 a 1,5 libras) de indutor ou intensificador por 4.046,84 m² (1 acre).

20 15ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 10 a 14, caracterizado por se incorporar um ou mais dos seguintes: veículo(s), dissolvente(s), tampão(ões), agente(s) de humedecimento, agente(s) de dispersão, agente(s) de eliminação de espuma, emético(s), agente(s) contra cheiros, penetrante(s), agente(s) tensioativo(s), emulsionante(s), adjuvante(s), herbicida(s) e um ou mais de outros insecticida(s).

25 16ª - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por os referidos compostos estarem incluídos numa solução que tem uma concentração de cerca de 2 a cerca de 50 mM de ácido delta-aminolevulínico e/ou de cerca de 0,1 a cerca de 50 mM de indutor ou intensificador.

30 17ª - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por os referidos compostos estarem incluídos numa preparação a ser ingerida por insectos e a quantidade dos referidos compostos ser suficiente para fornecer
35 cerca de 10 ng a cerca de 5 ng de ácido delta-aminolevulíni-



1 co por mg de peso de corpo de insecto e/ou de cerca de 1 ng
a cerca de 5 microgramas de indutor ou intensificador por
mg de peso do corpo do insecto.

5 18ª - Processo para induzir a acumulação
de tetrapirroles em insectos vivos, caracterizado por se pôr
em contacto os referidos insectos com uma composição obtida
pelo processo de acordo com qualquer uma das reivindicações
1 a 9.

10 19ª - Processo para exterminar insectos,
caracterizado por se pôr em contacto os referidos insectos
com uma composição obtida pelo processo de acordo com uma
das reivindicações 1 a 9.

15 20ª - Processo de acordo com a reivindica-
ção 19, caracterizado por os referidos insectos tratados se-
rem expostos à escuridão durante cerca de 1 a 8 horas e de-
pois expostos à luz.

20 21ª - Processo de acordo com a reivindica-
ção 20, caracterizado por a referida luz compreender a luz
natural do dia.

22ª - Processo de acordo com a reivindica-
ção 19 ou 20, caracterizado por a referida exposição à luz
ser efectuada durante um período de cerca de 1 a 14 dias.

25 23ª - Processo de acordo com as reivindica-
ções 10, 18 ou 19, caracterizado por compreender a utiliza-
ção de um ou mais compostos que consistem em ácido delta-ami-
nolevulínico; 2,2'-dipiridilo; 1,10-fenantrolina; 4,7-dime-
til-1,10-fenantrolina; 4-metil-1,10-fenantrolina, 5-nitro-
30 -1,10-fenantrolina; 5-metil-1,10-fenantrolina; 5,6-dimetil-

60.568

Case UI-1910

1

-1,10-fenantrolina; 2,2'-ditiobis(piridina N-óxido); 4,4'-
-dimetil-2,2'-dipiridil; fenil 2-piridil cetoxima, e 2,2':
:6',2"-terpiridina.

5

Lisboa, 13 JAN. 1969

10

Por THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS

ml AGENTE OFICIAL



15

VASCO MARQUES LEITE
Agente Oficial
da Propriedade Industrial
Centro-Arco da Conceição, 3, 1.º-1100 LISBOA

