

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

(21) BR 10 2012 033146-2 A2

(22) Data de Depósito: 26/12/2012
(43) Data da Publicação: 26/08/2014
(RPI 2277)



(51) Int.Cl.:

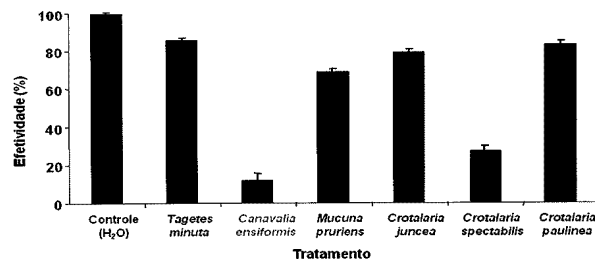
A01N 65/20
A01N 65/00
A01N 37/02
A01N 37/06
A01N 35/02
A01N 37/36

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO, USO DE COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO

(73) **Titular(es):** EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, UNIVERSITY OF MELBOURNE

(72) **Inventor(es):** DJAIR DOS SANTOS DE LIMA E SOUZA, MARIA F. CRISTINA MATTAR DA SILVA, MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ, RAPHAEL GARCIA DE SOUSA EVARISTO, THALES LIMA ROCHA, TONY BACIC, UTE ROESSNER, VERA LÚCIA PERUSSI POLEZ

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO, USO DE COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO A presente invenção se refere genericamente a composições utilizadas para controle de pragas agrícolas e, em uma modalidade particular, a composições utilizáveis no combate a nematoides. A invenção apresenta uma alternativa viável ao uso dos compostos nematotóxicos danosos ao meio ambiente e que podem prejudicar a saúde humana. Esta alternativa é concretizada através de uma composição nematotóxica para o controle de nematoides e que pode ser utilizada em plantas, parte de plantas, solo e utensílios. A respectiva tecnologia advém de resultados inesperados obtidos a partir de experimentos realizados com extratos da planta *Canavalia ensiformis* resultando em uma composição sintética nematotóxica inédita compreendendo uma combinação específica de substâncias naturalmente encontradas no extrato e que atuam sinergicamente.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção: **“COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO, USO DE COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO”**.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se enquadra no contexto da química verde e se refere genericamente a composições utilizadas para controle de pragas agrícolas e, em uma modalidade particular, a composições utilizáveis no combate a nematoides.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

10 Dentro do conceito de sustentabilidade, a química ambiental e/ou química verde tem avançado no sentido de introduzir processos e produtos para a substituição de tecnologias poluidoras. A utilização de matérias-primas de origem vegetal e/ou substâncias idênticas àquelas encontradas na natureza e a sua incorporação em processos/produtos ecologicamente corretos tem se mostrado uma tendência mundial principalmente em países que apresentam grande disponibilidade de biomassa.

15 No Brasil, os nematoides das galhas figuram entre as pragas mais prejudiciais em áreas de agricultura intensiva para importantes culturas, como café, cana-de-açúcar, soja, feijão, fumo, frutíferas e olerícolas. Os danos causados por esses fitopatógenos incluem a formação das galhas que ocasionam o desequilíbrio na absorção de água e nutrientes do solo, tornando as plantas muito mais sensíveis a qualquer modificação ambiental ou ao
20 ataque de pragas e patógenos. Nematoides do gênero *Meloidogyne spp.* são endoparasitas sedentários obrigatórios de várias plantas. Os hospedeiros compreendem mais de 3.000 espécies vegetais. As perdas anuais relacionadas à ação desses organismos se aproximam de US\$ 150 bilhões de dólares, das quais 95% estão associadas aos nematoides *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (Abad, et al., 2008; Bakhietia
25 et al., 2005). Nesse contexto, o *M. incognita* destaca-se como a espécie mais expressiva quanto às perdas econômicas (Huang et al., 2006).

30 As estratégias utilizadas para o controle desse fitoparasita consistem: na rotação de culturas, no uso de variedades resistentes, no manejo integrado de pragas e, principalmente na aplicação de defensivos agrícolas sintéticos (Chitwood, 2002). O uso de plantas antagonistas em esquemas de rotação de culturas é uma alternativa, porém com redução na

produtividade e nos lucros do agricultor (Dufour et al., 2003; Ferraz & Freitas, 2000). A utilização de variedades resistentes é uma maneira recomendável para controlar pragas e doenças, mas o número de cultivares resistentes é limitado bem como a diversidade genética relacionada a esta resistência (Dufour et al., 2003; Ferraz & Freitas, 2000). O
5 manejo integrado de pragas é uma estratégia almejada, porém necessita de planejamento rigoroso, de gestão intensiva da cultura, de maior dispêndio de tempo e pode ter custos superiores ao uso de defensivos agrícolas (Gentz, 2010). A estratégia de controle mais utilizada está centrada no uso massivo de nematicidas sintéticos os quais resultam no comprometimento do ambiente natural e da saúde pública (Abad, et al., 2008). Nesse
10 âmbito, o emprego de compostos vegetais nematotóxicos naturais (Newman et al., 2003) constitui-se em uma estratégia para o controle desse fitonematoide.

Avanços significativos na área de metabolômica de plantas, e a integração desta com a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a bioinformática, têm oferecido novas possibilidades para explorar e entender complexas interações em sistemas biológicos
15 (Weckwerth, 2009; Shulaev, 2008; Weckwerth, 2008; Huang, *et al.*, 2008; Roessner *et al.*, 2006; Roessner *et al.*, 2001). Estudos sobre a ação de extratos obtidos a partir de sementes de plantas antagonistas demonstraram efeitos nematicida e nematostático bastante efetivos. Esses efeitos têm sido relacionados à presença de metabólitos secundários, tais como alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e glicosídeos (Chitwood, 2002; Ferraz & Freitas,
20 2000).

Assim, é de extrema relevância a busca por substâncias químicas naturais inovadoras que possuam ampla diversidade estrutural e biológica (Newman et al., 2003; Kirkpatrick, 2002), visando à obtenção de novos produtos nematotóxicos eficazes e ambientalmente seguros. Neste caso, as plantas são fontes de mais de 100.000 produtos
25 naturais de pequena massa molecular, conhecidos como compostos vegetais ou metabólitos (Clardy, 2004; Dixon, 2001). Nos vegetais, estes compostos podem estar associados à diferenciação celular, à regulação do crescimento, à mediação das interações entre plantas e outros organismos e, principalmente à proteção da planta (Dobson, 2004).

Dentro deste contexto, a presente invenção apresenta uma alternativa viável ao uso
30 dos compostos nematotóxicos danosos ao meio ambiente e que podem prejudicar a saúde humana. Esta alternativa é concretizada através de uma composição nematotóxica para o controle de nematoides e que pode ser utilizada em plantas, parte de plantas e no solo. A

respectiva tecnologia advém de resultados inesperados obtidos a partir de experimentos realizados com extratos da planta *Canavalia ensiformis* resultando em uma composição nematotóxica inédita compreendendo uma combinação específica de substâncias naturalmente encontradas no extrato.

5

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta uma composição compreendendo uma combinação específica de substâncias encontradas naturalmente e que atuam sinergicamente no controle de nematoides em plantas.

10 A composição sintética nematotóxica sinérgica da presente invenção compreende, como compostos ativos:

- ácido palmítico,
- ácido trans-aconítico e/ou glicose e, opcionalmente,
- S-carboximetilcisteína.

15 Entre as formas de apresentação da presente composição são incluídas soluções, emulsões, pós umectáveis, suspensões, pós, poeiras, pastas, pós solúveis, grânulos, concentrados de suspensão-emulsão, materiais naturais e sintéticos impregnados com compostos ativos encapsulações. Adicionalmente, a composição da invenção pode, ainda, compreender ingredientes de formulação incluindo, entre os mesmos, veículos líquidos/solventes líquidos e/ou veículos sólidos e/ou surfactantes/espalhantes e/ou agentes
20 de pegajosidade/adesivos e/ou corantes.

Uma segunda concretização da respectiva invenção se refere ao uso da composição nematotóxica sinérgica para o controle de nematoides em plantas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

25 Figura 1 - Efeito dos extratos crus aquosos de sementes de plantas antagonistas sobre (J₂) de *M. incognita*. As barras representam a percentagem de nematoides vivos após 48 horas de exposição. Concentração de 1mg de cada extrato para um volume final de 0,3mL e 100 juvenis de segundo estágio foi utilizada no bioensaio conduzido em triplicata tendo água destilada como controle negativo.

