

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
3 de Julho de 2014 (03.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2014/100874 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A01N 25/32 (2006.01) A01N 33/04 (2006.01)
A01N 31/02 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2013/000598

(22) Data do Depósito Internacional :
26 de Dezembro de 2013 (26.12.2013)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR 10 2012 0331462
26 de Dezembro de 2012 (26.12.2012) BR

(71) Requerente : EMPRESA BRASILEIRA DE
PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA [BR/BR];
Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Edifício Sede, Plano
Piloto, 70770-901 - Brasília - DF (BR).

(72) Inventor; e

(71) Requerente : THE UNIVERSITY OF MELBOURNE
[AU/AU]; victoria 3010 (AU).

(72) Inventores : LIMA ROCHA, Thales; Av. Flamboyant,
Lote 8, Apto. 303, Água Claras, 71917-000 - Brasília - DF
(BR). GARCIA DE SOUSA EVARISTO, Raphael;

QND 25 CS 34, Taguatinga, 70770-917 - Brasília - DF
(BR). GROSSI DE SÁ, Maria Fátima; SCENTR 01, BI
H, Apto.306, Conj. 36, Lago Sul, 70800-110 - Brasília -
DF (BR). DOS SANTOS DE LIMA E SOUZA, Djair;
Rua Engenheiro José Rocha, 3413, 59065-260 Natal, RN
(BR). MATTAR DA SILVA, Maria F Cristina; AOS 2
Bloco A Ap.403 - Octogonal, 70660-021, Brasília, DF
(BR). PERUSSI POLEZ, Vera Lúcia; SQS 103, Bloco K,
Apto. 108, 70342-110 Brasília, DF (BR). ROESSNER,
Ute; c/o University of Melbourne, Victoria 3010 (AU).
BACIC, Tony; c/o University of Melbourne, Victoria
3010 (AU).

(74) Mandatário : DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER &
IPANEMA MOREIRA; Caixa Postal 2142, Rua Marquês
de Olinda, 70, 22251-040 - Rio de Janeiro -RJ (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : NEMATICIDE COMPOSITION WITH A SYNERGISTIC EFFECT, USE OF NEMATICIDE COMPOSITION WITH
A SYNERGISTIC EFFECT

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

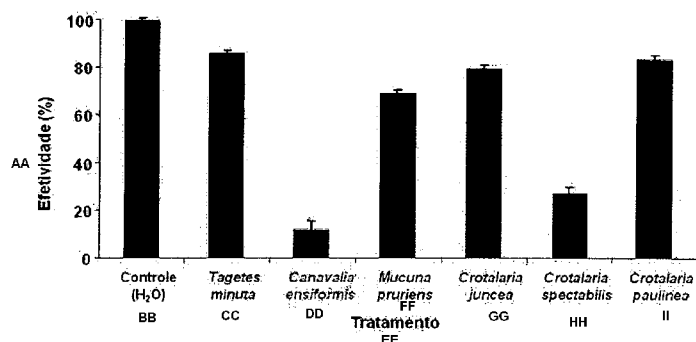


FIG.1

AA Effectiveness (%)
BB Control (H₂O)
CC *Tagetes minuta*
DD *Canavalia ensiformis*
EE Treatment
FF *Mucuna pruriens*
GG *Crotalaria juncea*
HH *Crotalaria spectabilis*
II *Crotalaria paulinea*

(57) Abstract : The present invention generally
relates to compositions used for controlling
agricultural pests and, in a particular
embodiment, to compositions useful for
combatting nematodes. The invention provides
a viable alternative to the use of nematicide
compounds that are harmful to the environment
and can harm human health. This alternative is
embodied by a nematicide composition for
controlling nematodes and which can be used
on plants, plant parts and the soil. The
associated technology originates from the
unexpected results obtained from experiments
carried out with extracts of the plant *Canavalia
ensiformis*, leading to an unprecedented
nematicide composition comprising a specific
combination of substances that are naturally
found in the extract and have a synergistic
action.

(57) Resumo : A presente invenção se refere
genericamente a composições utilizadas para
controle de pragas agrícolas e, em uma
modalidade

(Continua na página seguinte)



TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,

IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

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 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 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
- 15 se mostrado uma tendência mundial principalmente em países que apresentam grande disponibilidade de biomassa.

