



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021024799-1 A2

(22) Data do Depósito: 08/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
20/06/2023

(54) Título: ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE AGAVE SISALANA (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA, SEU USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO

(51) Int. Cl.: A01N 65/40; A01N 25/26; A01P 7/02.

(52) CPC: A01N 65/40; A01N 25/26; A01P 7/02.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): LUCINÉIA DOS SANTOS; ALICE DE ESTEFANI; DANIEL JUNIOR DE ANDRADE.

(57) Resumo: ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE Agave sisalana (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA, SEU USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO. A presente invenção se refere a um acaricida agrícola eficiente e de grande apelo econômico, à base do suco seco da mucilagem de Agave sisalana, para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros, Brevipalpus yotheresi, obtido a partir de um processo de baixo impacto ambiental de encapsulamento do suco fermentado e seco do sisal em quitosana, possibilitando a conversão de um passivo ambiental em ativo de alto valor agregado, contribuindo, ainda, positivamente para melhora da qualidade de vida das pessoas que dependem do sisal para sua subsistência. Portanto, a presente invenção, viabilizou o desenvolvimento de uma composição acaricida eficaz, estável e de menor impacto ambiental, quando comparado às atuais alternativas para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros, B. yotheresi.



ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA, SEU USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO

BREVE DESCRIÇÃO

[001] Trata a presente solicitação de patente de invenção de um “**ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA, SEU USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO**”, que se refere a uma formulação mais eficiente e com maior apelo econômico no controle do ácaro-vetor da leprose dos citros *B. yothersi* a partir da aplicação da técnica de encapsulamento em quitosana do suco fermentado e seco, obtido a partir da mucilagem descartada do sisal (*Agave sisalana*), um resíduo agroindustrial abundante e de fonte natural e renovável, por meio de processo de baixo impacto ambiental, possibilitando a transformação de um passivo ambiental em um produto de alto valor agregado e que ainda incentiva o cultivo da *A. sisalana* no semiárido nordestino, se garantindo como fator de fixação na região e fonte de renda para a população local.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à seção de necessidades humanas ao campo de agricultura, mais especificamente, ao campo de atividade de compostos químicos ou preparações biocidas, por se referir a um acaricida de uso agrícola que compreende suco fermentado e seco da mucilagem de *Agave sisalana* encapsulamento em quitosana, para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros *B. yothersi*, obtido a partir de um processo de baixo impacto ambiental.

CONVENCIMENTO

[003] A citricultura é um dos setores mais tradicionais do agronegócio brasileiro e possui elevada importância econômica. A laranja foi destaque em 2017 dentre a produção nacional de frutíferas, adicionando R\$8,5 bilhões à economia nacional. Nesse mesmo ano, a produção brasileira correspondeu a 34% da laranja e mais da metade do suco da fruta comercializados em todo o mundo, de acordo com o Departamento de Agricultura

dos EUA (USDA). No entanto, a produção nacional enfrenta problemas com a fitossanidade da cultura, podendo afetar a produtividade e a qualidade de forma significativa, em especial, destacam-se os fitopatógenos transmitidos por vetores tais como ácaros e insetos, tanto pela dificuldade de controle quanto pelos elevados custos financeiros e ambientais demandados para o controle eficaz.

[004] Dentre os fitopatógenos de maior importância destaca-se o *Citrus leprosis virus* - CiLV, que causa a principal doença viral da citricultura: a leprose dos citros. Essa doença afeta a produção brasileira levando a prejuízos nos pomares e elevando os custos de produção. O vírus é transmitido por espécies de ácaros *Brevipalpis sp.*, principalmente, por *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae), causando a leprose dos citros, a qual, a depender da severidade dos danos, pode causar reduções drásticas na produção. Além disso, ainda há um aumento bastante significativo nos custos de controle do vetor e da doença, recuperação de árvores e renovação dos pomares.

[005] Na citricultura brasileira, são estimados gastos acima de US\$60 milhões por ano somente com a leprose, valores destinados aos acaricidas utilizados. A doença encontra-se disseminada pelo estado de São Paulo e, somente nesse estado, encontram-se 9 dos 10 maiores produtores de laranja brasileiros, sendo o detentor da maior área colhida de laranja do país com 402,9 mil hectares. Além disso, 90% das variedades plantadas no estado de São Paulo são suscetíveis à doença, sendo, portanto, a leprose dos citros a doença viral de maior importância econômica para a citricultura paulista.

[006] A leprose dos citros é a principal doença viral que afeta a produção brasileira de laranjas, levando à redução significativa da produtividade e ao aumento de custos. Atualmente, o combate à leprose é feito pelo controle dos ácaros-vetores da espécie *Brevipalpus sp.* por meio do uso de acaricidas sintéticos. Contudo, destacam-se os perigos desses produtos para a saúde humana e do ambiente, bem como para o aumento da resistência do vetor. Em consonância com as demandas por inovações tecnológicas sustentáveis na área de defensivos agrícolas, pesquisas anteriores, realizadas pelo grupo que desenvolveu a presente tecnologia, demonstraram a eficácia do suco da mucilagem seca da *Agave sisalana* no controle desses ácaros.

[007] O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de fibras de sisal (*Agave sisalana*), sendo cultivado na região Nordeste, com predomínio na Bahia, em áreas de pequenos produtores. Seu cultivo constitui fonte de renda e emprego, possibilitando a fixação da população na região do semiárido nordestino. No entanto, o cultivo do sisal passa por um período de declínio e desvalorização, em razão da concorrência com as fibras sintéticas, que são mais baratas, e ao baixo nível de aproveitamento da planta: a fibra dura corresponde somente a 5% do peso da folha do sisal, sendo o restante descartado como mucilagem, resíduo composto de frações sólidas e líquidas, gerado durante o processo de separação das fibras. Nesse sentido, o desenvolvimento de produtores com o resíduo do sisal pode promover a reiteração do valor social e econômico da espécie.

[008] A partir da continuidade das pesquisas do grupo, foi possível o desenvolvimento de um acaricida natural a partir do suco do resíduo do sisal, por meio do uso de tecnologias que garantiram sua estabilidade e aplicabilidade, com capacidade de inserção no mercado e eficácia garantida. Neste contexto, foi desenvolvido, por meio do encapsulamento do suco fermentado e seco da mucilagem de *Agave sisalana* em quitosana contra o ácaro-vetor da leprose dos citros *Brevipalpus yothersi*.

[009] O suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana, por ter origem na mucilagem descartada, a qual é pouco envolvida em produtos, possui grande variedade de metabólitos secundários, sendo destaque o conteúdo de saponinas, presumivelmente associado a sua ação acaricida, juntamente de menores doses de taninos e, além de ter potencial acaricida, ainda incentiva o cultivo da *Agave sisalana* no semiárido nordestino, se garantindo como fator de fixação na região e fonte de renda para a população local.

[010] As saponinas possuem amplo espectro de atuação biológica, como atividade antimicrobiana, anti-herbívoros e citotóxica (OSBOURN, *et al.*, 2011: *The saponins polar isoprenoids with important and diverse biological activities Natural product reports*). Já os taninos, são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e vegetais, que se tornam impalatáveis a predadores. Essa ação de defesa, se estende a muitos microrganismos, sendo observado que cultivares com altos teores de taninos são mais resistentes a pragas (Monteiro *et al.*, 2005: Taninos uma abordagem da química à ecologia). Dessa forma, infere-se que, a capacidade acaricida do extrato empregado está

diretamente associada ao seu alto conteúdo de saponinas em sinergia com as menores concentrações de taninos.

[011] Tendo em vista que, o cultivo de citros é destaque da economia nacional e também para a economia paulista e que, a doença da leprose dos citros é um expoente sem solução ambientalmente atrativa e eficaz até o momento e com capacidade de gerar um aumento massivo de custos com agrotóxicos na cultura, a presente invenção, visando solucionar esse importante problema técnico, disponibiliza uma formulação mais eficiente e com maior apelo econômico no controle do ácaro-vetor da leprose dos citros *B. yothersi* a partir da aplicação da técnica de encapsulamento em quitosana do extrato presente no suco fermentado e seco do sisal.

[012] Assim, a presente invenção, ao disponibilizar o ativo encapsulado, possibilita maior estabilidade da formulação, liberação mais assertiva e controlada, além de uma maior proteção do composto. Na área da fitossanidade, essa tecnologia possibilita a liberação controlada de agrotóxicos, redução da frequência de aplicação, maior segurança de aplicação e redução de riscos para o meio ambiente, sendo assim, desenvolvido o acaricida agrícola a partir do suco, o resíduo líquido do sisal, fermentado ao sol, seco e encapsulado em quitosana.

[013] O papel de destaque do agronegócio no Brasil implica em uma crescente dependência de insumos importados, dentre esses, os agrotóxicos são cada vez mais utilizados, tanto em volume, como em quantidade de ingrediente ativo/área. O consumo brasileiro é equivalente a cerca de 20% de todos os agrotóxicos produzidos no mundo, o que gera imensos problemas ambientais e para a saúde dos organismos. Consequentemente, há uma crescente pressão por parte da sociedade civil pela redução do impacto ambiental e social das atividades agrícolas. Assim, a presente invenção, um acaricida que compreende o suco fermentado e seco do sisal, além de ser uma formulação efetiva que contém apenas ativos vegetais, contra ácaros que atacam as lavouras de citros, resolve o problema técnico relacionado ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas sintéticos nocivos no controle de ácaros-praga em culturas, além de agregar valor ao resíduo do sisal.

[014] O produto pleiteado destacou-se, apresentando 100% de eficiência acaricida contra o *B. yothersi* logo no 1º dia após aplicação, a eficiência do encapsulado em quitosana foi confirmada com a análise do número de ovos de *B. yothersi* depositados no fruto cítrico 7 dias após o início do tratamento, não foram observados ovos, o que demonstra sua importante contribuição ao campo técnico e corrobora com seu caráter inventivo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[015] Atualmente, estão disponíveis no estado da técnica algumas anterioridades que se referem à aplicação de extratos de *Agave sisalana* contra diferentes pragas agrícolas, além de anterioridades que descrevem a obtenção de ativos de interesse a partir do resíduo do sisal e de processos de obtenção e uso de extrato de sisal. No entanto, ainda que a busca por formas de combate a pragas em culturas advindas de fontes vegetais e sustentáveis seja o fator comum às anterioridades, a minoria descreve o emprego de resíduos de sisal, além disso, nenhuma delas antecipa a presente invenção, conforme observado a seguir.

[016] Barrêto e colaboradores (2011) em "Eficiência da aplicação de extratos de Agave sobre o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. *r latifolium* Hutch)", avaliaram a eficiência dos extratos frescos e curtidos de dois genótipos de Agave no controle do ácaro-rajado do algodoeiro e avaliar os efeitos de fitotoxidez dessas aplicações. A partir das análises, foi observada diminuição do número de ácaros vivos com as aplicações dos extratos de Agave, e que a eficiência do extrato curtido do híbrido foi de 100%, o percentual de plantas afetadas foi de 100% quando pulverizadas nas duas faces da folha e a intensidade da fitotoxidez foi de muito leve a leve aos 10 e 35 e forte aos 65 dias após a germinação.