30 Figura 2 - Efeito de 0,5mg (0,5mg/0,3mL vol. final) dos dialisados externo (DECe) e interno (DICE) sobre J₂ de *M. incognita*. As barras representam a percentagem de

nematoides mortos. Controles foram realizados com água destilada (dH₂O), albumina sérica bovina (BSA) e extrato cru aquoso de *C. ensiformis* (ECACe). Ensaio de recuperação realizado para certificação do efeito nematicida.

Figura 3- Efeito do DE de *C. ensiformis* pré-aquecido (50°C) contra J₂ de *M. incognita* demonstrando a estabilidade térmica da fração analisada. O bioensaio foi realizado em triplicata e as barras representam o percentual de nematoides mortos. Água destilada foi usada como controle negativo. Ensaio de recuperação realizado para certificação do efeito nematicida.

Figura 4 - Efeito de 500µg (500 µg/0,3mL) do DE de *C. ensiformis* sobre nematoides saprofiticos de vida livre (VL) e J₂ de *M. incognita*. As barras representam o percentual de nematoides mortos. Os controles do bioensaio possuem nematoides (VL) e J₂ de *M. incognita* imersos separadamente em água destilada.

Figura 5 – Teste de atividade hemolítica utilizando sangue bovino (A) ou hemácias purificadas (B) incubados com distintas concentrações de dialisado externo de *C. ensiformis* solubilizados em PBS. As medidas de atividade hemolítica foram monitoradas espectrofotometricamente usando comprimentos de onda de 567 nm. Água destilada (100% hemólise) e PBS foram utilizados como controles positivo e negativo.

Figura 6 - Efeito do dialisado externo (DE) de *C. ensiformis* sobre J₂ de *M. incognita* em casa de vegetação simulando condições de campo. As barras simbolizam o número de massas de ovos encontradas nas raízes de tomateiro após os tratamentos. O experimento foi conduzido em quintuplicata com água destilada e o nematicida comercial sendo utilizados como controles negativo e positivo respectivamente.

Figura 7 - Microscopia óptica: (A) J₂ antes da adição do DE- 200x. (B) Região intestinal de J₂ antes da adição do DE - 400x. (C) J₂ 24 horas após adição do DE - 200x. (D) Região intestinal de J₂ após a adição do DE - 400x.

Figura 8 - (A) - Cromatograma do dialisado externo (DE) de *C. ensiformis* ($\lambda = 216$ nm) exibindo um perfil com 22 picos. (B) - Bioensaio mostrando as frações ativas contra J₂ de *M. incognita* (1, 3, 6, 17 e 18) após 48 horas de exposição. (C) - Ensaio de recuperação certificando o efeito nematicida das frações 1, 3 e 18 e nematostático das frações 6 e 17.

Figure 9 - (A) - Bioensaio mostrando o efeito dos compostos comerciais sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita* após 48 horas de exposição. 1- Controle dH₂O,

2- DECe, 3- Glicose 10%, 4- Glicose 20%, 5- D-Pinitol (80µg), 6- D-Pinitol (150µg), 7-L-canavanina (80µg), 8-L-canavanina (150µg), 9- Ácido palmítico (80µg), 10- Ácido palmítico (150µg), 11- Ácido cítrico (80µg), 12- Ácido cítrico (150µg), 13- Ácido málico (80µg), 14-Ácido málico (150µg), 15- Ácido *cis*-aconítico (80µg), 16- Ácido *cis*-aconítico (150µg), 17- Ácido *trans*-aconítico (80µg), 18- Ácido *trans*-aconítico (150µg), 19- 50mM Tris/HCl pH 8, 20- 50mM Ácido acético pH 5, 21- L-fenilalanina (80µg), 22- L-fenilalanina (150µg), 23 L-metionina (80µg), 24- L-metionina (150µg), 25- L-triptofano (80µg), 26- L-triptofano (150µg), 27- S-carboximetilcisteína (80µg), 28- S-carboximetilcisteína (150µg), 29- Zantotoxina (80µg), 30- Zantotoxina (150µg) e 31- Glicose 20% + L-canavanina (150µg). B - Avaliação do efeito dos diferentes compostos comerciais após o ensaio de recuperação utilizando água destilada.

Figura 10 – (A) - Bioensaio mostrando o efeito dos compostos comerciais e suas composições sobre juvenis de segundo estágio de *M.incognita* (J2) após 48 horas de exposição. C+ controle positivo (extrato); C- controle negativo (água); 2: ácido palmítico; 3:S-carboximetilcisteína; 4: ácido *trans*-aconítico; 5: glicose. Concentrações das composições: 2+3, 2+4, 2+5, 3+4, 3+5 = 0,25 g/L (cada composto ativo da composição); 2+3+4, 2+3+5, 2+4+5 = 0,17 g/L cada composto ativo da composição; 2+3+4+5 = 0,125 g/L cada composto ativo da composição. (B) - Avaliação do efeito dos diferentes compostos comerciais e suas composições após o ensaio de recuperação utilizando água destilada. C+ controle positivo (extrato); 2: ácido palmítico; 3:S-carboximetilcisteína; 4: ácido *trans*-aconítico; 5: glicose. Concentrações das composições: 2+3, 2+4, 2+5, 3+4, 3+5 = 0,25 g/L (cada composto ativo da composição); 2+3+4, 2+3+5, 2+4+5 = 0,17 g/L cada composto ativo da composição; 2+3+4+5 = 0,125 g/L cada composto ativo da composição.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é resultante de trabalhos de pesquisa realizados no intuito de detectar possíveis compostos nematotóxicos naturais presentes em extratos de plantas. Tais compostos constituem uma alternativa na substituição a agentes sintéticos nematotóxicos que provocam danos à natureza e ao homem. A composição nematotóxica descrita na invenção foi gerada a partir de resultados não esperados obtidos quando da realização de bioensaios de nematotoxicidade utilizando como compostos ativos algumas substâncias detectadas no extrato de plantas. Os resultados destes bioensaios comprovaram a existência

de um efeito nematotóxico sinérgico inesperado a partir de combinações entre estes compostos ativos.

Neste contexto, a presente invenção descreve uma composição nematotóxica de efeito sinérgico compreendendo como compostos ativos:

- 5
- ácido palmítico,
 - ácido trans-aconítico e/ou glicose e, opcionalmente,
 - S-carboximetilcisteína.

A composição nematotóxica descrita nesta invenção pode, alternativamente, compreender ingredientes de formulação. A referida composição com ou sem a presença de
10 ingredientes de formulação pode se apresentar na forma de soluções, emulsões, pós umectáveis, suspensões, pós, poeiras, pastas, pós solúveis, grânulos, concentrados de suspensão-emulsão, materiais naturais e sintéticos impregnados com os compostos ativos e encapsulações.

Entre os compostos que podem ser utilizados como ingredientes de formulação são
15 incluídos, entre outros, veículos líquidos/solventes líquidos e/ou veículos sólidos e/ou surfactantes/espalhantes e/ou agentes de pegajosidade/adesivos e/ou corantes. Se o ingrediente de formulação utilizado for água, também é possível empregar solventes auxiliares como, por exemplo, solventes orgânicos.

Entre os veículos líquidos / solventes líquidos adequados para uso na presente
20 invenção podem-se citar, entre outros, solventes aromáticos, solventes aromáticos clorados ou hidrocarbonetos alifáticos clorados, hidrocarbonetos alifáticos, frações de petróleo, óleos minerais, óleos vegetais, álcoois e seus éteres e ésteres, cetonas, solventes fortemente polares e água.

Preferencialmente, os solventes aromáticos utilizados na invenção são selecionados
25 dentre xileno, tolueno ou alquilnaftalenos. No caso da utilização de solventes aromáticos clorados ou hidrocarbonetos alifáticos clorados na composição da presente invenção, estes são preferencialmente selecionados dentre clorobenzeno, cloroetileno ou diclorometano. Hidrocarbonetos alifáticos são preferencialmente selecionados dentre ciclohexano ou parafinas. No caso alternativo de utilização de álcoois estes são selecionados
30 preferencialmente dentre etanol, propanol, butanol ou glicol. Para o caso da utilização de cetonas estas são preferencialmente selecionadas dentre propanona, metil etil cetona, metil

isobutil cetona ou ciclohexanona. Solventes fortemente polares são preferencialmente selecionados dentre dimetilformamida e sulfóxido de dimetila.

Entre os veículos sólidos adequados para uso na presente invenção podem-se citar, entre outros, sais de amônio, ureia, calcáreos, fosfatos, potássio, fertilizantes NPK, 5 minerais naturais moídos, minerais sintéticos moídos e matéria orgânica.