- 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
- 20 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 ataque de pragas e patógenos. Nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. são endoparasitas sedentários obrigatórios de várias plantas. Os
- 25 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 nematoide *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (Abad, et al., 2008; Bakhetia et al., 2005). Nesse contexto, o *M. incognita* destaca-se
- 30 como a espécie mais expressiva quanto às perdas econômicas (Huang et al., 2006).

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 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 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 (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 alcalóides, terpenos, taninos, flavonóides e glicosídeos (Chitwood, 2002; Ferraz & Freitas, 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 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 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.

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.

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

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

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 e microencapsulações em substâncias poliméricas. 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 e/ou agentes de pegajosidade 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

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.

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 saprofíticos 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 (80ug), 6- D-Pinitol (150ug), 7-L-canavanina (80ug), 8-L-canavanina (150ug), 9- Ácido palmítico (80ug), 10- Ácido palmítico (150ug), 11- Ácido cítrico (80ug), 12- Ácido cítrico (150ug), 13- Ácido málico (80ug), 14-Ácido málico (150ug), 15- Ácido cis-aconítico (80ug), 16- Ácido cis-aconítico (150ug), 17- Ácido trans-aconítico (80ug), 18- Ácido trans-aconítico (150ug), 19- 50mM Tris/HCl pH 8, 20- 50mM Ácido acético pH 5, 21- L-fenilalanina (80ug), 22- L-fenilalanina (150ug), 23 L-metionina (80ug), 24- L-metionina (150ug), 25- L-triptofano (80ug), 26- L-triptofano (150ug), 27- S-carboximetilcisteína (80ug), 28- S-carboximetilcisteína (150ug), 29- Zantotoxina (80ug), 30- Zantotoxina (150ug) e 31- Glicose 20% + L-canavanina (150 ug). 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.

15 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:

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

A composição nematotóxica descrita nesta invenção pode, alternativamente, compreender ingredientes de formulação. A referida composição com ou sem a presença de ingredientes de formulação pode se apresentar na forma de soluções, emulsões, pós umectáveis, suspensões, pós, poeiras, pastas, 5 pós solúveis, grânulos, concentrados de suspensão-emulsão, materiais naturais e sintéticos impregnados com os compostos ativos e microencapsulações em substâncias poliméricas.

Entre os compostos que podem ser utilizados como ingredientes de formulação são incluídos, entre outros, veículos líquidos/solventes líquidos 10 e/ou veículos sólidos e/ou surfactantes e/ou agentes de pegajosidade 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 15 presente 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.

20 Preferencialmente, os solventes aromáticos utilizados na invenção são selecionados 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.

25 Hidrocarbonetos alifáticos são preferencialmente selecionados dentre ciclohexano ou parafinas. No caso alternativo de utilização de álcoois estes são selecionados 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 30 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, minerais naturais moídos e minerais sintéticos moídos.

Preferencialmente, quando utilizados como veículos sólidos, os minerais naturais moídos são selecionados dentre caulins, argilas, talco, giz, quartzo, 5 atapulgita, montmorilonita e terra diatomácea. Quando da utilização de minerais sintéticos moídos, estes são preferencialmente selecionados dentre sílica, alumina e silicatos. Veículos sólidos adequados são utilizados quando a composição nematotóxica da presente invenção é apresentada na forma de grânulos. Estes veículos sólidos adequados são selecionados, 10 preferencialmente, dentre rochas naturais trituradas, grânulos sintéticos e grânulos de material orgânico.

Alternativamente, surfactantes podem ser empregados como ingredientes de formulação para a composição da presente invenção. Os respectivos 15 surfactantes 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 não iônicos e aniônicos, estes são 20 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 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 empregados 30 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).

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.

5 Também objeto da presente invenção é o uso, da composição nematotóxica de efeito sinérgico descrita anteriormente, para o controle de nematoides em plantas. Particularmente, o referido uso ocorre através da aplicação da composição da invenção na planta e/ou partes da planta e/ou no solo.

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
10 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, névoa, espalhamento, etc.

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

Experimentos realizados e resultados obtidos:

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*.
20 Dentre os extratos testados, *Canavalia ensiformis*, 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
25 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, *Fusarium solani* acesso 1624, *Macrophomina phaseolina* acesso 1496 e *Phytophthora tabacum*), bactéria (*Bacillus subtilis*) e larva de
30 inseto (*Antonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*) (Tabela 1); e) inexistência de atividade contra nematoide de vida livre (Fig. 4); ausência de

efeito citotóxico adverso em células vermelhas 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 retezado do nematoide. As alterações sugerem a desestruturação de tecidos do intestino do fitoparasita.