[017] Souza (2009) em sua dissertação, intitulada "Atividade inseticida de extratos obtidos a partir do resíduo líquido de *Agave sisalana* Perrine no controle da praga *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho", teve como objetivo verificar a atividade inseticida de extratos orgânicos obtidos a partir do resíduo líquido de *Agave sisalana* sobre *Spodoptera frugiperda*, para tanto, empregou nos testes

biológicos para a avaliação da atividade inseticida dos extratos orgânicos de *A. sisalana* sobre *S. frugiperda* (hidroetanólico, butanólico, acetato de etila e aquoso), sendo os extratos hidroetanólico e butanólico os mais eficientes sobre o inseto. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos hidroetanólico 2,5 e 5g/100 mL são mais indicadas para um possível uso no controle de pragas no milho por apresentar baixa fitotoxicidade.

[018] A anterioridade BR102016006408A2, intitulada "*Method for obtaining organic substances from sisal residue (Agave sisalana)*", apesar de não se aproximar tanto da presente invenção, é apresentada como estado da técnica por descrever uma sequência de procedimentos fitoquímicos para a obtenção de substâncias úteis a partir do resíduo do sisal. Especificamente, a presente invenção compreende um processo que utiliza o resíduo agroindustrial (resíduo do sisal) como matriz na obtenção de pectina, manitol, ácido succínico, canferol e uma mistura de saponinas.

[019] A anterioridade US3981867A, intitulada "*Process for obtaining sapogenin particularly hecogenin from plant material such as Agave sisalana leaves*", descreve a obtenção de sapogeninas, principalmente, hecogenina, a partir da hidrólise ácida do suco de folhas de sisal, em temperatura e pressão elevadas, sendo a fração de sapogenina recuperada como hecogenina bruta, que constitui um produto de reação insolúvel em água no hidrolisado, sendo este posteriormente purificado por extração com um solvente orgânico apropriado para produzir uma mistura cristalizável de alta qualidade de hecogenina e tigogenina. Da mistura de sapogenina, a hecogenina é separada ainda mais da tigogenina por acetilação e recristalização preferenciais. Ainda que a anterioridade descreva a obtenção de sapogeninas, ela não antecipa o desenvolvimento de um acaricida agrícola, como observado na presente invenção.

[020] A anterioridade BR102017023302A2, intitulada "Fração enriquecida em polissacarídeos obtida a partir do resíduo de *Agave sisalana* em composições cosméticas", também não se aproxima da presente invenção, mas é apresentada como estado da técnica por se referir ao uso de uma fração enriquecida em polissacarídeos obtida a partir do resíduo das folhas de *Agave sisalana* após o desfibramento em composições cosméticas para uso tópico. De acordo com a anterioridade, a fração

enriquecida em polissacarídeos é segura para uso em composições cosméticas e tem ação antioxidante por diferentes mecanismos.

[021] A anterioridade BR 102016015728-5, intitulada "Sabonete líquido antimicrobiano à base de óleo de buriti", apesar de não se aproximar da presente invenção é apresentado como estado da técnica para ilustrar o interesse por antimicrobianos naturais, uma vez que a anterioridade se refere a um processo para a produção de um sabonete líquido antimicrobiano, no qual o óleo vegetal utilizado foi o óleo de Buriti. O sabonete líquido é obtido por reação direta entre óleo de Buriti, um antimicrobiano natural com alto teor de carotenóides, e um álcali.

[022] Ferraz e colaboradores (2017) em "Extrato de folhas de juazeiro com atividade acaricida sobre o ácaro-vermelho em algodoeiro", avaliou a toxicidade, a repelência, a eficiência e a fitotoxicidade do extrato aquoso de folhas de juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) no controle do ácaro-vermelho, *Tetranychus ludeni*, em algodoeiro. Para a avaliação da toxicidade, colocaram-se fêmeas adultas de *T. ludeni* sobre discos foliares de algodoeiro pulverizados com extrato de juazeiro. O efeito repelente foi verificado em arenas que continham discos de folha de algodoeiro tratados ou não com o extrato aquoso. A eficiência de controle do extrato de juazeiro foi avaliada pela infestação de plantas de algodoeiro com fêmeas adultas do ácaro, seguida de pulverização com o extrato. A CL50 determinada foi de 3,54% (m/v), com mortalidade de 76,47% e efeito repelente. Houve eficiência de controle por 120 horas, com média de 78,02%, sem diferença significativa entre os intervalos de avaliação. As plantas de algodão não apresentaram fitotoxicidade. O extrato aquoso de juazeiro apresenta potencial como controle alternativo de *T. ludeni* em algodoeiro, em virtude de sua elevada toxicidade, efeito repelente e eficiência quanto à mortalidade, sem ser fitotóxico ao algodoeiro.

[023] Potenza e colaboradores (2005) em "Avaliação acaricida de produtos naturais para o controle de ácaro vermelho do cafeeiro *Oligonychus ilicis* (Mcgregor) (Acari: Tetranychidae)", tiveram como objetivo avaliar para controle do ácaro *Oligonychus ilicis* que apresenta ampla distribuição no Estado de São Paulo, com maiores incidências nos períodos mais secos do ano, extratos aquosos, etanólicos e hexânicos de *Lavandula angustifolia* Mill., *Dahlia pinnata* Cav., *Solanum paniculatum* L., *Agave angustifolia* Haw,

Ocimum basilicum L., *Solanum melongena* L., *Rhododendron simsii* Planch., *Ficus elastica* Roxb, *Codiaeum variegatum* (L.) Bl., *Spondias purpurea* L., *Sonchus oleraceus* L., *Ruta graveolens* L., *Annona squamosa* L., *Pennisetum purpureum* Schumach., *Dieffenbachia brasiliensis* (Veiech) e *Allamanda cathartica* L. Discos foliares de café var. Mundo Novo foram mergulhados na solução de extrato por 5 segundos, e as fêmeas adultas em número de 20 por parcela confinadas na superfície do disco e mantidas em câmara incubadora a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR. Avaliação de mortalidade foi realizada com 48h. Os melhores resultados em eficiência foram obtidos com os extratos etanólico e hexânico de *Dieffenbachia brasiliensis* (56 e 52%), *D. pinnata* (54%), *Allamanda cathartica* (44%) e *S. paniculatum* (46 e 48%).

[024] Siqueira e colaboradores (2014), em "Atividade acaricida de extratos aquosos de plantas de caatinga sobre o ácaro verde da mandioca", tiveram como objetivo avaliar os efeitos indesejáveis dos agrotóxicos, o que têm despertado o interesse da sociedade em utilizar táticas alternativas de controle de pragas, como as plantas com ação inseticida, que podem ser usadas como pós, extratos aquosos e orgânicos, óleos emulsionáveis e essenciais. Nesse sentido, foi avaliada a toxicidade, o crescimento populacional e a repelência de extratos aquosos de plantas sobre o ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa*. Foram utilizados extratos aquosos de *Croton blanchetianus*, *Myracrodruon urundeuva* e *Ziziphus joazeiro*, nos quais foram imersos discos de folhas de mandioca (3,5 cm de diâmetro). Os extratos em todas as concentrações (1, 5, 10, 15, 20 e 25%) proporcionaram um declínio populacional da praga. As concentrações de 20 e 25% dos extratos proporcionaram os maiores percentuais de mortalidade. Todos os extratos nas concentrações de 15; 20 e 25% foram repelentes para fêmeas adultas de *M. tanajoa*.

[025] A partir das anterioridades presentes no atual estado da técnica, nota-se o grande interesse em desenvolvimento de composições interesse agrícola que possibilitem a redução do uso indiscriminado de defensivos agrícolas sintéticos e nocivos, para o controle de pragas em culturas; bem como a necessidade de se agregar valor ao resíduo do sisal, por meio do desenvolvimento e comercialização de produtos dele proveniente,

o que ainda possibilita melhora da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[026] A presente invenção tem como objetivo disponibilizar uma formulação acaricida de uso agrícola eficiente e de grande apelo econômico, a base do suco fermentado e seco do resíduo de *Agave sisalana*, para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros *B. yothersi*.

DA INVENÇÃO

[027] A presente invenção descreve um acaricida de uso agrícola eficiente e de grande apelo econômico, à base do suco seco da mucilagem de *Agave sisalana*, para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros *B. yothersi*, obtido a partir de um processo de baixo impacto ambiental de encapsulamento em quitosana do suco fermentado e seco da mucilagem do sisal, convertendo um passivo ambiental em ativo de alto valor agregado, contribuindo, ainda, positivamente para melhora da qualidade de vida das pessoas que dependem do sisal para sua subsistência.

[028] O produto desenvolvido, solubilizado na concentração de 1% (m/v), apresentou 100% de ação acaricida contra o ácaro *Brevipalpus yothersi*, vetor da leprose dos citros, logo no primeiro dia após a aplicação direta a partir da imersão do fruto com os ácaros na calda de produto dissolvido, o que demonstra o suco da mucilagem do sisal fermentado, seco e encapsulado em quitosana é altamente eficaz no combate ao ácaro vetor da leprose dos citros.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[029] A presente invenção apresenta como principais vantagens:

- ✓ Disponibilizar um acaricida agrícola cujo ativo é advindo de resíduo abundante e de fonte vegetal e sustentável;
- ✓ Disponibilizar um acaricida agrícola que, por possuir seu ativo encapsulado, possibilita uma aplicação assertiva e controlada, redução da frequência de aplicação, maior segurança e reduzidos riscos ambientais;
- ✓ Disponibilizar um acaricida agrícola estável e altamente eficaz no combate ao ácaro vetor da leprose dos citros;

- ✓ Disponibilizar um produto que converte um passivo ambiental em ativo de alto valor agregado, por meio de um processo de baixo impacto ambiental, e que contribui positivamente para melhora da qualidade de vida das pessoas que dependem do sisal para sua subsistência.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[030] A fim de possibilitar melhor o entendimento da presente invenção, serão feitas referências às figuras descritas a seguir:

- ✓ FIG. 1: Suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana;
- ✓ FIG. 2: Resultado positivo para a presença de flavonóis na reação com hidróxido de sódio no tubo com coloração amarelo ouro em comparação com o tubo controle (incolor);
- ✓ FIG 3: Resultado positivo para a presença de taninos hidrolisáveis. Da esquerda para a direita: reação negativa para taninos na presença de gelatina e ácido sulfúrico (tubo 1), reação negativa para taninos na presença de cloreto de ferro (tubo 2), reação positiva para taninos hidrolisáveis ou gálico na presença de ácido acético e acetato de chumbo (tubo 3), tubo controle (tubo 4);
- ✓ FIG. 4: Resultado positivo para a presença de taninos hidrolisáveis. Da esquerda para a direita: reação negativa para taninos na presença de gelatina e ácido sulfúrico (tubo 1), reação negativa para taninos na presença de cloreto de ferro (tubo 2), reação positiva para taninos hidrolisáveis ou gálico na presença de ácido acético e acetato de chumbo (tubo 3), tubo controle (tubo 4). A imagem foi feita com maior aproximação a fim de melhorar a visualização do precipitado;
- ✓ FIG. 5: À esquerda o filtrado a vácuo como controle e à direita a amostra positiva para taninos hidrolisáveis;
- ✓ FIG. 6: Resultado positivo para a presença de saponinas;
- ✓ FIG. 7: Resultado positivo para a presença de antraquinonas livres na região em contato com o extrato (coloração avermelhada);
- ✓ FIG. 8: Resultado positivo para a presença de alcaloides e metilxantinas nos reagentes de Dragendorff, Mayer e Bertrand;
- ✓ FIG. 9: Curva-padrão de quercetina para teste de flavonoides;

- ✓ FIG. 10: Curva-padrão de proantocianidinas para teste de taninos condensados;
- ✓ FIG. 11: Curva-padrão de ácido gálico para teste de taninos hidrolisáveis;
- ✓ FIG. 12: Curva-padrão de saponina Merck para teste de saponinas;
- ✓ FIG. 13: Contagem de ovos de *Brevipalpus yotheresi* depositados em fruto cítrico 7 dias após tratamento com o suco fermentado e seco do sisal na concentração de 1% (m/v) encapsulado em quitosana, com água destilada como controle;
- ✓ FIG. 14: Aplicação do suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana pelo método de mergulho do fruto com ácaros da espécie *Brevipalpus yotheresi*, em destaque em (a). Ácaros mortos (pontos mais escuros) com aspecto oleoso no tratamento com o suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana (b).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[031] A obtenção do acaricida agrícola, compreende três etapas: preparação do suco fermentado de resíduo de *Agave sisalana*, preparação da solução de quitosana e a encapsulação do suco fermentado em quitosana.