Preferencialmente, quando utilizados como veículos sólidos, os minerais naturais moídos são selecionados dentre caulins, argilas, talco, giz, quartzo, atapulgita, montmorilonita e terra diatomácea. Quando da utilização de minerais sintéticos moídos, estes são preferencialmente selecionados dentre sílica, alumina e silicatos. Veículos sólidos 10 adequados são utilizados quando a composição nematotóxica da presente invenção é apresentada na forma de grânulos. Estes veículos sólidos adequados são selecionados, preferencialmente, dentre rochas naturais trituradas, grânulos sintéticos e grânulos de material orgânico.

Alternativamente, surfactantes/espalhantes podem ser empregados como 15 ingredientes de formulação para a composição da presente invenção. Os respectivos surfactantes/espalhantes são selecionados dentre emulsificantes e/ou dispersantes e/ou formadores de espuma. Diferentes emulsificantes/formadores de espuma podem ser utilizados na composição nematotóxica da presente invenção incluindo emulsificantes catiônicos, não iônicos e emulsificantes aniônicos. Quando da utilização de emulsificantes 20 não iônicos e aniônicos, estes são preferencialmente selecionados dentre ésteres graxos de polioxietileno, éteres graxos de polioxietileno, alquil sulfonatos, alquil sulfatos, aril sulfonatos, e hidrolisados de proteína. No caso da utilização de dispersantes como surfactantes na presente invenção, estes são selecionados preferencialmente dentre metilcelulose e refugo de lignina sulfito.

25 Outros ingredientes de formulação também podem, alternativamente, ser empregados na composição da presente invenção. Esses ingredientes incluem, entre outros, agentes de pegajosidade/adesivos como, por exemplo, carboximetilcelulose e polímeros naturais e sintéticos na forma de pós, grânulos ou látex, como goma arábica, álcool polivinílico e acetato de polivinila. Outros ingredientes também passíveis de serem 30 empregados como ingredientes de formulação são óleos minerais e vegetais, fosfolipídios naturais, como cefalinas e lecitinas, e fosfolipídios sintéticos.

Alternativamente, a composição nematotóxica da presente invenção pode também conter como ingrediente de formulação, corantes tais como pigmentos inorgânicos, como, por exemplo, óxido de ferro, óxido de titânio e azul da prússia e corantes orgânicos como, por exemplo, corantes de alizarina, corantes azo e corantes de ftalocianina metálica. Nutrientes residuais como, por exemplo, sais de ferro, manganês, boro, cobre, cobalto, molibdênio e zinco também podem, alternativamente, ser utilizados como ingredientes de formulação na composição da presente invenção.

Em uma concretização alternativa da presente invenção a composição nematotóxica de efeito sinérgico pode, ainda, compreender outros compostos ativos. Estes outros compostos ativos quando utilizados, são selecionados dentre inseticidas, atratores, agentes esterilizadores, bactericidas, acaricidas, nematicidas, fungicidas, substâncias reguladoras do crescimento, herbicidas e compostos protetores de herbicidas (safeners).

A composição nematotóxica pode ainda compreender como ingredientes de formulação, componentes fertilizantes e/ou corretivos de solo e/ou condicionadores de solo. Composições assim estruturadas podem ser aplicadas em operações de fertilização, correção e/ou condicionamento de solo.

Em outra concretização alternativa da presente invenção, a composição nematotóxica sinérgica é uma composição aquosa compreendendo os compostos ativos. Em uma composição particular preferencial da presente invenção, a composição nematotóxica é uma composição aquosa contendo ácido palmítico e ácido trans-aconítico nas concentrações de 0,25 g/L cada. Em uma segunda composição particular preferencial da presente invenção, a composição nematotóxica é uma composição aquosa contendo ácido palmítico e glicose nas concentrações de 0,25 g/L cada. Em uma terceira composição particular preferencial da presente invenção, a composição nematotóxica é uma composição aquosa contendo ácido palmítico, ácido trans-aconítico e glicose nas concentrações de 0,17 g/L cada. Em uma quarta composição particular preferencial da presente invenção, a composição nematotóxica é uma composição aquosa contendo ácido palmítico, ácido trans-aconítico e S-carboximetilcisteína nas concentrações de 0,17 g/L cada. Em uma quinta composição particular preferencial da presente invenção, a composição nematotóxica é uma composição aquosa contendo ácido palmítico, glicose e S-carboximetilcisteína nas concentrações de 0,17 g/L cada. Em uma sexta concretização preferencial da presente invenção, a composição nematotóxica é uma composição aquosa

contendo ácido palmítico, glicose, S-carboximetilcisteína e ácido trans-aconítico nas concentrações de 0,125 g/L cada.

Também objeto da presente invenção é o uso, da composição nematotóxica de efeito sinérgico descrita anteriormente, para o controle de nematoides. Em uma concretização preferencial, o uso da composição da invenção é para o controle de nematoides em plantas e/ou partes de plantas. Em outra concretização preferencial, o uso da composição da invenção é para o controle de nematoides em solos. Particularmente, o referido uso ocorre através da aplicação nas plantas e/ou partes da planta e/ou no solo e/ou utensílios.

10 A aplicação da composição nematotóxica sinérgica da presente invenção na planta, e/ou partes da planta e/ou no solo pode ser realizada diretamente ou deixando-se os compostos agirem sobre suas vizinhanças, ambiente ou espaço de armazenamento pelos métodos de tratamento comuns como, por exemplo, por imersão, pulverização, evaporação, fumigação, névoa, espalhamento, irrigação, aplicação no solo etc.

15 Em uma concretização especial da presente invenção o uso da composição nematotóxica de efeito sinérgico descrita neste documento é para o controle de *Meloigogyne incognita*.

Experimentos realizados e resultados obtidos:

20 Inicialmente, extratos aquosos obtidos a partir de sementes de plantas antagonistas foram testados em bioensaios visando à detecção de compostos efetivos contra juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*.

25 Dentre os extratos testados, *Canavalia ensiformis*, de nome comum feijão-de-porco, planta da família Leguminosae, originária da América Central, exibiu a mais alta atividade nematicida (85%) (Fig. 1). O fracionamento desse material por diálise resultou na separação de moléculas menores que 3,5 kDa (dialisado externo - DE) e maiores que 3,5 kDa (dialisado interno - DI). Nesse caso, o DE apresentou os resultados mais promissores comparados com o DI, tais como: a) maior atividade nematotóxica (Fig. 2); b) estabilidade térmica (Fig. 3); c) alta especificidade contra J₂ de *M. incognita* (Tabela 1), d) ausência de atividade contra os fungos (fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* acesso 1915, 30 *Fusarium solani* acesso 1624, *Macrophomina phaseolina* acesso 1496 e *Phytophthora tabacum*), bactéria (*Bacillus subtilis*) e larva de inseto (*Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*) (Tabela 1); e) inexistência de atividade contra nematoide de vida livre (Fig. 4);

ausência de efeito citotóxico adverso em hemácias de mamíferos (Fig. 5) e g) redução acima de 80% das massas de ovos de *M. incognita* em bioensaios conduzidos em casa de vegetação usando plantas de tomate (Fig. 6). Adicionalmente, a visualização por microscopia óptica do efeito causado pelo (s) composto (s) presente (s) no DE de *C. ensiformis* sobre J₂ de *M. incognita* revelou a ruptura da anatomia normal (Fig. 7 - A, B, C e D) com a formação de vários vacúolos ao longo do corpo retesado do nematoide. As alterações sugerem a desestruturação de tecidos do intestino do fitoparasita.

Tabela 1 - Resultados obtidos nos ensaios de especificidade conduzidos *in vitro* utilizando concentrações diferentes de DE de *C. ensiformis* contra fungo, bactéria, larvas de inseto e nematoide. Os bioensaios foram realizados em triplicata. A = Fungo, B = Bactéria, C = Larvas de inseto e D = Nematoide.