20

25

30

35

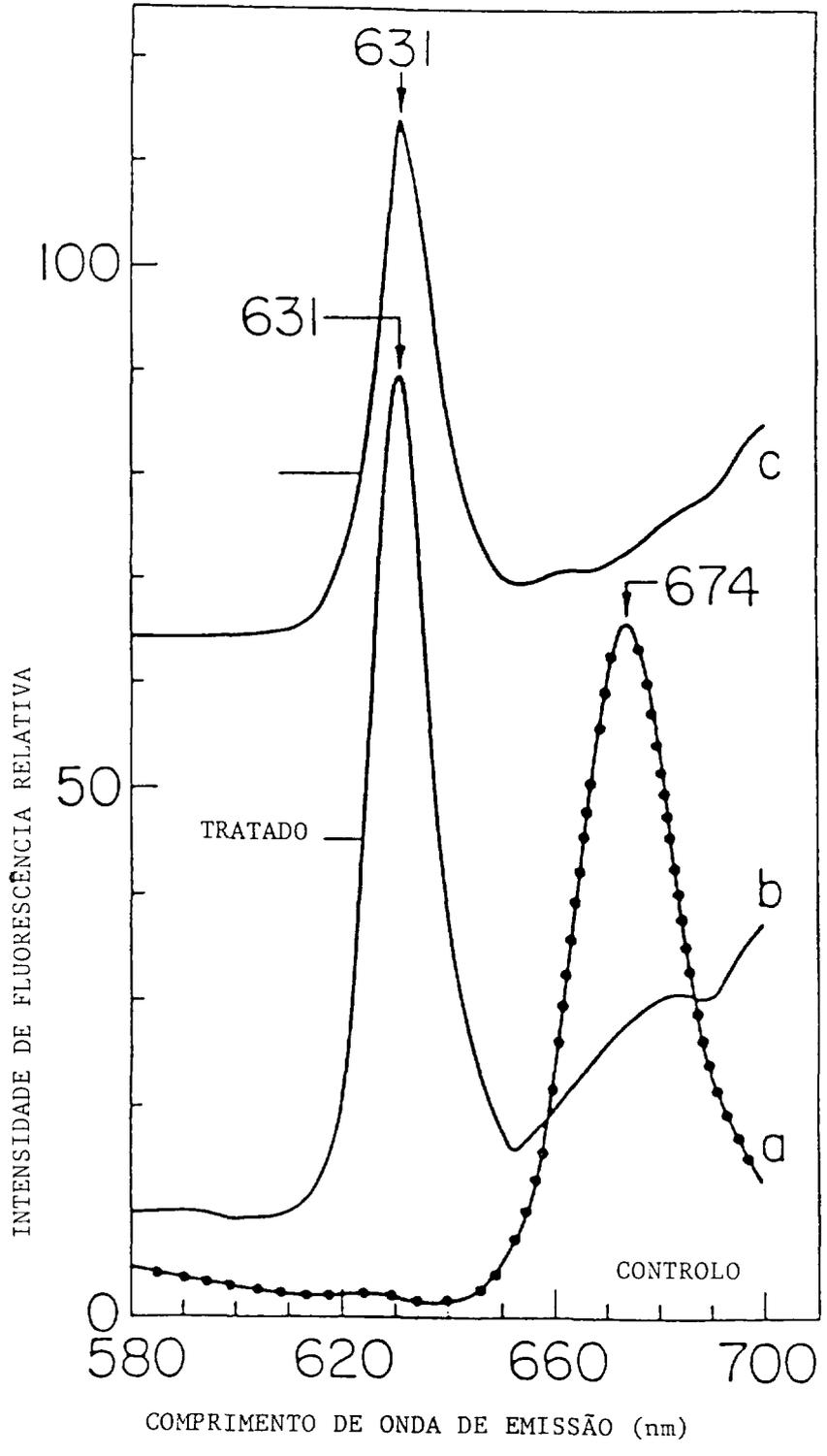


FIG. 1

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

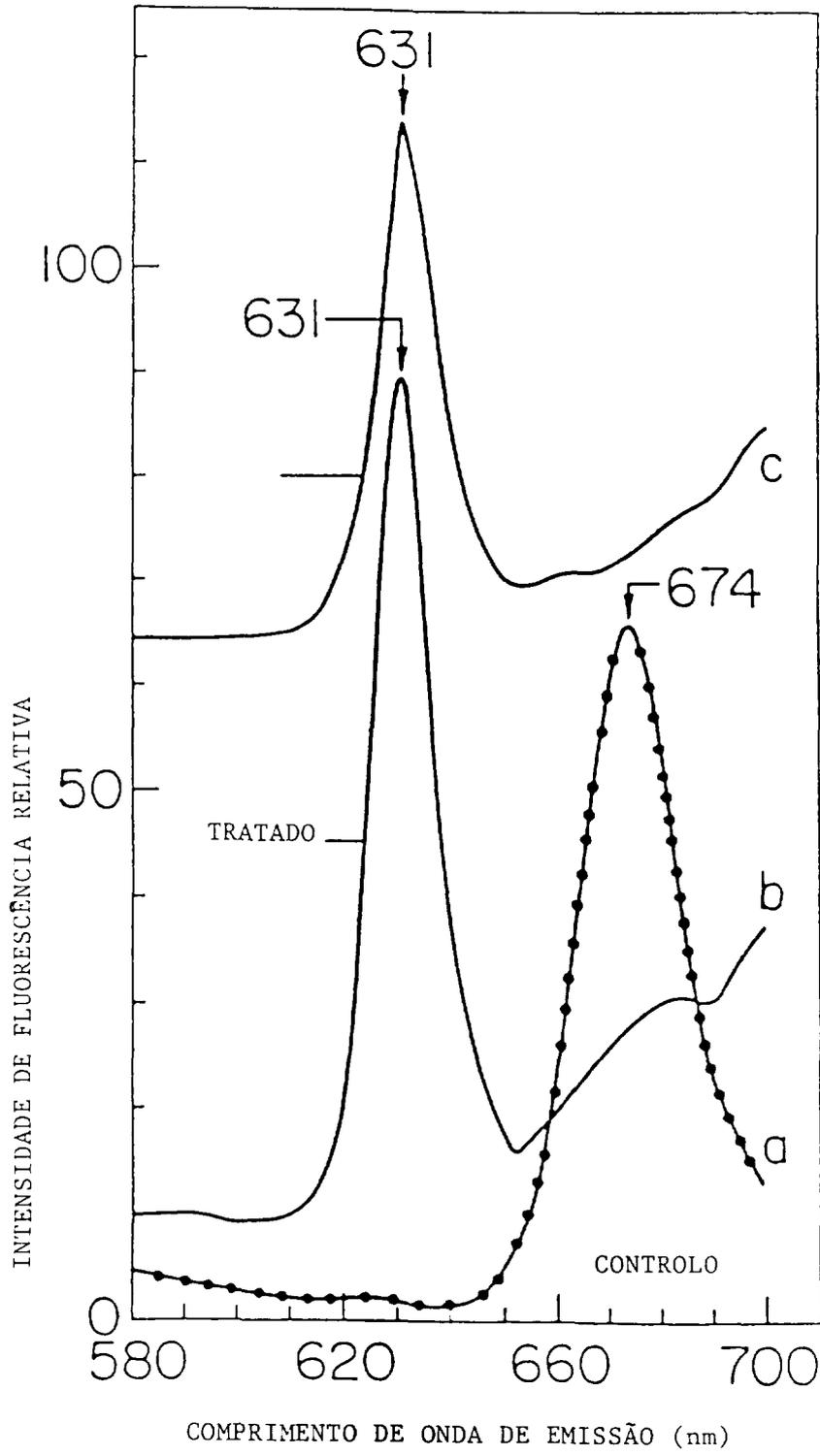


FIG. 1