- 10 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 ausência de halo
^A <i>Fusarium solani</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausência de halo
^A <i>Macrophomina phaseoline</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausência de halo
^B <i>Bacillus subtilis</i>	250, 500, 1000	Inócuo - Completa ausência 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

- 15 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
- 20

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. incógnita* (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 protéico 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 paralizaram 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).

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.

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)
- 25 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)
- 30 f) glicose + S-carboximetilcisteína + ácido palmítico (0,17 g/L de cada composto)

- 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)
- 5 i) glicose + S-carboximetilcisteína + ácido trans-aconítico + ácido palmítico (0,125 g/L de cada composto)

Os resultados obtidos através dos testes realizados com as composições a) a i) são mostrados nas Figuras 10 (A) e (B) e comentados a seguir.

- 10 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. As referidas comparações são mostradas nas Tabelas 2 a 7 a seguir:

- 15 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 (de cada composto)	0,25	76,27

- A análise dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação e mostrados na Figura 10B mostra que o efeito nematotóxico sinérgico obtido pela
 20 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 + 0,25 (de cada 99,05		
ácido palmítico composto)		

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.

5

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

Composto ativo ou 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 98,61 composto)

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

trans-aconítico

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

5

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 1

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 + composto	0,125 (de cada composto)	100	

ácido palmítico + ácido
trans-aconítico + glicose

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:
 - 5 • ácido palmítico,
 - ácido trans-aconítico e/ou glicose e, opcionalmente,
 - S-carboximetilcisteína.
2. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a
10 reivindicação 1 caracterizada pelo fato de que compreende ingredientes de formulação.
3. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com as reivindicações 1 ou 2 caracterizada pelo fato de que se apresenta na forma de soluções, emulsões, pós umectáveis, suspensões, pós, poeiras, pastas,
15 pós solúveis, grânulos, concentrados de suspensão-emulsão, materiais naturais e sintéticos impregnados com os compostos ativos e microencapsulações em substâncias poliméricas.
4. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer
20 uma das reivindicações anteriores caracterizada pelo fato de que os ingredientes de formulação são veículos líquidos/solventes líquidos e/ou veículos sólidos e/ou surfactantes e/ou agentes de pegajosidade e/ou corantes.
5. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 4 caracterizada pelo fato de que os veículos líquidos/solventes
25 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
30 reivindicação 5 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 caracterizada pelo fato de que os solventes aromáticos clorados ou hidrocarbonetos alifáticos clorados são selecionados dentre clorobenzeno, cloroetileno ou diclorometano.
- 5 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.
9. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato de que os álcoois são selecionados
- 10 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.
11. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato de que os solventes fortemente
- 15 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 selecionados dentre sais de amônio, minerais naturais moídos e
- 20 minerais sintéticos moídos.
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.
- 25 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
- 30 sólidos para grânulos são selecionados dentre rochas naturais trituradas, grânulos sintéticos e grânulos de material orgânico.

16. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer
5 uma das reivindicações 4 a 15 caracterizada pelo fato de que os
surfactantes são emulsificantes e/ou dispersantes e/ou formadores de
espuma.
17. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a
reivindicação 16 caracterizada pelo fato de que os emulsificantes são
10 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
15 hidrolisados de proteína
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
20 uma das reivindicações 4 a 19 caracterizada pelo fato de que os agentes de
pegajosidade são selecionados dentre carboximetilcelulose , polímeros
naturais e polímeros sintéticos
21. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer
uma das reivindicações 4 a 20 caracterizada pelo fato de que os corantes
25 são selecionados dentre pigmentos inorgânicos e corantes orgânicos
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
30 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).

24. Composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada pelo fato de que a
5 composição é uma composição aquosa.

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.

10 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
15 contém ácido palmítico, ácido trans-aconítico e glicose nas concentrações de 0,17 g/L cada.

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
20 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.

25 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.

31. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico definida em
30 qualquer uma das reivindicações 1 a 30 caracterizado pelo fato de que é para controlar nematoides em plantas.

32. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 31 caracterizada pelo fato de que é aplicado na planta e/ou partes da planta e/ou no solo.

33. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico de acordo com a reivindicação 31 ou 32 caracterizado pelo fato de que é para controlar
5 Meloigogyne incógnita.