[032] Para a preparação do suco fermentado de resíduo de *Agave sisalana*, a folha do sisal é moída em engenho manual de 3 moendas (Botimetal Metalurgica, modelo B-60), para separação das fibras; em seguida, o conteúdo líquido (suco) obtido é colocado em recipiente plástico com capacidade para um litro, com sua abertura protegida com plástico filme para impedir a entrada de insetos, e deixado 12 horas por dia ao sol, pelo período de uma semana, para fermentar. Após a fermentação, o suco é filtrado duas vezes em uma peneira granulométrica de aço inox 8X2" (ASTM 60 MESH/TYLER 60). Em seguida, é realizada uma filtragem utilizando uma camada fina de algodão sobre a peneira e, por fim, uma filtração a vácuo, com papel filtro, para a retenção total de pequenos resíduos sólidos. O filtrado obtido é posteriormente seco em estufa (FANEM LTDA, modelo 002CB), a 40°C por 3 dias, até obtenção de um peso constante. Após esse período o suco fermentado está pronto para ser encapsulado.

[033] Para a preparação da solução de quitosana, são dissolvidos 200 mg de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético 0,2 M e a solução agitada constantemente em agitador magnético (Marconi, modelo MA089) a 1500 rpm por cerca de 1 hora. Após esse

período, a solução é sonicada (Ya Xun, modelo 3560) por 30 minutos, tem seu pH mensurado (MS Tecnopon, modelo mPA210) e corrigido com NaOH 0,1 mol/L, até atingir o pH de 4,53, a solução é então filtrada a vácuo com papel filtro.

[034] Para a encapsulação do suco fermentado em quitosana, é preparada 50 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio na concentração de 1 mg/mL e deixada em agitação a 1500 rpm por 30 minutos em agitador magnético (Marconi, modelo MA089). Com o auxílio de uma seringa, são adicionados 10 mL da solução de tripolifosfato de sódio em 20 mL de solução de quitosana enriquecida com 0,01 g do suco fermentado seco. A mistura das soluções é mantida sob agitação a 1500 rpm em agitador magnético (Marconi, modelo MA089), a temperatura de 25 °C por 1 hora. Sendo, por fim, seca em estufa (Solab, modelo SL-100) a 36 °C por 3 dias, estando, após esse período, o acaricida agrícola (Fig. 1) pronto para aplicação.

[035] Para a análise preliminar do perfil fitoquímico qualitativo do suco fermentado do sisal, todo o *screening* fitoquímico foi realizado de acordo com as recomendações da literatura (Harbone, 1973; Auterhoff e Kovar, 1985; Glasl, 1983; Hatano *et al.*, 1989; List e Schimidt, 1989; Bacchi, 1996; Collins e Braga, 1988; Cordell, 1995; Banskota *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2010).

[036] De modo geral, a caracterização qualitativa dos diferentes grupos de substâncias vegetais presentes no suco fermentado do sisal, na sua forma líquida ou seca, foi obtida pela realização de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e ou/precipitação.

[037] Cálculo do teor de sólidos solúveis.

[038] Foram pesados 10 mL do suco fermentado do sisal em uma placa de Petri e anotados os pesos da placa com e sem amostra. A placa foi levada à estufa a 36 °C até a secura e, posteriormente, resfriada no dessecador. A placa foi pesada e esta operação repetida várias vezes até obtenção de peso constante. O processo foi realizado em triplicata. A quantidade de sólidos foi calculada pelas fórmulas abaixo:

$$\% \text{ sólidos solúveis (m/v)} = [(f - p) / V_a] \times 100 \quad (i)$$

$$\text{Densidade (g/mL)} = (i - p) / V_a \quad (ii)$$

$$\% \text{ sólidos solúveis (m/m)} = \% \text{ sólidos totais (m/v)} / \text{densidade} \quad (\text{iii})$$

Onde: i= massa inicial da placa com amostra, antes da secagem;

f= massa final da placa com amostra, após secagem;

p= massa da placa;

V_a= volume de 10mL

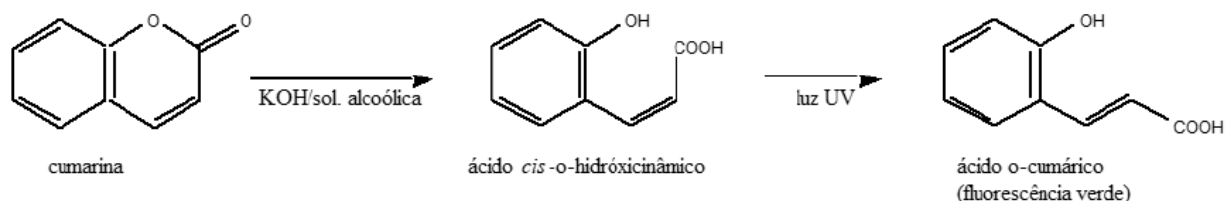
[039] A tabela 1 apresenta os dados de massa dos ensaios de sólidos solúveis, considerando um volume de amostra de 10 mL. A média do teor de sólidos solúveis para o suco fermentado do sisal é de 0,040 g/mL, ou seja, 4,0% (m/v). Ainda, a densidade média obtida foi de aproximadamente 1,01 g/mL, assim, obtém-se 0,040 g/g de sólidos solúveis, ou seja, 4,0% (m/m).

Ensaio	Inicial (g)	Final (g)	Evaporado (g)	Sólidos solúveis (g/mL)
1	10,02	0,40	9,62	0,040
2	10,07	0,40	9,67	0,040
3	10,06	0,39	9,67	0,039

Tabela 1: Dados de massa dos ensaios de teor de sólidos solúveis.

[040] Pesquisa de cumarinas.

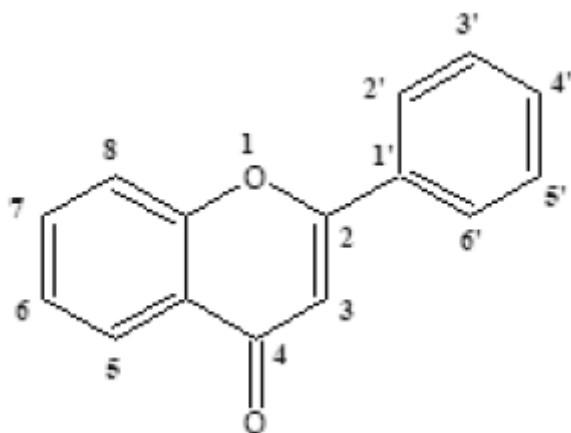
[041] Foi utilizado o seguinte procedimento: em cada lado (direito e esquerdo) de uma folha de papel filtro (10cm x 4cm) foi pingada 1 gota do suco fermentado do sisal de modo a obter 2 manchas de 1cm de diâmetro. Em uma das manchas foi adicionada 1 gota de solução de KOH 10% em etanol e depois essa foi seca. Depois de seca, foi pingada nessa mesma mancha mais uma gota da solução alcoólica de KOH. Essa mancha foi observada sob exposição a radiações ultravioletas (lâmpada UV com λ de 254 a 366nm), já a outra mancha foi coberta com papel preto como controle de reação. A reação positiva para cumarinas origina uma fluorescência azul esverdeada, conforme reação 1 a seguir:



[042] Na presença de cumarinas a mancha exposta adquiriu, pouco a pouco, fluorescência, já aparente ao final do primeiro minuto. Na amostra analisada, foi observada fluorescência azul esverdeada após poucos minutos sob luz ultravioleta - UV. A reação para cumarinas foi positiva.

[043] Pesquisa de flavonoides.

[044] A identificação genérica das diferentes classes de flavonoides é baseada em reações coloridas em face do número e posição das hidroxilas fenólicas presentes nos anéis A e B (estrutura básica de um flavonoide (2-fenil-cromona ou 2-fenil-benzopirona)). Um dos métodos de identificação destas substâncias é baseado em análises cromatográficas.



[045] Inicialmente, para o processo de extração dos flavonoides presentes na matéria-prima vegetal, foi colocado em banho-maria à 100°C, por dois minutos, 2 g do suco do sisal seco e 20 mL de álcool etílico a 70%. A mistura foi então filtrada em algodão.

[046] Reação de Shinoda.

[047] Foram transferidos 2 mL da solução alcoólica para tubos de ensaio, sendo que, em cada tubo, foram previamente adicionados 200 mg de magnésio metálico em pó. Depois,

foi vertido 1 mL de HCl concentrado cuidadosa e lentamente pelas paredes de cada tubo de ensaio inclinado, então, foi observada a coloração. A maioria dos flavonoides, na presença de magnésio em pó e ácido clorídrico, apresenta coloração variável em função de suas estruturas químicas: flavona (amarelo a vermelho), flavonol e di-idroflavonol (vermelho a vermelho sangue), flavanona (vermelho a violeta), derivados antociânicos (vermelho tornando-se rosa); chalconas, auronas, di-idrochalconas, isoflanvonas e isoflavanos têm reação negativa, sem coloração. A reação foi realizada em duplicata.

[048] A porção líquida da solução reacional final apresentou coloração amarelo claro, dessa forma, a reação foi positiva para flavonas.

[049] Reação oxalo-bórica ou reação de Taubouk.

[050] Foram colocados 3 mL da solução alcoólica em cápsulas de porcelana e estas levadas à secura em banho-maria. O resíduo foi resfriado e umedecido com 5 gotas de acetona. Foram adicionados aos resíduos, presentes nas cápsulas, 3 mL da solução de ácido bórico a 3% e 1 mL da solução de ácido oxálico a 10%. A solução foi evaporada novamente até secura, evitando aquecimento prolongado. Os novos resíduos, já frios, foram dissolvidos em 3 mL de éter etílico. As soluções etéreas foram observadas sob luz ultravioleta - UV - e foi verificado se essas apresentaram fluorescência. A reação positiva para flavonoides origina fluorescência amarelo esverdeada. A reação foi realizada em duplicata.