Patógeno	µg de DE de <i>C. ensiformis</i> /Bioensaio	Atividade
^A <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausencia de halo
^A <i>Fusarium solani</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausencia de halo
^A <i>Macrophomina phaseoline</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausencia de halo
^B <i>Bacillus subtilis</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausencia de halo
^C <i>Anthonomus grandis</i> (Larva)	1000	Inócuo - Desenvolvimento normal
^C <i>Spodoptera frugiperda</i> (larva)	1000	Inócuo - Desenvolvimento normal
^D Nematoide Saprofítico	500	Inócuo
^D <i>Meloidogine incognita</i>	500	Nematicida

A purificação do DE via HPLC utilizando colunas de fase reversa C18 permitiu a separação de três frações nematicidas e duas nematostáticas. Todas as etapas foram monitoradas por bioensaios para a avaliação da atividade nematotóxica (Fig. 8 A, B e C). As frações ativas foram analisadas por *Metabolite profiling* utilizando-se as técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e ressonância magnética nuclear (¹H RMN). Os dados gerados por essas tecnologias somados a uma vasta pesquisa na literatura permitiram a identificação de nove compostos com ação nematotóxica.

Neste contexto, compostos produzidos comercialmente com funções biológicas identificadas após pesquisa na literatura e presentes nas frações nematotóxicas de *C. ensiformis* foram testados em bioensaio contra juvenis de *M. incognita* (Fig. 9A) Solução de glicose contendo 10% (P/V) foi capaz de paralisar a maioria dos nematoides após um período de exposição de 48 horas (Fig. 9A). Depois do ensaio de recuperação, 87% dos J2 restabeleceram a mobilidade confirmando a atividade nematostática para a concentração de glicose aplicada (Fig. 9B). No entanto, soluções de glicose contendo de 20% (P/V) exibiram um efeito nematicida matando mais de 90 % dos J2 após 48 horas de exposição (Fig. 9B). O carboidrato vegetal D-pinitol não exibiu nenhum efeito tóxico após 48 horas de exposição contra J2 de *M. incognita* usando concentrações de 80µg/300µL e 150µg/300µL respectivamente (Fig. 9A). Similarmente, o amino ácido não proteico L-canavanina também não apresentou nenhuma atividade nematotóxica para concentração de 80µg/300µL após 48 horas de exposição (Fig. 9A). Contudo, quando aumentada à concentração para 150µg/300µL, 25% dos juvenis permaneceram paralisados após o ensaio de recuperação confirmando uma discreta atividade nematicida (Fig. 9B). Dentre os ácidos orgânicos málico, cítrico, cis-aconítico, trans-aconítico e palmítico somente os dois últimos foram capazes de paralisar 90 e 98% dos J2 de *M. incognita* para concentração de 80µg/300µL após 48 horas de exposição (Fig. 9A). Os demais ácidos orgânicos paralisaram um percentual muito baixo de J2 para essa mesma concentração e tempo de exposição (Fig. 9A). Para concentração de 150µg/300µL o ácido *trans*-aconítico apresentou atividade nematicida de 98% enquanto os ácidos málico, cítrico e *cis*-aconítico exibiram um efeito nematicida de apenas 18, 25 e 40% após o ensaio de recuperação (Fig. 9B). Por outro lado, o ácido palmítico demonstrou um efeito nematostático para ambas as concentrações avaliadas com 90% dos J2 recuperando a mobilidade após o teste de recuperação (Fig. 9B). Estes resultados mostram claramente um efeito dose dependente dos ácidos orgânicos testados. Os amino ácidos L-fenilalanina e L-triptofano não foram capazes de afetar os J2 utilizando as concentrações de 80µg/300µL e 150µg/300µL respectivamente (Fig. 9A). Inversamente, o composto S-carboximetilcisteína paralisou ao redor de 90% dos juvenis após 48 horas de exposição para ambas as concentrações 80µg/300µL e 150µg/300µL (Figura 9A). Ensaio de recuperação confirmou o efeito nematostático com a maioria dos J2 recobrando a movimentação (Fig. 9B). Xantotoxina paralisou 87% dos J2 após 48 horas de exposição tanto para a concentração de 80µg/300µL

quanto para a de 150µg/300µL (Fig. 9A). Os J2 submetidos ao ensaio de recuperação utilizando ambas as concentrações não recuperaram a mobilidade confirmando o efeito nematicida (Fig. 9B).

5 Visando obter uma composição nematotóxica a partir dos compostos com atividade nematotóxica detectados nos experimentos anteriores, os compostos glicose (5), ácido trans-aconítico (4), S-carboximetilcisteína (3) e ácido palmítico (2) foram testados através da realização de experimentos *in vitro* em diferentes combinações. Apesar da xantotoxina demonstrar ação nematicida, a mesma não foi selecionada para os referidos testes devido ao elevado custo e a dificuldade da sua síntese química.

10 As composições contendo combinações de compostos ativos foram testadas através da realização de bioensaios *in vitro* contra juvenis de *M. incognita*. Os compostos ativos utilizados nos experimentos realizados foram obtidos comercialmente.

As composições testadas foram:

- a) glicose + S-carboximetilcisteína (0,25 g/L de cada composto)
- 15 b) glicose + ácido palmítico (0,25 g/L de cada composto)
- c) S-carboximetilcisteína + ácido palmítico (0,25 g/L de cada composto)
- d) S-carboximetilcisteína + ácido trans-aconítico (0,25 g/L de cada composto)
- e) ácido palmítico + ácido trans-aconítico (0,25 g/L de cada composto)
- f) glicose + S-carboximetilcisteína + ácido palmítico (0,17 g/L de cada composto)
- 20 g) glicose + ácido palmítico + ácido trans-aconítico (0,17 g/L de cada composto)
- h) S-carboximetilcisteína + ácido trans-aconítico + ácido palmítico (0,17 g/L de cada composto)
- i) glicose + S-carboximetilcisteína + ácido trans-aconítico + ácido palmítico (0,125 g/L de cada composto)

25 Os resultados obtidos através dos testes realizados com as composições de a) até i) são mostrados nas Figuras 10 (A) e (B) e comentados a seguir. Como pode ser observado através da Figura 10A, as composições b), e), f), g), h) e i) apresentaram, inesperadamente, efeito nematotóxico sinérgico no que se refere à paralisação dos nematoides quando comparada com a soma dos resultados obtidos individualmente por cada composto ativo.

30 As referidas comparações são mostradas nas Tabelas 2 a 7 a seguir:

Tabela 2 – Efeito nematotóxico sinérgico obtido após testes com a composição b

Composto ativo ou composição	Concentração (g/L)	% nematoides paralisados
Glicose	0,25	0,71
Ácido palmítico	0,25	33,86
Composição glicose + ácido palmítico	0,25 (de cada composto)	76,27

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela composição b) correspondeu a um efeito nematostático.

Tabela 3 – Efeito nematotóxico sinérgico obtido após testes com a composição c

Composto ativo ou composição	Concentração (g/L)	% nematoides paralisados
Ácido trans-aconítico	0,25	27,08
Ácido palmítico	0,25	33,86
Composição glicose + ácido palmítico	0,25 (de cada composto)	99,05

5 A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela composição e) foi um efeito nematostático.

Tabela 4 – Efeito nematotóxico sinérgico obtido após testes com a composição f

Composto ativo ou composição	Concentração (g/L)	% nematoides paralisados
Glicose	0,17	0
Ácido palmítico	0,17	7,66
S-carboximetilcisteína	0,17	43,03
Composição glicose + ácido palmítico + S-carboximetilcisteína	0,17 (de cada composto)	98,61

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela composição f) foi um efeito nematostático

Tabela 5 – Efeito nematotóxico sinérgico obtido após testes com a composição g

Composto ativo ou composição	Concentração (g/L)	% nematoides paralisados
Glicose	0,17	0
Ácido palmítico	0,17	7,66
Ácido trans-aconítico	0,17	11,12
Composição glicose + ácido palmítico + ácido trans-aconítico	0,17 (de cada composto)	60,2

5 A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela composição g) foi um efeito nematostático

Tabela 6 – Efeito nematotóxico sinérgico obtido após testes com a composição h

Composto ativo ou composição	Concentração (g/L)	% nematoides paralisados
S-carboximetilcisteína	0,17	43,03
Ácido palmítico	0,17	7,66
Ácido trans-aconítico	0,17	11,12
Composição S-carboximetilcisteína + ácido palmítico + ácido trans-aconítico	0,17 (de cada composto)	99,32

10 A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela composição h) foi um efeito nematostático

Tabela 7 – Efeito nematotóxico sinérgico obtido após testes com a composição l

Composto ativo ou composição	Concentração (g/L)	% nematoides paralisados
S-carboximetilcisteína	0,125	<43,03
Glicose	0,125	0
Ácido trans-aconítico	0,125	<11,12
Ácido palmítico	0,125	<7,66
Composição S-carboximetilcisteína + ácido palmítico + ácido trans-aconítico + glicose	0,125 (de cada composto)	100

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela composição i) foi um efeito nematostático.