1/7

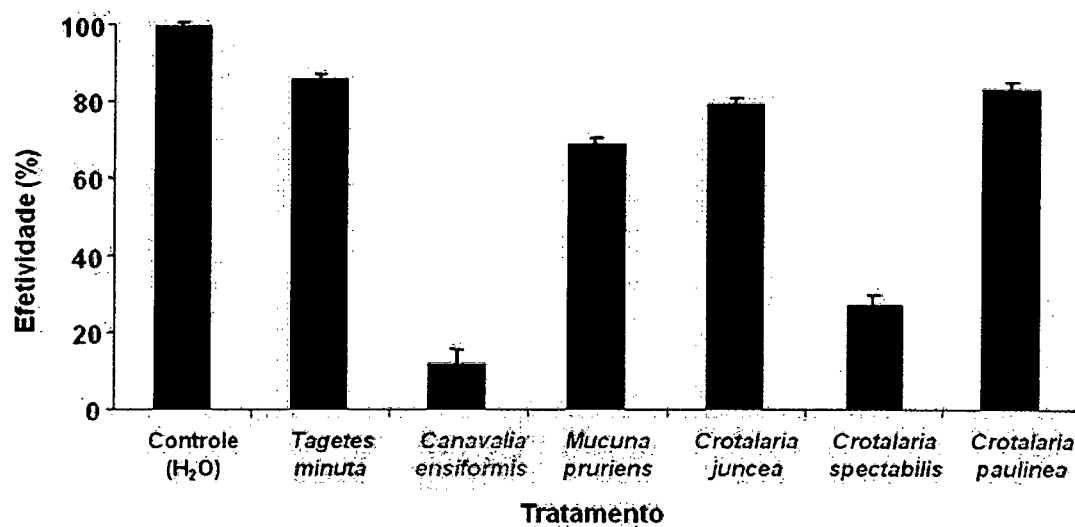


FIG.1

5

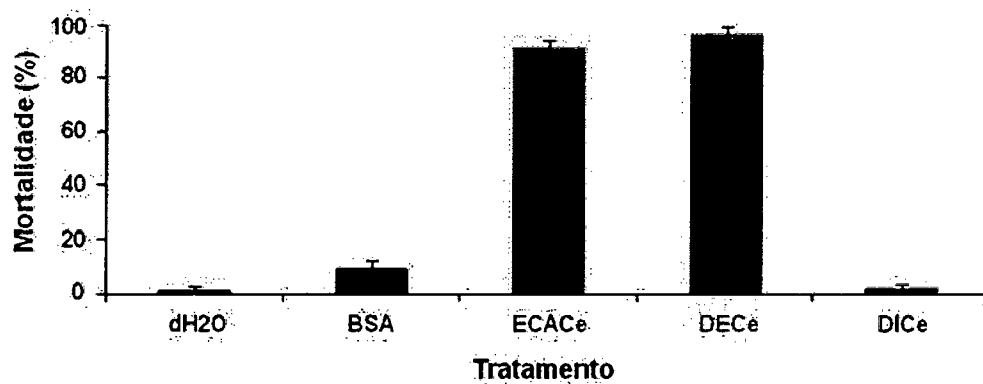


FIG.2

10