[051] Não foi observada fluorescência nas soluções etéreas sob luz ultravioleta – UV, dessa forma, a reação foi negativa para a presença de flavonoides.

[052] Reação com cloreto de alumínio.

[053] Foram aplicadas, em papel de filtro, 2 gotas da solução alcoólica, sendo que as gotas foram aplicadas em áreas diferentes. Foi adicionada 1 gota de solução de cloreto de alumínio em etanol a 5% sobre uma das gotas. Após a evaporação do solvente, foram observadas as manchas no papel sob luz ultravioleta - UV. Flavonas e flavonóis possuem fluorescência amarelada, e flavanonas azul esverdeada.

[054] Foi observada fluorescência amarelada no extrato alcoólico com cloreto de alumínio, sob luz UV, indicando a presença de flavonas e flavonóis.

[055] Reação com hidróxido de sódio.

[056] Foram colocadas em béquer, 10-15 gotas da solução alcoólica, mais 5-10 mL de álcool etílico absoluto e agitados por 2 minutos. Foi transferido cerca de 1 mL da solução para 2 tubos de ensaio. Foram adicionados aproximadamente 5 mL de água destilada nos dois tubos de ensaio e 3 gotas de NaOH 1M em um dos tubos, com isso, deveria ser observado se haveria mudança de cor para amarelo ouro. O outro tubo foi o branco e serviu como referência. A mudança de cor indica a presença de flavonoides.

[057] No tubo com NaOH 1M foi possível observar mudança na coloração da solução, que se tornou amarelo ouro transparente. O tubo sem NaOH permaneceu incolor. A reação foi positiva para a presença de flavonoides no extrato alcoólico (Fig. 2)

[058] Pesquisa de taninos.

[059] Inicialmente, 5 g do suco seco do sisal foram fervidos por 15 minutos com 100 mL de água destilada. A solução extrativa foi filtrada à vácuo e deixada esfriar em temperatura ambiente.

[060] Testes de identificação.

[061] Para a identificação inicial de taninos, 4 tubos de ensaio foram preparados. No tubo 1, foram colocados 2 mL da solução extrativa, 2 gotas de HCl diluído a 36% e solução de gelatina a 2,5%, gota a gota. A formação de precipitado indica reação positiva para taninos. No tubo 2, foram colocados 2 mL solução extrativa, 10 mL de água destilada e por fim 2-4 gotas da solução de FeCl_3 a 1% em metanol. A reação tem cor azul para taninos hidrolisáveis ou gálico e cor verde para taninos condensados ou catéquicos. No tubo 3, foram colocados 5 mL solução extrativa, 10 mL da solução de ácido acético a 10% e 5 mL da solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de um precipitado esbranquiçado indica presença de taninos hidrolisáveis. O tubo 4 conteve apenas solução extrativa sem adição de nenhum reagente como controle.

[062] Não foi observada formação de precipitado no tubo 1 ou mudança de coloração no tubo 2 suficiente para indicar o tipo de tanino presente na amostra, que se encontrava já diluída e com coloração amarelo pálido, contudo, foi possível observar grande formação de precipitado esbranquiçado no tubo 3. A reação, então, foi positiva para taninos hidrolisáveis ou gálico (figuras 3 e 4).

[063] Reação de Stiasny.

[064] A reação identifica a presença de taninos hidrolisáveis e condensados. Foram submetidos a refluxo, por 30 minutos, 50 mL da solução extrativa e 15 mL do reativo de Stiasny. Os taninos condensados originam um precipitado vermelho (flobafenos). Os taninos hidrolisáveis permanecem em solução e podem ser assim detectados: 10 mL da mistura submetida a refluxo, e posteriormente filtrada a vácuo, mais 5 g de acetato de sódio e 2-4 gotas da solução de FeCl_3 a 1% em metanol. A formação de cor azul indicaria a presença de taninos hidrolisáveis.

[065] Não foi observada a formação de precipitado vermelho após o tempo de refluxo. Apesar disso, após adição de acetato de sódio e 4 gotas de FeCl_3 a 1% em metanol a uma amostra do filtrado, foi possível observar mudança de coloração de castanho avermelhado para castanho escuro (Fig. 5), sendo considerada a reação positiva para taninos hidrolisáveis.

[066] Pesquisa de saponinas.

[067] Foram fervidos 2 g do suco seco do sisal, com 10 mL de água destilada por 3 minutos. A solução foi agitada energicamente, no sentido vertical, por 15 segundos e deixada em repouso por 15 minutos. Foi observada a presença ou não de espuma persistente (por 15 minutos). Depois, foram adicionadas 5 gotas de ácido clorídrico 2M e, após agitação, foi observado se a espuma era persistente à presença da solução ácida. A reação é positiva quando ocorre a permanência da espuma e negativa quando há o seu desaparecimento.

[068] A espuma da amostra foi persistente pelo período de 15 minutos após agitação e, depois, persistente à adição de solução ácida. Na figura 6, observa-se que a reação para saponinas foi positiva e o suco fermentado seco do sisal contém grandes quantidades dessas.

[069] Pesquisa de antraquinonas e cardiotônicos.

[070] Reação de Bornträger direta.

[071] Foi colocada uma pequena quantidade do suco seco do sisal (cerca de 0,2 g) em tubo de ensaio e adicionados 5 mL de solução de NH_4OH diluído a 10%. A reação de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de antraquinonas livres.

[072] A reação com coloração avermelhada na região em contato com o extrato seco aponta resultado positivo para a presença de antraquinonas livres. Ao homogeneizar, a solução adquiriu cor alaranjada (Fig. 7).

[073] Reação de Bornträger com prévia hidrólise ácida.

[074] Foi colocado 1g do suco seco do sisal em tubo de ensaio, foram adicionadas 8 mL de solução de etanol a 25% e a mistura fervida na chama por um minuto. A mistura foi filtrada por algodão para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido sulfúrico a 5% e aquecida levemente. Depois foi resfriada na torneira e transferida para um balão de decantação, onde foram adicionados 5 mL de Et₂O (éter etílico). A extração foi feita cuidadosamente, a mistura foi agitada e então deixada em repouso para separação das fases. A fase mais leve foi passada para um tubo de ensaio e foram adicionados 5 mL da solução de NH₄OH diluído, a mistura foi agitada fortemente e deixada em repouso. A reação com coloração rósea ou avermelhada na fase aquosa indica a presença de glicosídeos antraquinônicos e dímeros.

[075] Não foi possível observar coloração rósea ou avermelhada, portanto a reação foi negativa para glicosídeos antraquinônicos e dímeros.

[076] Pesquisa de alcaloides e metilxantinas.

[077] Foram aquecidos até fervura cerca de 5 g do suco seco do sisal e 30 mL de ácido clorídrico 2N. A solução foi então filtrada a vácuo. O filtrado foi dividido em 5 tubos de ensaio. Em 4 tubos foram acrescentadas 3 gotas dos reagentes de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat, respectivamente. Um tubo foi o branco. A formação de turvação e/ou precipitado indica reação positiva para alcaloides e metilxantinas.

[078] Foi possível observar, com clareza, a formação de precipitado quando adicionados os reagentes de Dragendorff, Mayer e Bertrand. No reagente de Bouchardat não foram observadas mudanças de turvação ou formação de precipitado. A reação para alcaloides e metilxantinas foi positiva (Fig. 8).

[079] Análise fitoquímica quantitativa do suco fermentado do sisal.

[080] As análises quantitativas dos metabólitos secundários de destaque foram realizadas por espectrofotometria no suco fermentado e seco do sisal. As metodologias utilizadas estão expostas a seguir.

[081] Os dados da composição quantitativa do suco fermentado e seco do sisal obtidos a partir das análises de flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, e saponinas estão apresentados na tabela 2. Os resultados foram obtidos a partir da média dos dados de massa de metabólito por grama de material seco para todas as concentrações de extrato empregadas em cada uma das análises. É possível observar que o suco fermentado e seco do sisal é constituído por cerca de 95% de saponinas, com os demais metabólitos secundário presentes em concentrações inferiores a 2%.

Metabólito secundário	Concentração média (mg/g)	Desvio padrão
Flavonoides	4,49	0,34
Taninos condensados	15,34	1,10
Taninos hidrolisáveis	17,64	1,44
Saponinas	946,30	32,80

Tabela 2: Concentração média de metabólitos secundários (flavonoides, taninos condensado, taninos hidrolisados e saponinas) do suco fermentado e seco do sisal em massa de reagente padrão equivalente por massa de material seco (mg/g).

[082] Determinação quantitativa de flavonoides.

[083] A metodologia adotada foi a descrita por Chang *et al.* (2002) com adaptações. As amostras do suco fermentado e seco do sisal foram preparadas nas concentrações de 10, 5, 2,5 e 1,25 mg/mL. O solvente utilizado foi etanol 70% para facilitar a solubilização. O procedimento foi realizado em triplicata para fins estatísticos.

[084] Foi adicionado, ao abrigo da luz, em um tubo de ensaio 0,5 mL das soluções preparadas com o suco fermentado e seco do sisal, 1,5 mL de etanol absoluto, 0,1 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% (p/v) e 0,1 mL de acetato de sódio (CH_3COONa) 1M. Os volumes dos tubos foram completados para 5,0 mL com 2,8 mL de água destilada.

[085] Os tubos foram agitados e as misturas homogeneizadas. A leitura foi feita a 425 nm após 30 minutos. Para fazer o branco, foi substituído 0,5 mL das soluções por 0,5 mL de etanol absoluto e seguido o mesmo procedimento.

[086] Para a elaboração da curva padrão, foi substituído 0,5 mL das soluções por 0,5 mL de solução padrão de quercetina em etanol absoluto e seguidos os mesmos procedimentos adotados no teste com as amostras do suco fermentado seco. A curva padrão foi construída na faixa de 10 µg/mL a 100 µg/mL, respeitando o mínimo de 5 pontos (10, 25, 50, 75, 100).

[087] Para a dosagem de flavonoides do suco fermentado e seco do sisal, foi feita, inicialmente, uma curva de calibração com quercetina como padrão (Fig. 9). O alto coeficiente de correlação ($R^2=0,9999$) confirma a linearidade na leitura dos dados das concentrações utilizadas.

[088] Os valores médios de absorbância das concentrações analisadas foram substituídos na curva-padrão e os resultados da quantidade de flavonoides foram obtidos em micrograma de quercetina equivalente por mililitro de amostra (tabela 3).

Concentração (mg/mL)	µg EQ/mL	Desvio padrão
10	43,00	0,47
5	21,23	0,31
2,5	11,53	0,36
1,25	5,92	0,20

Tabela 3: Dosagem de flavonoides em diferentes concentrações do suco fermentado e seco do sisal em massa de quercetina equivalente por mililitro de amostra (µg EQ/mL).

[089] Determinação quantitativa de taninos condensados.