5 As composições nematotóxicas a), c), d) cujos resultados dos ensaios in vitro são também mostrados nas Figuras 10A e 10B e não apresentaram efeito nematotóxico sinérgico significativo.

REINVIDICAÇÕES

1. Composição nematotóxica de efeito sinérgico caracterizada pelo fato de que compreende como compostos ativos:
 - ácido palmítico,
 - 5 • ácido trans-aconítico e/ou glicose e, opcionalmente,
 - S-carboximetilcisteína.
2. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato de que compreende ingredientes de formulação.
3. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com as reivindicações 1 ou
10 2 caracterizada pelo fato de que se apresenta na forma de soluções, emulsões, pós umectáveis, suspensões, pós, poeiras, pastas, pós solúveis, grânulos, concentrados de suspensão-emulsão, materiais naturais e sintéticos impregnados com os compostos ativos e encapsulações.
4. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das
15 reivindicações anteriores caracterizada pelo fato de que os ingredientes de formulação são veículos líquidos/solventes líquidos e/ou veículos sólidos e/ou surfactantes/espalhantes e/ou agentes de pegajosidade/adesivos e/ou corantes.
5. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 4
20 caracterizada pelo fato de que os veículos líquidos/solventes líquidos são selecionados dentre solventes aromáticos, solventes aromáticos clorados ou hidrocarbonetos alifáticos clorados, hidrocarbonetos alifáticos, frações de petróleo, óleos minerais, óleos vegetais, álcoois e seus éteres e ésteres, cetonas, solventes fortemente polares e água.
6. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5
25 caracterizada pelo fato de que os solventes aromáticos são selecionados dentre xileno, tolueno ou alquilnaftalenos
7. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5
30 caracterizada pelo fato de que os solventes aromáticos clorados ou hidrocarbonetos alifáticos clorados são selecionados dentre clorobenzeno, cloroetileno ou diclorometano.

8. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato de que os hidrocarbonetos alifáticos são selecionados dentre ciclohexano ou parafinas.
- 5 9. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato de que os álcoois são selecionados dentre etanol, propanol, butanol ou glicol.
10. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato de que as cetonas são selecionadas dentre propanona, metil etil cetona, metil isobutil cetona ou ciclohexanona.
- 10 11. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato de que os solventes fortemente polares são selecionados dentre dimetilformamida e sulfóxido de dimetila.
12. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11 caracterizada pelo fato de que os veículos sólidos são
15 selecionados dentre sais de amônio, ureia, calcáreos, fosfatos, potássio, fertilizantes NPK, minerais naturais moídos, minerais sintéticos moídos e matéria orgânica.
13. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 12 caracterizada pelo fato de que os minerais naturais moídos são selecionados dentre caulins, argilas, talco, giz, quartzo, atapulgita, montmorilonita e terra diatomácea.
- 20 14. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 12 caracterizada pelo fato de que os minerais sintéticos moídos são selecionados dentre sílica, alumina e silicatos.
15. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11 caracterizada pelo fato de que os veículos sólidos para
25 grânulos são selecionados dentre rochas naturais trituradas, grânulos sintéticos e grânulos de material orgânico.
16. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 15 caracterizada pelo fato de que os surfactantes/espalhantes são emulsificantes e/ou dispersantes e/ou formadores de espuma.
- 30 17. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 16 caracterizada pelo fato de que os emulsificantes são selecionados dentre emulsificantes catiônicos, não iônicos e aniônicos.

18. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 17 caracterizada pelo fato de que os emulsificantes não iônicos e aniônicos são selecionados dentre ésteres graxos de polioxietileno, éteres graxos de polioxietileno, alquil sulfonatos, alquil sulfatos, aril sulfonatos, e hidrolisados de proteína.
- 5
19. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 16 caracterizada pelo fato de que os dispersantes são selecionados dentre metilcelulose e refugo de lignina sulfito.
20. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 19 caracterizada pelo fato de que os agentes de pegajosidade/adesivos são selecionados dentre carboximetilcelulose, polímeros naturais e polímeros sintéticos
- 10
21. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 20 caracterizada pelo fato de que os corantes são selecionados dentre pigmentos inorgânicos e corantes orgânicos
- 15
22. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada pelo fato de que compreende outros compostos ativos.
23. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 22 caracterizada pelo fato de que os outros compostos ativos são selecionados dentre inseticidas, atratores, agentes esterilizadores, bactericidas, acaricidas, nematicidas, fungicidas, substâncias reguladoras do crescimento, herbicidas e compostos protetores de herbicidas (safeners).
- 20
24. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada pelo fato de que a composição é uma composição aquosa.
- 25
25. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo fato de que a composição aquosa contém ácido palmítico e ácido trans-aconítico nas concentrações de 0,25 g/L cada.
- 30
26. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo fato de que a composição aquosa contém ácido palmítico e glicose nas concentrações de 0,25 g/L cada.

27. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo fato de que a composição aquosa contém ácido palmítico, ácido trans-aconítico e glicose nas concentrações de 0,17 g/L cada.
- 5 28. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo fato de que a composição aquosa contém ácido palmítico, ácido trans-aconítico e S-carboximetilcisteína nas concentrações de 0,17 g/L cada.
29. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo fato de que a composição aquosa contém ácido palmítico, glicose e S-carboximetilcisteína nas concentrações de 0,17 g/L cada.
- 10 30. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo fato de que a composição aquosa contém ácido palmítico, ácido trans-aconítico, glicose e S-carboximetilcisteína nas concentrações de 0,125 g/L cada.
- 15 31. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 30 caracterizado pelo fato de que é para controlar nematoides.
32. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato de que é para controlar nematoides em plantas e/ou partes de plantas.
- 20 33. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato de que é para controlar nematoides em solos.
34. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33 caracterizada pelo fato de que é aplicado na planta e/ou partes da planta e/ou no solo e/ou em utensílios.
- 25 35. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 34 caracterizado pelo fato de que é para controlar *Meloigogyne incognita*.