[090] As amostras do suco fermentado e seco do sisal foram preparadas nas concentrações de 10, 5, 2,5 e 1,25 mg/mL. O solvente utilizado foi etanol 70% para facilitar a solubilização. O procedimento foi realizado em triplicata para fins estatísticos.

[091] Em tubos de ensaio - pré-aquecidos em banho-maria a 30°C por 30 minutos - foi adicionado 1,0 mL da amostra dissolvida em etanol absoluto. A esta amostra foram adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25% em etanol (v/v) e 2,5 mL de vanilina 1% em etanol (p/v).

[092] Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização e aquecidos por 20 minutos a 30°C em banho-maria, ao abrigo da luz. Em seguida, a leitura em espectrofotômetro foi feita a 500 nm. O branco foi preparado com 1,0 mL de etanol absoluto, 2,5 mL da solução H₂SO₄ 25% em etanol (v/v) e mais 2,5 mL de etanol absoluto no lugar da solução de vanilina 1% em etanol (p/v).

[093] Para a elaboração da curva padrão, foi substituído 1,0 mL da amostra por 1,0 mL de solução padrão de proantocianidinas e seguidos os mesmos procedimentos adotados nos testes com a amostra do suco fermentado seco. A curva padrão foi construída na faixa de 25 a 500 µg/mL, com no mínimo 5 pontos (25, 50, 100, 250, 500).

[094] Para a dosagem de taninos condensados no suco fermentado e seco, foi feita, inicialmente, uma curva de calibração com solução padrão de proantocianidinas (Fig. 10). O alto coeficiente de correlação ($R^2=0,999$) confirma a linearidade na leitura dos dados das concentrações analisadas.

[095] Os valores médios de absorbância das concentrações analisadas foram substituídos na curva-padrão e os resultados da quantidade de taninos condensados foram obtidos em micrograma de proantocianidina equivalente por mililitro de amostra (tabela 4).

Concentração (mg/mL)	Mg EP/g	Desvio padrão
10	179,6	2,12
5	76,2	5,66
2,5	40,9	3,39
1,25	16,8	2,12

Tabela 4: Dosagem de taninos condensados em diferentes concentrações do suco fermentado e seco do sisal em massa de proantocianidina por mililitro de amostra (µg EP/mL).

[096] Determinação quantitativa de taninos hidrolisáveis.

[097] O conteúdo de taninos hidrolisáveis foi estimado espectrofotometricamente pelo método de Brune, Hallberg e Skanberg (1991), com adaptações realizadas por Barcia et

al. (2012). As amostras do suco fermentado e seco do sisal foram preparadas nas concentrações de 10, 5, 2,5 e 1,25 mg/mL. O solvente utilizado foi metanol 70% para facilitar a solubilização. A mistura foi agitada por 10 min, seguido de repouso por 1h e, então, filtrada a vácuo. O procedimento foi realizado em triplicata para fins estatísticos.

[098] Em seguida, 2 mL do suco fermentado seco metanólico filtrado foram misturados com 8 mL da solução reagente contendo sulfato de amônio férrico (FAS), que consiste de 89% de solução 50% (m/v) ureia/tampão acetato 0,1M pH 4,4, 10% de solução de goma arábica 1% em água destilada e 1% da solução de sulfato de amônio férrico em ácido clorídrico 1M. Após 20 min de reação, a absorbância foi lida em 580 nm.

[099] O branco consistiu em 2 mL de metanol absoluto mais 8 mL da solução reagente contendo sulfato de amônio férrico (FAS). A quantificação foi baseada no estabelecimento da curva padrão com ácido gálico em metanol na faixa de 25 a 400 µg/mL, com o mínimo de 5 pontos (25, 50, 100, 200, 400), seguindo os mesmos procedimentos adotados.

[100] Para a dosagem de taninos hidrolisáveis no suco fermentado e seco do sisal, foi feita, inicialmente, uma curva de calibração com ácido gálico como padrão (Fig. 11). O alto coeficiente de correlação ($R^2=0,9991$) confirma a linearidade na leitura dos dados das concentrações utilizadas.

[101] Os valores médios de absorbância das concentrações analisadas foram substituídos na curva-padrão e os resultados da quantidade de taninos hidrolisáveis foram obtidos em micrograma de ácido gálico equivalente por mililitro de amostra (tabela 5).

Concentração (mg/mL)	µg EAG/mL	Desvio padrão
10	94,48	6,06
5	61,86	2,71
2,5	44,79	1,92
1,25	40,67	4,79

Tabela 5: Dosagem de taninos hidrolisáveis em diferentes concentrações do suco fermentado e seco do sisal em massa de ácido gálico equivalente por mililitro de amostra (μg EAG/mL).

[102] Determinação quantitativa de saponinas.

[103] A presença de saponinas no suco fermentado secos foi avaliada através de análise espectrofotométrica, de acordo com as recomendações da literatura (Clark *et al.*, 1993; Watson, 1999; Vigo, 2003). As amostras do suco fermentado e seco do sisal foram preparadas nas concentrações de 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em água destilada. O procedimento foi realizado em triplicata para fins estatísticos.

[104] A análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis. Uma alíquota de 1,0 mL das soluções preparadas com o suco seco do sisal foi adicionada em 1,0 mL do reagente cromogênico cloreto de cobalto 0,2% e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura da solução foi feita a 284 nm após 20 minutos do início da reação. Para fazer o branco, foi substituído 1,0 mL das soluções por 1,0 mL do solvente utilizado, água destilada, e seguido o mesmo procedimento.

[105] Para a elaboração da curva padrão, foi substituído 1,0 mL da amostra por 1,0 mL de solução padrão de saponina Merck e seguidos os mesmos procedimentos adotados. A curva padrão foi construída na faixa de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, respeitando o mínimo de 5 pontos (100, 150, 250, 500, 1000).

[106] Para a dosagem de saponinas no suco fermentado e seco, foi feita, inicialmente, uma curva de calibração com solução padrão de saponina Merck (Fig. 12). O alto coeficiente de correlação ($R^2=0,991$) confirma a linearidade na leitura dos dados das concentrações utilizadas.

[107] Na análise de saponinas, foi observada grande interferência da cor do suco fermentado e seco na leitura das absorbâncias das amostras. Assim, foi necessária a elaboração de um controle de cor para cada uma das concentrações do suco fermentado e seco do sisal analisadas. Os valores médios de absorbância, menos o controle de cor, das concentrações foram analisadas foram substituídos na curva-padrão e os resultados

da quantidade de saponinas foram obtidos em micrograma de saponinas padrão Merck por mililitro de amostra (tabela 6).

Concentração (mg/mL)	µg SPM/mL	Desvio padrão
1	746,3	26,87
0,5	402,6	6,93
0,25	288,6	16,97
0,125	141,9	2,83

Tabela 6: Dosagem de saponinas em diferentes concentrações do suco fermentado e seco do sisal da *Agave sisalana* em massa de saponina padrão Merck por mililitro de amostra (µg SPM/mL).

[108] Testes *in vivo* para avaliação do potencial acaricida do suco fermentado seco e encapsulado do sisal contra *Brevipalpus yothersi*.

[109] Para os testes, foi necessária uma criação-estoque de *B. yothersi*, para tanto, foram utilizadas folhas de laranjeira da variedade Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] mantidas em vasos contendo solo, areia e esterco bovino, no campus da FCAV/UNESP, sem aplicação de produtos fitossanitários. Após recolhidas, as folhas foram lavadas em água corrente e secas à sombra. Os ácaros foram confinados em arenas confeccionadas com as folhas de laranjeira colocadas sobre uma espuma de 1 cm de espessura que ocupava todo o fundo de uma placa de Petri de 20 cm de diâmetro por 2 cm de profundidade. As bordas das folhas foram recobertas por uma camada de algodão, ficando também em contato com a esponja. Diariamente, as folhas eram umedecidas com água destilada para manter a turgescência. As placas foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR de $60\pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. Quando necessário, as folhas em início de deterioração foram substituídas.

[110] Delineamento experimental.

[111] Inicialmente, foi estabelecida a ação acaricida do suco fermentado seco do sisal livre e encapsulado em quitosana. Para isso, folhas de laranjeira foram circundadas com algodão hidrófilo a fim de evitar a fuga dos ácaros e mantidas sobre espuma de 1 cm de

espessura e algodão hidrófilo embebidos em água para manter a turgescência das folhas. Em sequência, as folhas receberam pulverização com o suco fermentado seco livre em diferentes concentrações.

[112] As aplicações foram realizadas sobre a superfície adaxial das folhas em Torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Herts, Reino Unido) calibrada a 34,5 kPa, utilizando volume de 2 mL de calda de solução por pulverização. Posteriormente, foram transferidos 15 ácaros fêmeas adultas de *B. yothersi* por folha com auxílio de um pincel de apenas um pelo sob microscópio estereoscópico.

[113] Em uma etapa seguinte, devido ao maior tamanho de suas partículas, para determinação da ação acaricida do suco fermentado seco do sisal encapsulado em quitosana foi utilizada a técnica de aplicação por mergulho. Trata-se de um método simples e bastante utilizado na avaliação de agroquímicos, no qual o fruto contendo 11 ácaros fêmeas em região delimitada é mergulhado diretamente na calda de solução por 2 segundos. O método de mergulho é bastante utilizado para o *B. yothersi*, pois o ácaro não é removido durante o mergulho e pode sobreviver até 15 dias submerso.

[114] O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. As avaliações foram realizadas 1 e 7 dias após a aplicação das soluções com o suco livre e encapsulado, contabilizando-se ácaros vivos, mortos e aderido às barreiras de algodão e cola.

[115] Análise dos dados.

[116] A redução real ou eficiência dos tratamentos foi calculada pela fórmula de Abbout (1925), conforme descrito abaixo (equação 3), tomando-se por base a população de ácaros vivos e mortos de cada tratamento transformados em porcentagem de sobrevivência, excluindo ácaros aderidos à barreira de algodão ou cola.

$$A_{\text{totais}} = A_{\text{vivos}} + A_{\text{mortos}} \quad (\text{iv})$$

$$\% \text{ sobrevida} = (A_{\text{vivos}} / A_{\text{totais}}) \times 100 \quad (\text{v})$$

$$\% \text{ eficiência} = [(\% \text{ sobreviv. Controle} - \% \text{ sobreviv. Tratamento}) / \% \text{ sobreviv. Controle}] \times 100 \quad (\text{vi})$$

Onde: A: ácaros.

[117] Análise estatística.

[118] As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software BioEstat 5.0. Em todos os testes o nível de significância foi de 5%. Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, tendo como fator independente o tratamento. Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

[119] Testes *in vivo* para avaliação do potencial acaricida do suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana contra *Brevipalpus yothersi*.

[120] Inicialmente, o suco fermentado e seco do sisal não encapsulado teve sua ação acaricida analisada em diferentes concentrações contra o *B. yothersi*, de forma a ser comprovada sua atividade e estabelecido um possível padrão para comparação. As concentrações foram de 1, 2, 3 e 4%, assim definidas por meio do rendimento de material seco a partir do suco - 4% (m/v) -, de modo que representassem as diluições de 25, 50 e 75%, e o conteúdo total deste, respectivamente.

[121] De acordo com os resultados, apresentados na tabela 7, todos os tratamentos obtiveram eficiência acaricida acima de 60% ao fim do período de avaliação de uma semana, contudo é observada grande variabilidade nas repetições realizadas em cada tratamento, de modo que não há diferença estatística significativa relativa à ação acaricida nas diferentes concentrações empregadas em cada dia analisado.

Concentração do suco fermentado e seco	Dias após aplicação			
	1		7	
	Sobrevivência (%)	Eficiência (%)	Sobrevivência (%)	Eficiência (%)
1%	98,6	1,4 ^{ax}	32,5	65,5 ^{ax}
2%	86,2	13,8 ^a	25,5	72,9 ^a
3%	88,9	11,1 ^a	34,6	63,3 ^a
4%	87,0	13,0 ^a	22,7	75,9 ^a
Controle (água)	100,0	-	94,2	-

Tabela 7: Porcentagens de sobrevivência de ácaros e eficiência acaricida do suco fermentado e seco do sisal não encapsulado nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% (m/v) contra o ácaro *Brevipalpus yothersi* avaliadas 1 e 7 dias após a aplicação, com água destilada como controle.

*valores seguidos de pelo menos uma letra igual em mesma coluna indica diferenças estatísticas não significativas pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

[122] Devido à ausência de diferença estatística significativa entre as concentrações de suco fermentado e seco não encapsulado analisadas, foi empregada a concentração de 1% do suco fermentado e seco do sisal para avaliar o efeito do encapsulamento sobre a ação acaricida.

[123] Assim, nesta etapa, foi analisado o suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana na concentração de 1%. Os resultados obtidos a partir dos testes com os encapsulados demonstraram que o tratamento com quitosana destacou-se, apresentando 100% de eficiência acaricida contra o *B. yothersi* nos dois dias analisados, conforme observado na tabela 8.

Tratamento	Dias após aplicação			
	1		7	
	Sobrevivência (%)	Eficiência (%)	Sobrevivência (%)	Eficiência (%)
Suco fermentado e seco encapsulado em quitosana	0,0	100,0	0,0	100,0
Controle (água)	100,0	-	96,4	-

Tabela 8: Porcentagens de sobrevivência de ácaros e eficiência acaricida do suco fermentado e seco do sisal na concentração de 1% (m/v) encapsulado em quitosana contra o ácaro *Brevipalpus yothersi* avaliadas 1 e 7 dias após a aplicação, com água destilada como controle.

[124] A eficiência do suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana foi confirmada com a análise do número de ovos de *B. yothersi* depositados no fruto cítrico 7 dias após o início do tratamento. Nenhum ovo foi observado tratamento com o suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana (Fig. 13).

[125] Foi observado que os ácaros mortos nos tratamentos tanto com o suco fermentado e seco do sisal livre quanto encapsulado exibiram aspecto oleoso (Fig. 14), enquanto os vivos apresentavam-se normais. O aspecto oleoso é característico do extrato seco que exposto ao ambiente tende a reter umidade e adquirir propriedade adesiva.

[126] O suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana possui uma grande variedade de metabolitos secundários, contudo acredita-se que sua ação acaricida se deve ao alto conteúdo de saponinas em sinergia com concentrações menores de taninos.

[127] O suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana obteve 100% de eficácia em ambos os dias analisados, 1 e 7 após a aplicação. Esse resultado demonstra que o encapsulamento teve efeito positivo sobre a ação acaricida, possibilitando o aumento da eficiência e indicando vantagem do material encapsulado sobre o extrato livre. Ainda, foi feita a contagem de ovos ao fim do período de avaliação e observou-se que nenhum ovo foi depositado no fruto tratado com o encapsulado em quitosana, confirmando a eficácia da aplicação. Logo o suco fermentado e seco do sisal encapsulado em quitosana mostra-se como um importante acaricida a ser utilizado na lavoura de citrus

[128] Assim, a presente invenção pleiteia o processo de obtenção de um acaricida natural, constituído de suco fermentado de resíduo de *Agave sisalana*, mais especificamente da mucilagem do sisal, solução de tripolifosfato de sódio e solução de quitosana, a ser empregada para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros, *B. yothers*, sendo para tanto aplicado à cultura de citros numa concentração de 1%.

REIVINDICAÇÕES

1. **ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA** caracterizado por se constituir de suco fermentado de resíduo de *Agave sisalana*, mais especificamente, proveniente da mucilagem do sisal; solução de tripolifosfato de sódio e solução de quitosana.
2. **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA**, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado por compreender três etapas:
 - ✓ Preparação do suco fermentado de resíduo de *Agave sisalana*: a folha do sisal é moída em engenho de 3 moendas; em seguida, o conteúdo líquido (suco) obtido e deixado ao sol para fermentação, por 12 horas por dia ao sol, pelo período de uma semana; após a fermentação, o suco é filtrado duas vezes em uma peneira granulométrica de aço inox 8X2"; em seguida, é realizada uma filtragem utilizando uma camada fina de algodão sobre a peneira, e por fim, uma filtração a vácuo, com papel filtro; o filtrado obtido é posteriormente seco em estufa, a 40°C por 3 dias até obtenção de um peso constante, estando após esse período o suco fermentado está pronto para ser encapsulado;
 - ✓ Preparação da solução de quitosana: são dissolvidos 200 mg de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético 0,2 M e a solução agitada constantemente em agitador magnético a 1500 rpm por 1 hora; após esse período, a solução é sonicada por 30 minutos e tem seu pH mensurado e corrigido com NaOH 0,1 mol/L, até atingir 4,53; a solução é então filtrada a vácuo com papel filtro, estando pronta para ser empregada;
 - ✓ Encapsulação do suco fermentado em quitosana: para o encapsulamento, é preparada 50 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio na concentração de 1 mg/mL, e deixada em agitação a 1500 rpm por 30 minutos em agitador

magnético; com o auxílio de uma seringa, são adicionados 10 mL da solução de tripolifosfato de sódio em 20 mL de solução de quitosana enriquecida com 0,01 g do suco fermentado seco; então, a mistura é mantida sob agitação a 1500 rpm em agitador magnético, a temperatura de 25°C por 1 hora; sendo então, secas em estufa a 36°C por 3 dias, estando, após esse período, o acaricida agrícola pronto para aplicação.

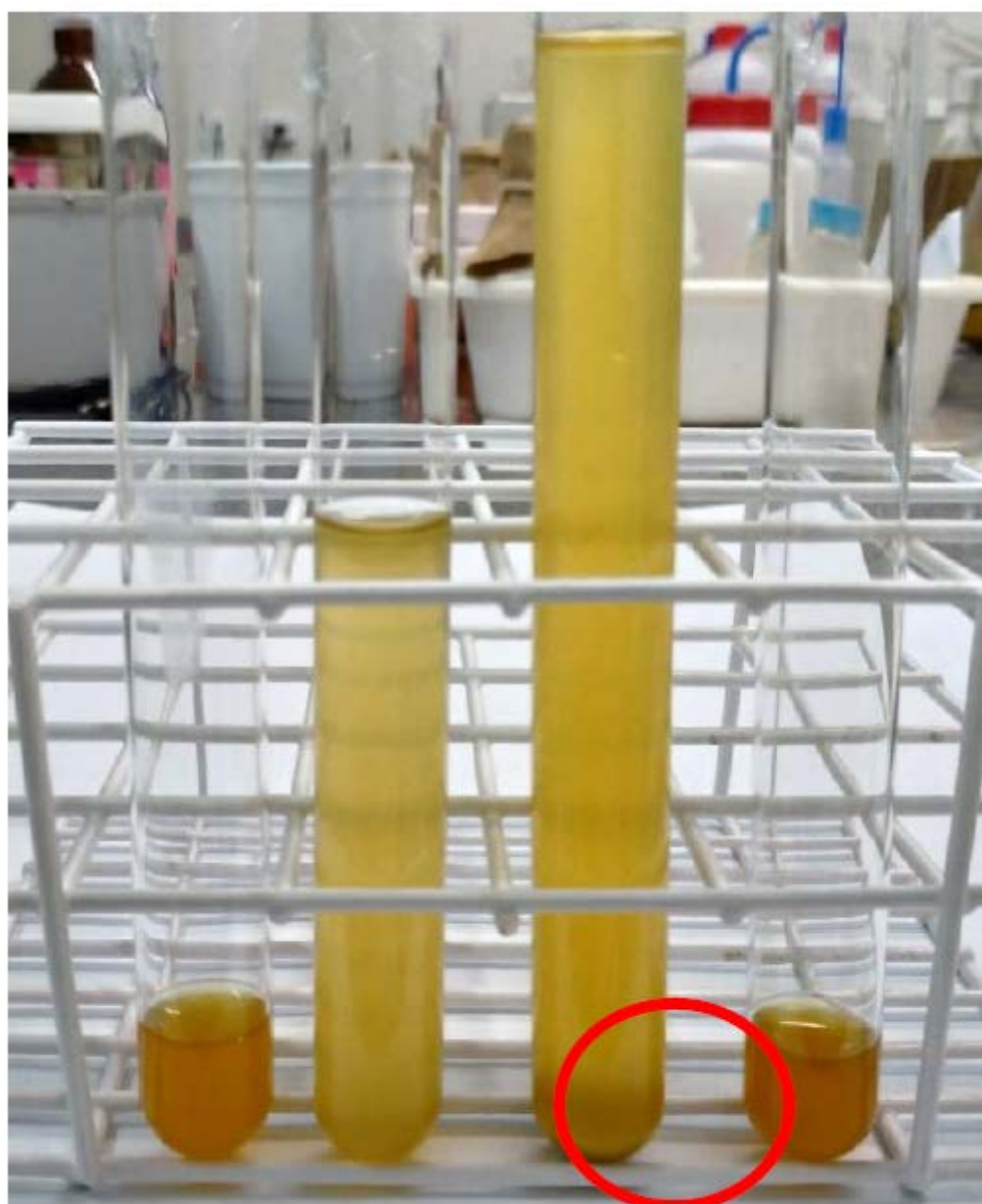
3. **USO ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA**, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros, *Brevipalpus yothersi*.
4. **USO ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA**, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** ser aplicado à cultura de citros numa concentração de 1%.