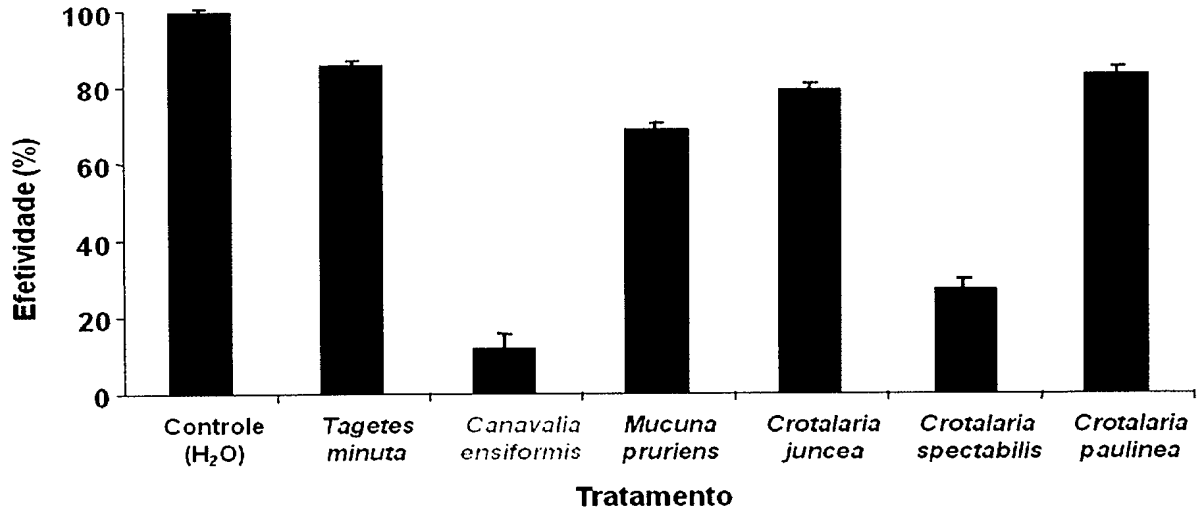


FIG.1

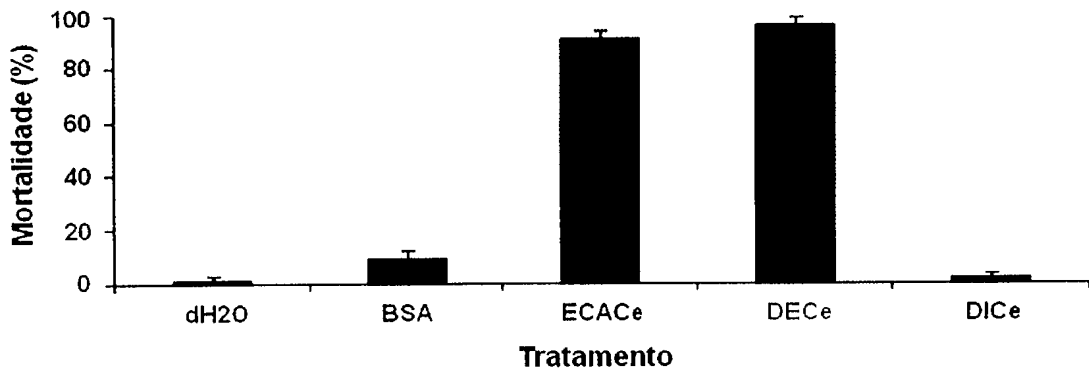


FIG.2

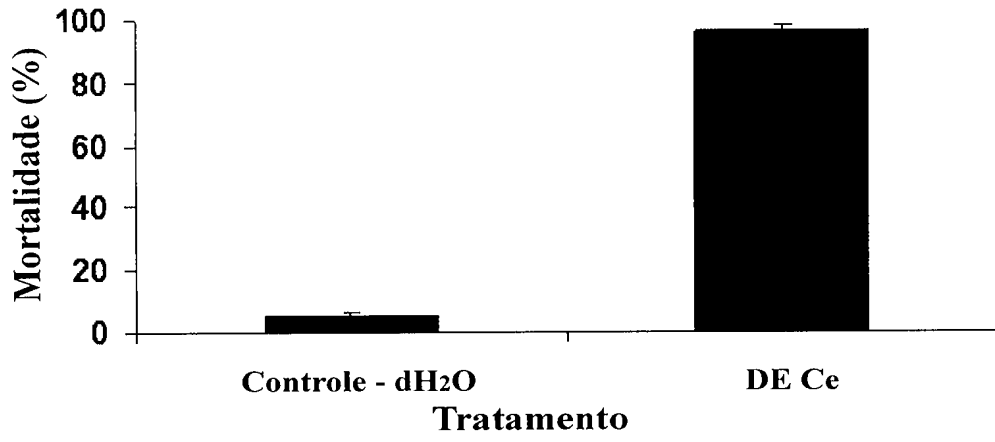


FIG. 3

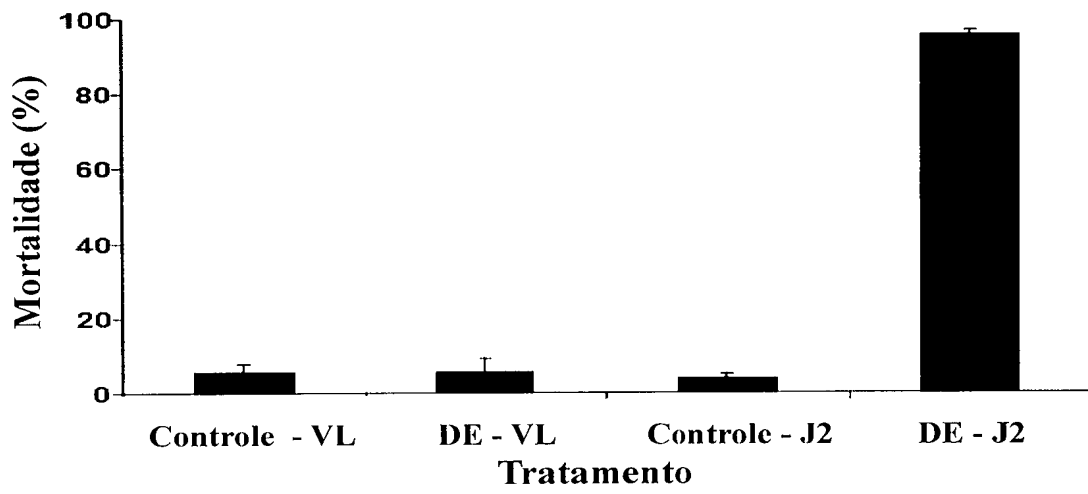


FIG. 4

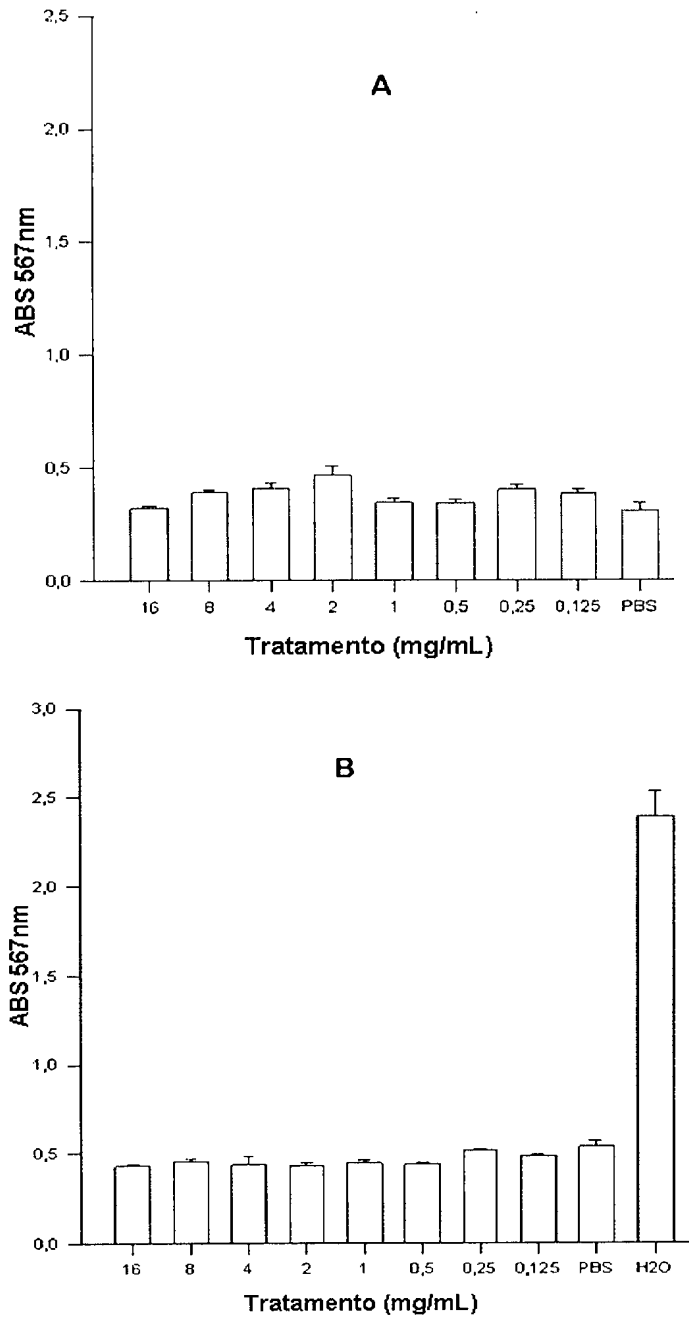