FIG. 1



FIG. 2



1

2

3

Branco

FIG. 3

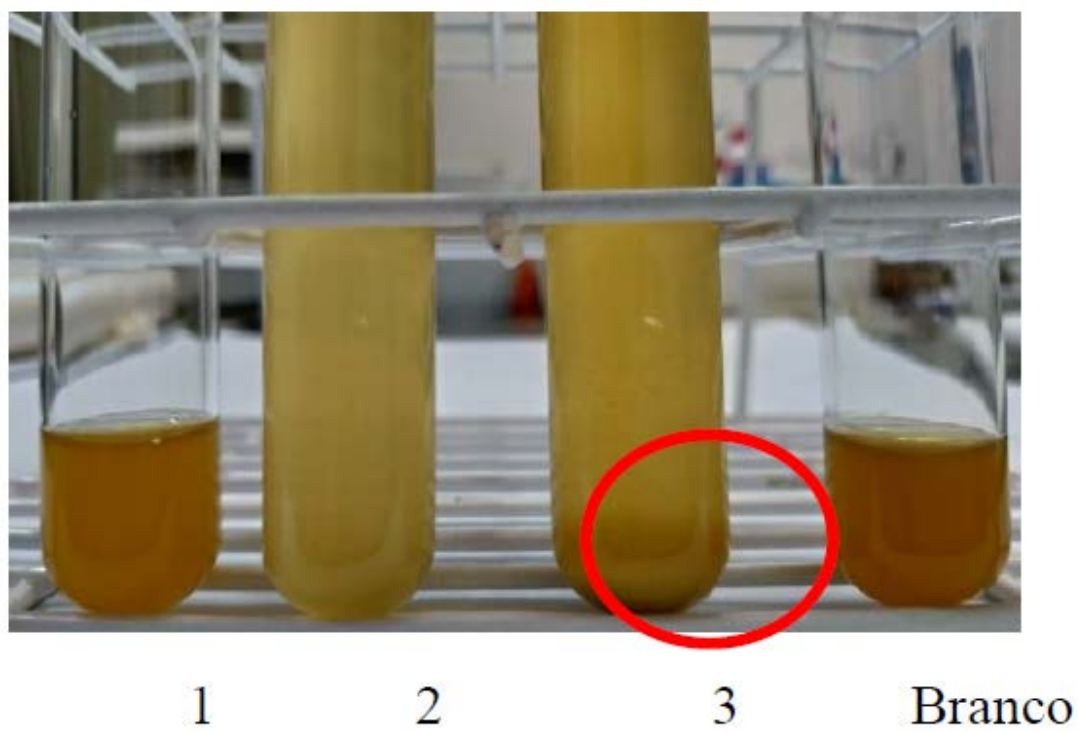
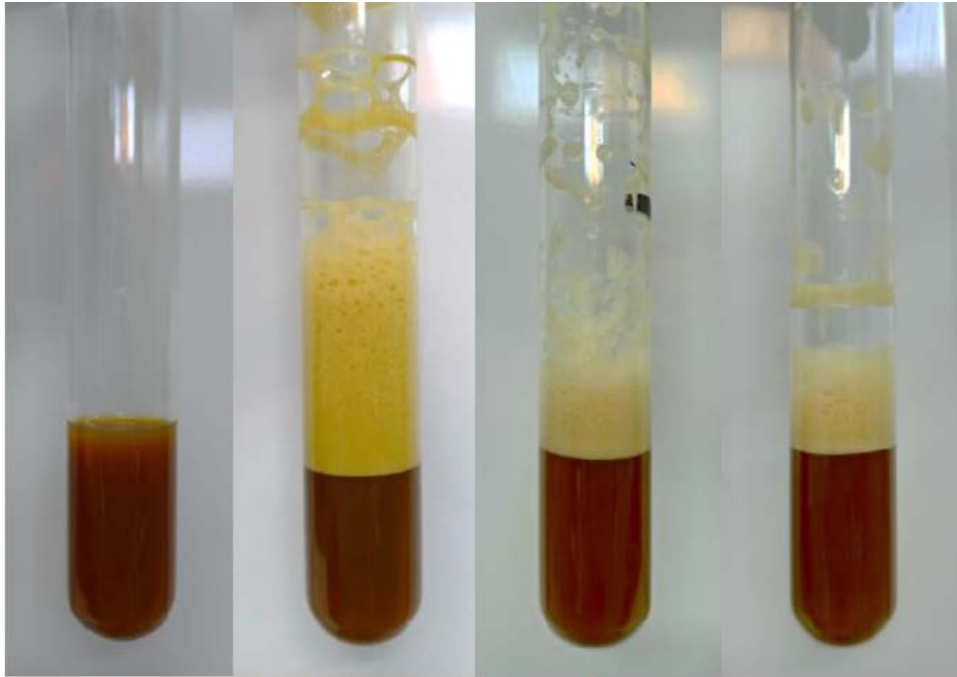


FIG. 4



FIG. 5



Antes de agitar Após agitar Após 15 minutos Com solução ácida

FIG. 6

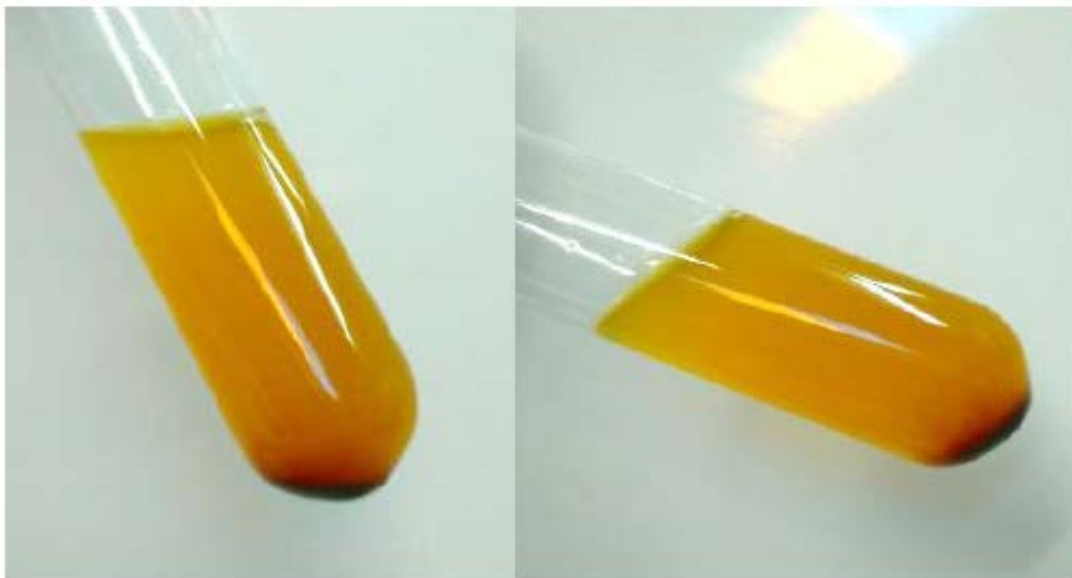


FIG. 7

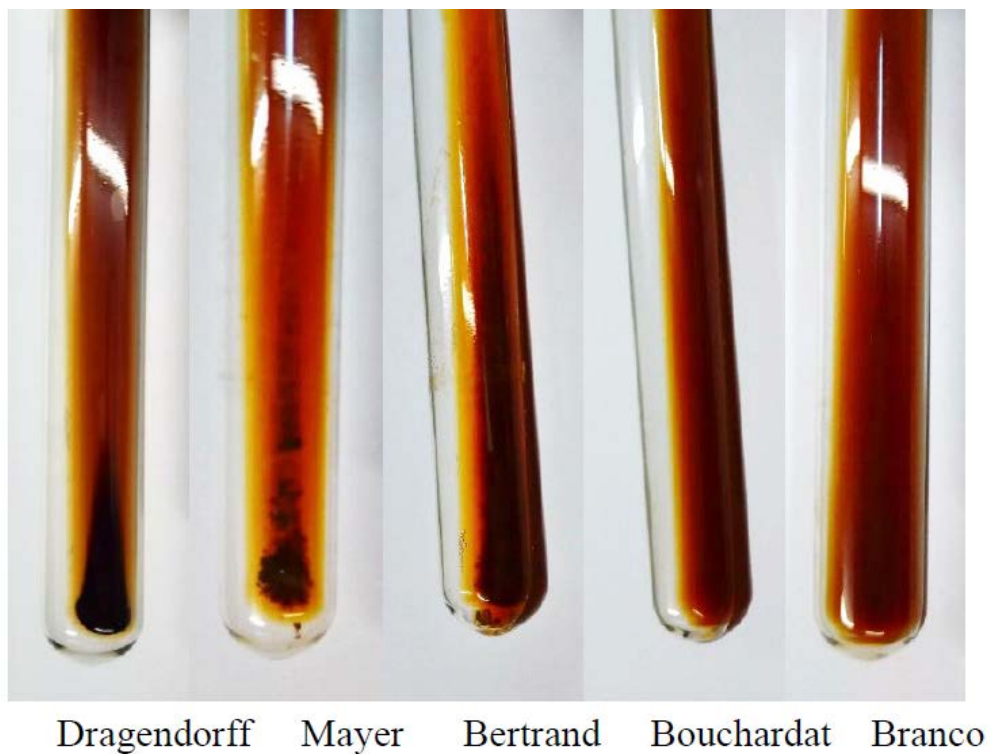


FIG. 8

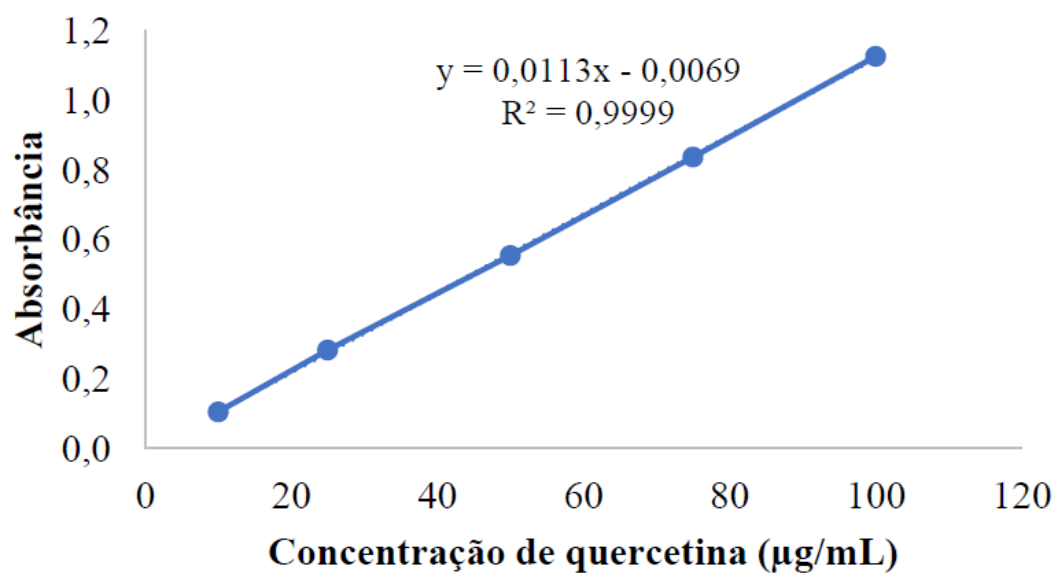


FIG. 9

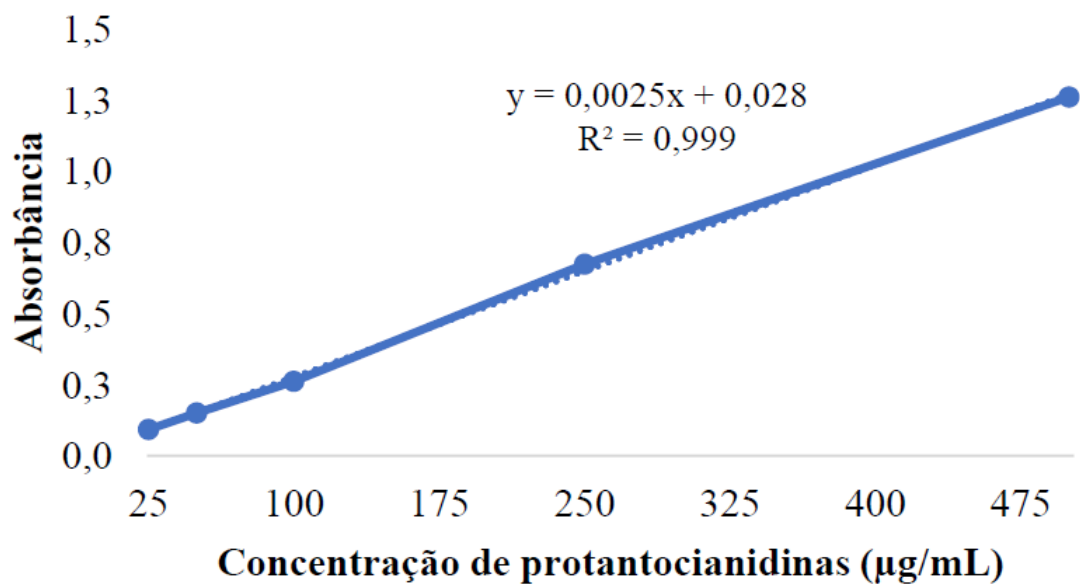


FIG. 10

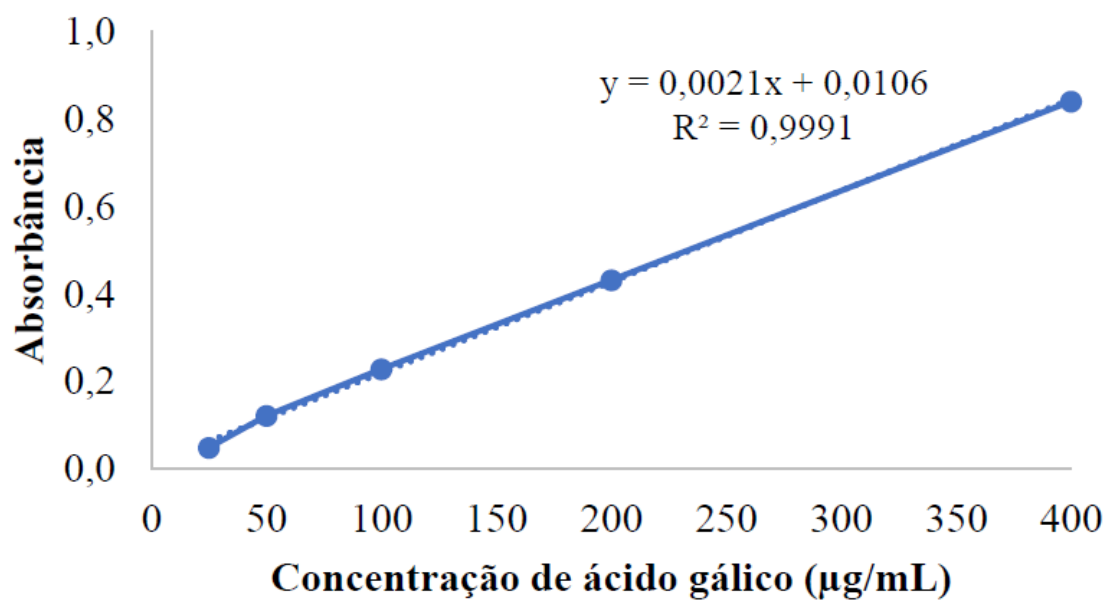


FIG. 11

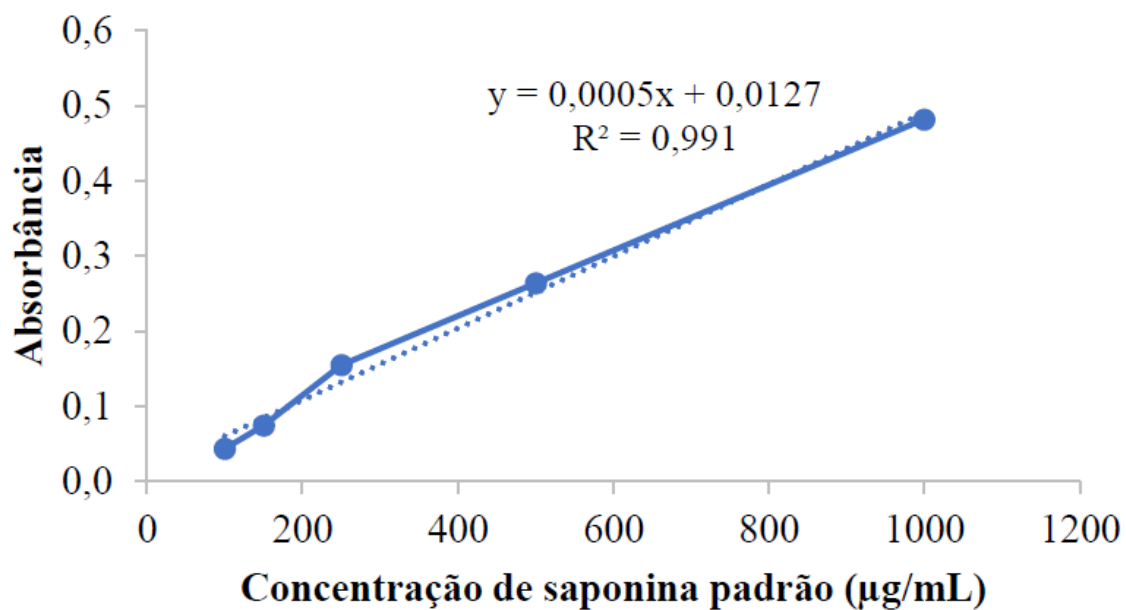


FIG. 12

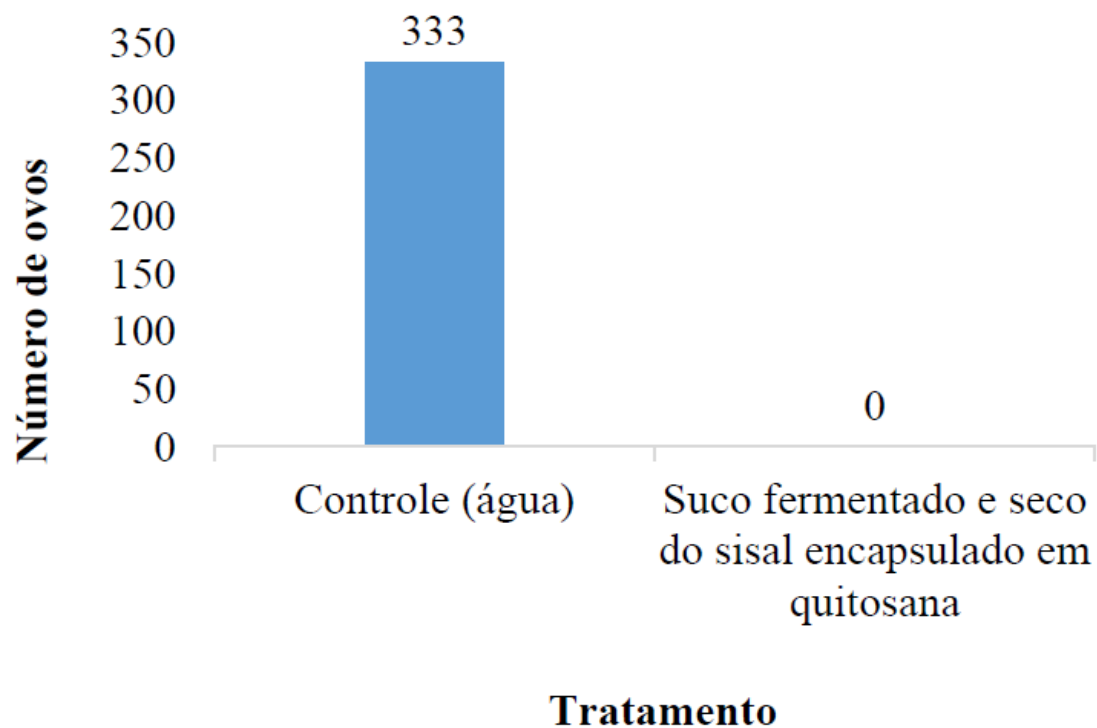


FIG. 13

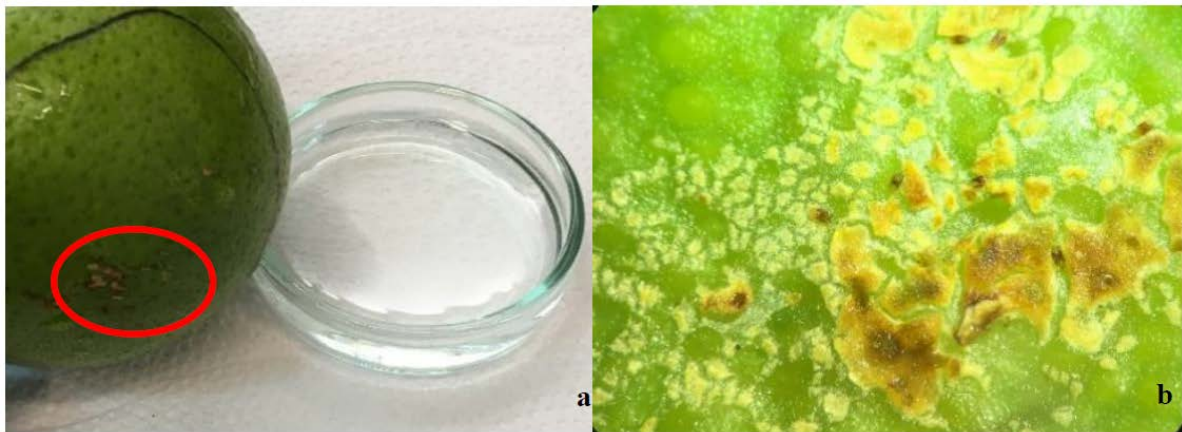


FIG. 14

RESUMO

ACARICIDA AGRÍCOLA À BASE DE SUCO FERMENTADO DE RESÍDUO DE *Agave sisalana* (SISAL) E ENCAPSULADO EM QUITOSANA, SEU USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO.

A presente invenção se refere a um acaricida agrícola eficiente e de grande apelo econômico, à base do suco seco da mucilagem de *Agave sisalana*, para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros, *Brevipalpus yothersi*, obtido a partir de um processo de baixo impacto ambiental de encapsulamento do suco fermentado e seco do sisal em quitosana, possibilitando a conversão de um passivo ambiental em ativo de alto valor agregado, contribuindo, ainda, positivamente para melhora da qualidade de vida das pessoas que dependem do sisal para sua subsistência. Portanto, a presente invenção, viabilizou o desenvolvimento de uma composição acaricida eficaz, estável e de menor impacto ambiental, quando comparado às atuais alternativas para o controle do ácaro-vetor da leprose dos citros, *B. yothersi*.