FIG. 5

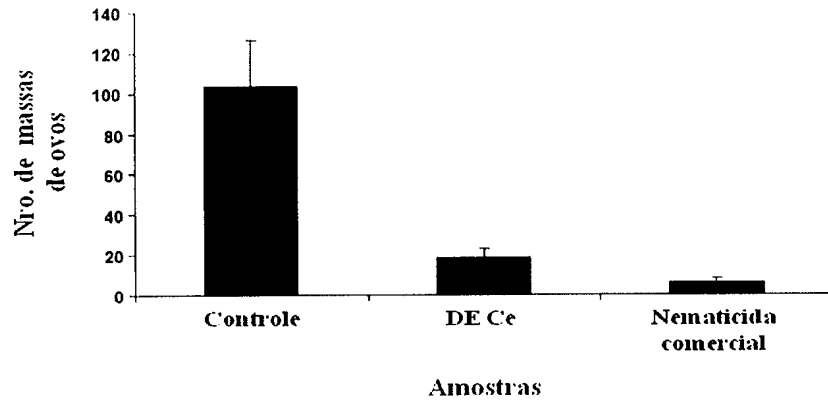


FIG. 6

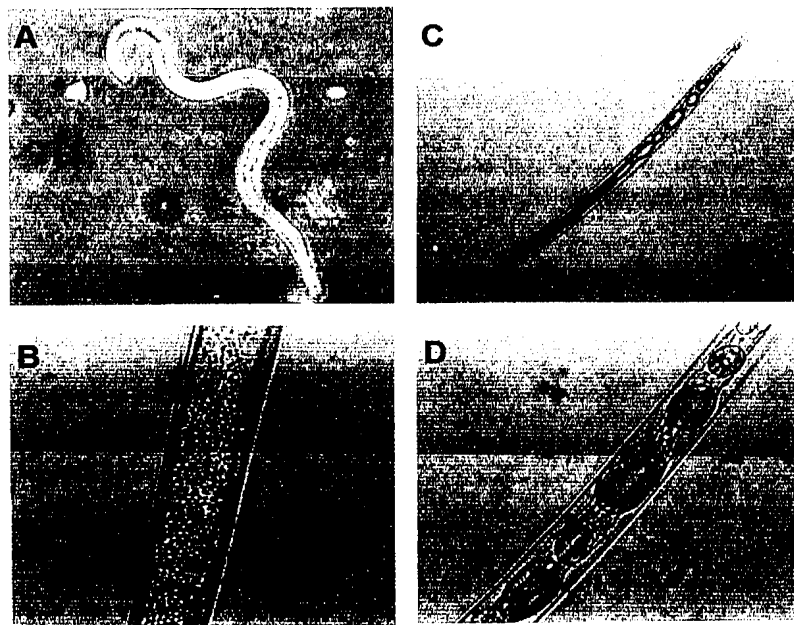


FIG. 7

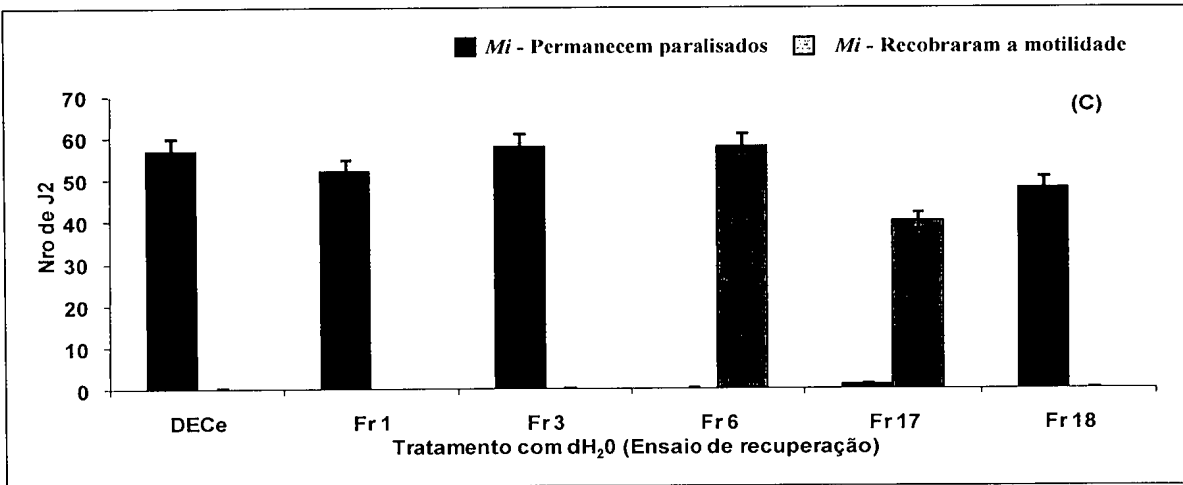
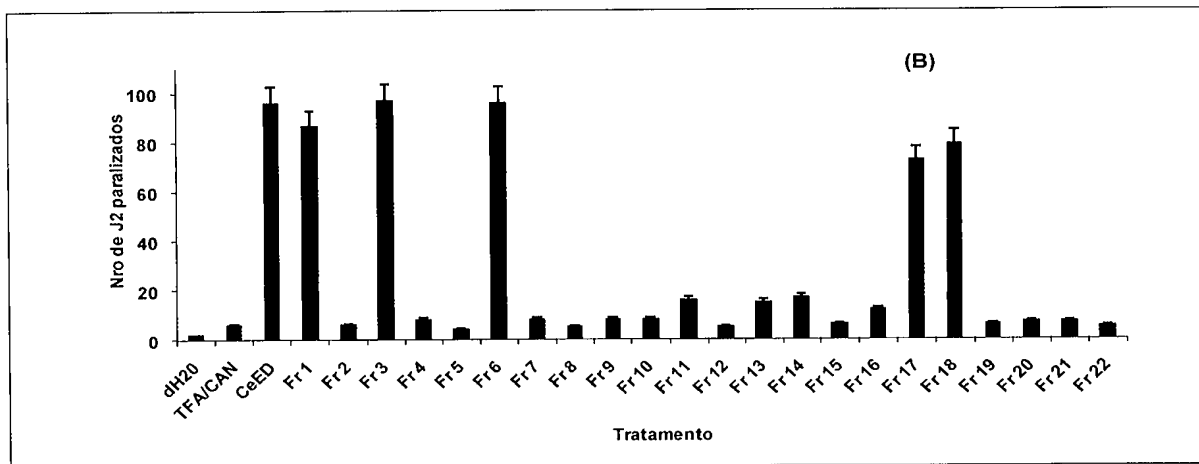
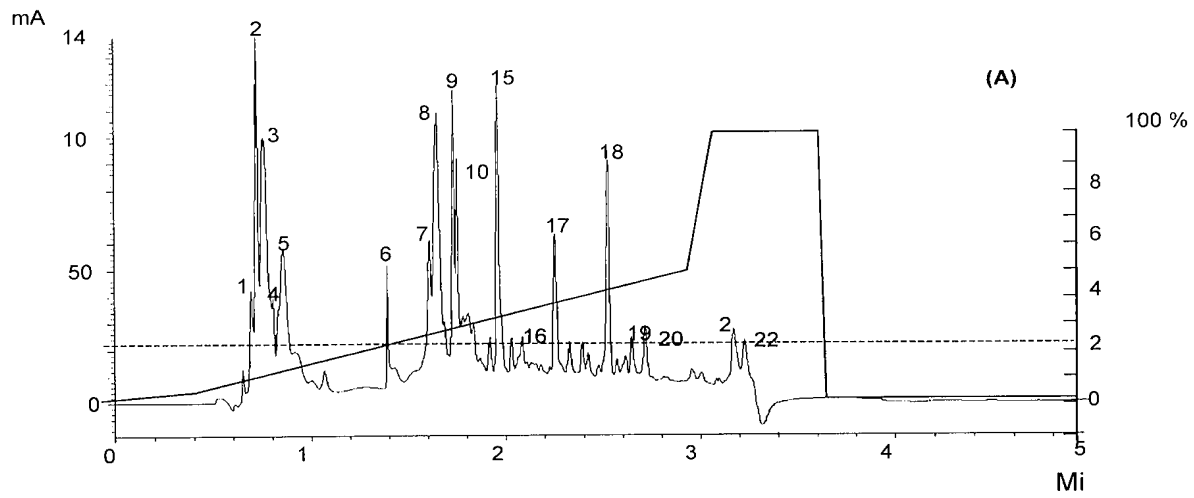


FIG. 8

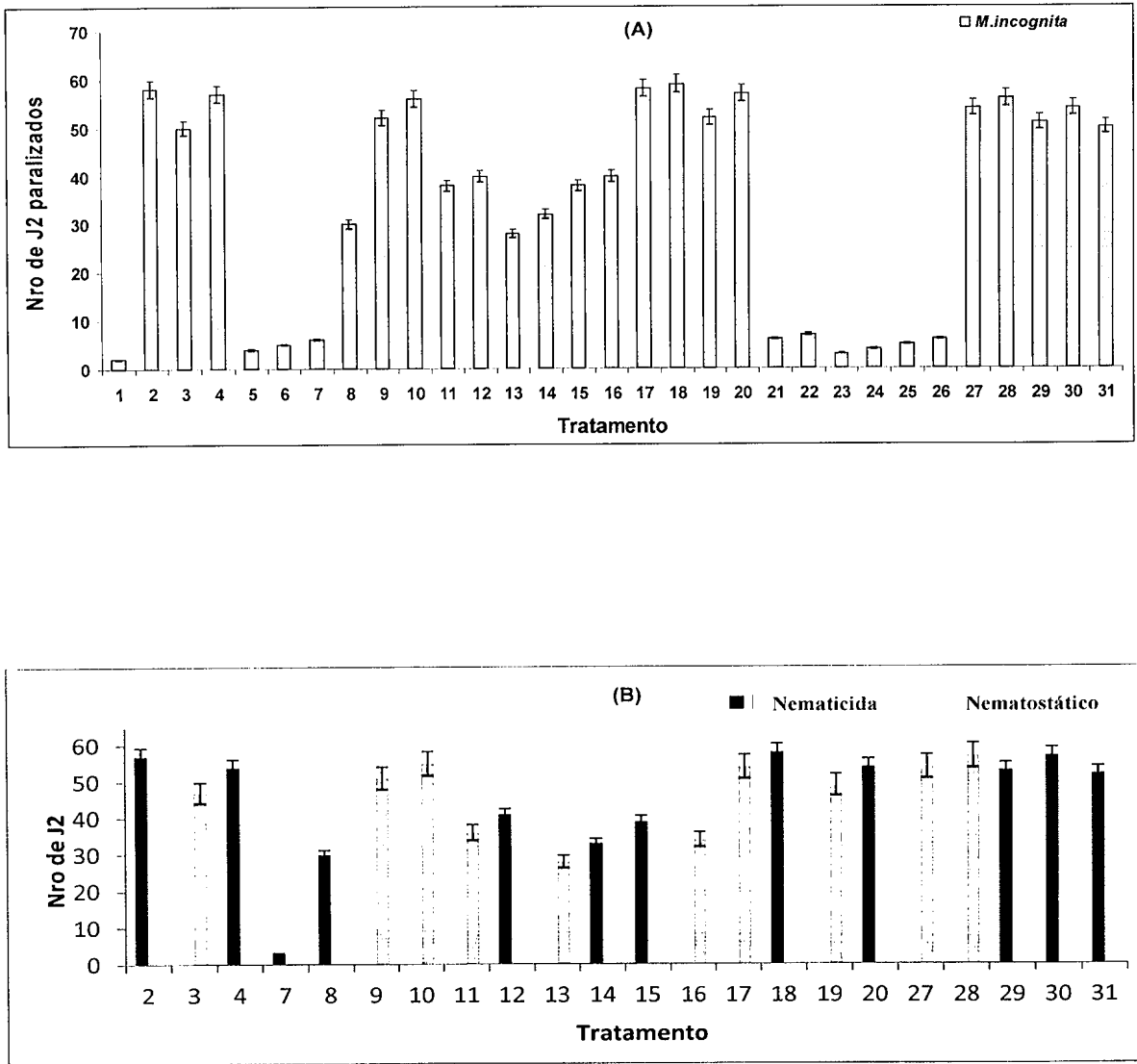


FIG. 9

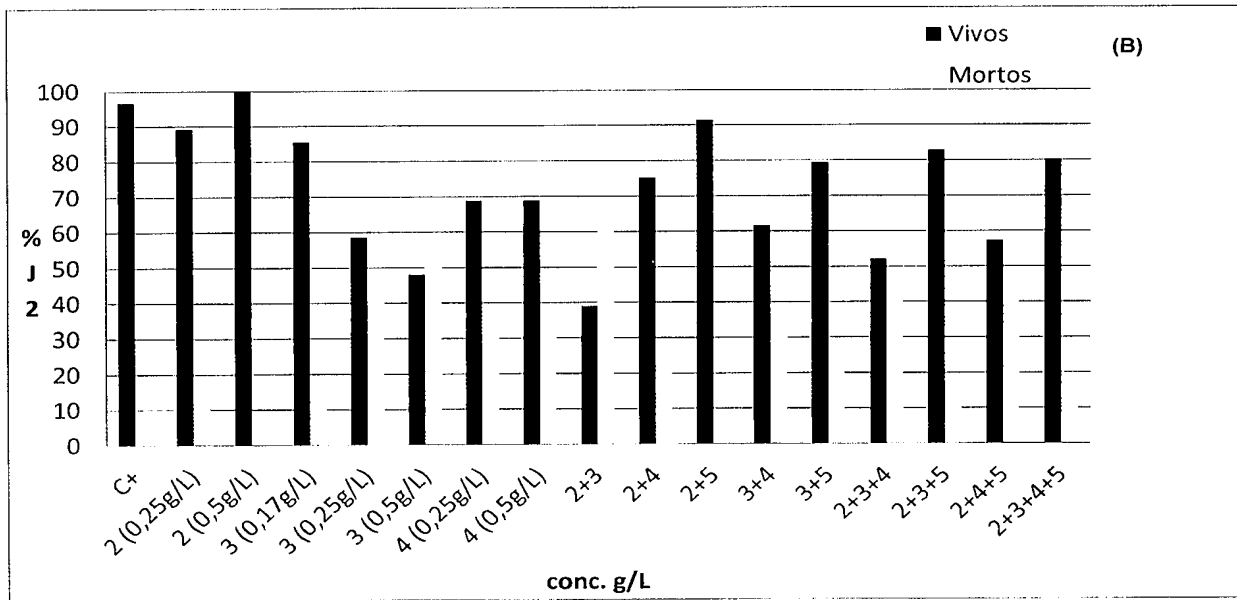
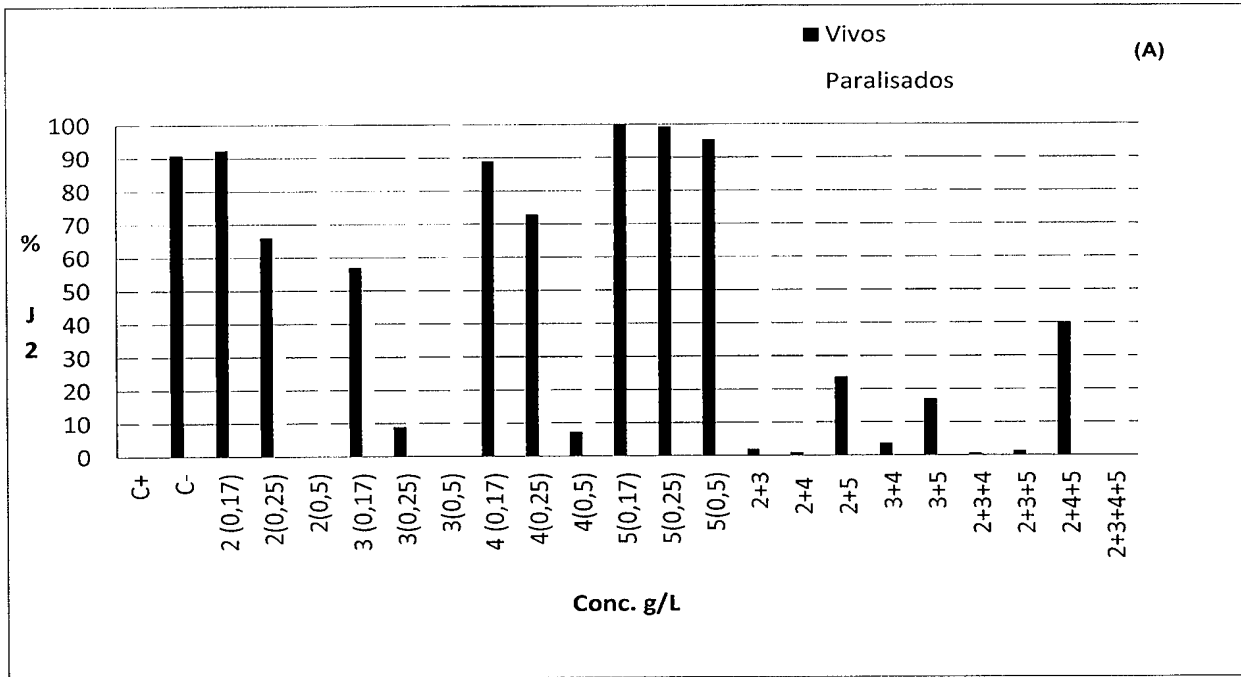


FIG. 10

RESUMO**“COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO, USO DE COMPOSIÇÃO NEMATOTÓXICA DE EFEITO SINÉRGICO”**

A presente invenção se refere genericamente a composições utilizadas para controle de pragas agrícolas e, em uma modalidade particular, a composições utilizáveis no combate a nematoides.

A invenção apresenta uma alternativa viável ao uso dos compostos nematotóxicos danosos ao meio ambiente e que podem prejudicar a saúde humana. Esta alternativa é concretizada através de uma composição nematotóxica para o controle de nematoides e que pode ser utilizada em plantas, parte de plantas, solo e utensílios. A respectiva tecnologia advém de resultados inesperados obtidos a partir de experimentos realizados com extratos da planta *Canavalia ensiformis* resultando em uma composição sintética nematotóxica inédita compreendendo uma combinação específica de substâncias naturalmente encontradas no extrato e que atuam sinergicamente.