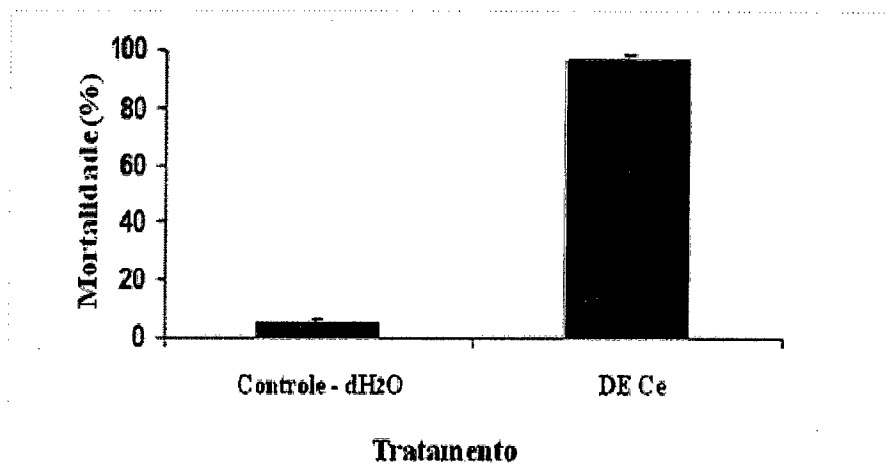


FIG 3

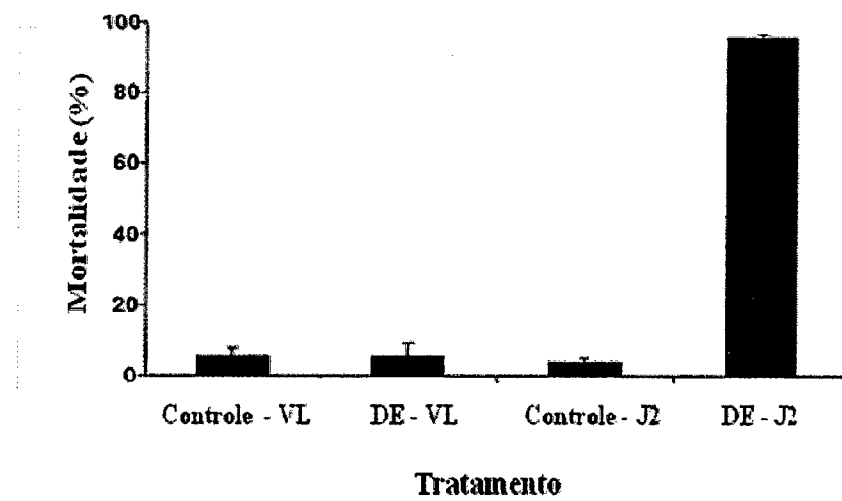


FIG 4

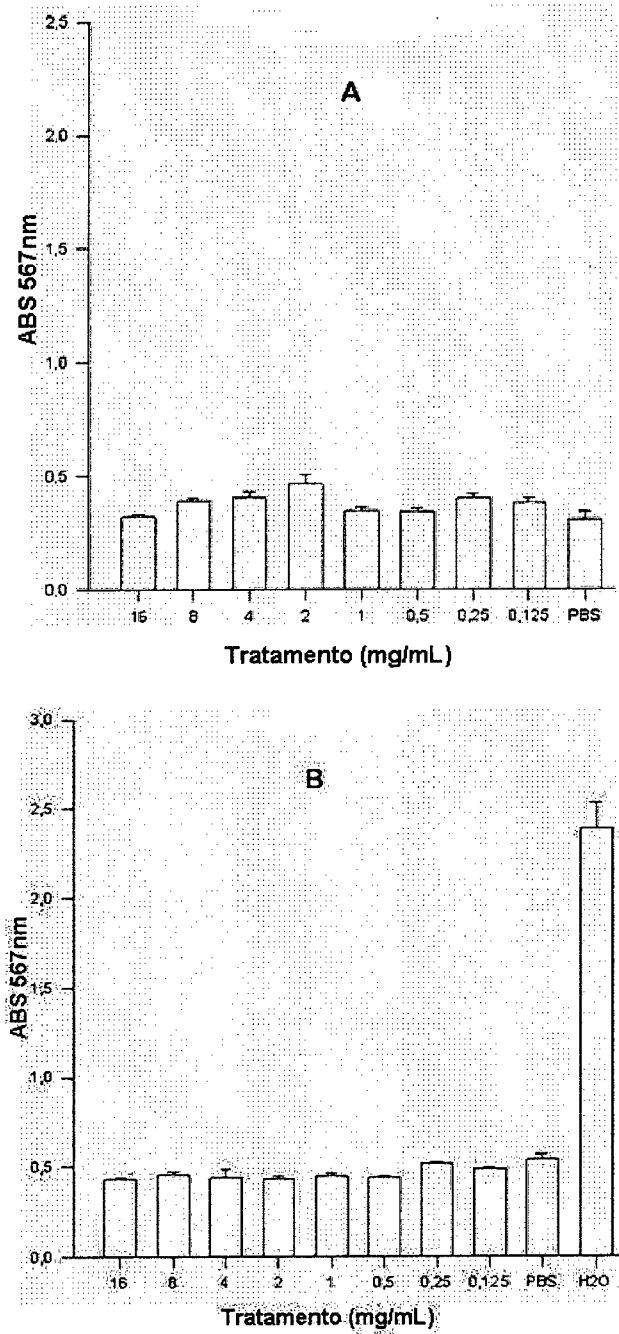


FIG. 5

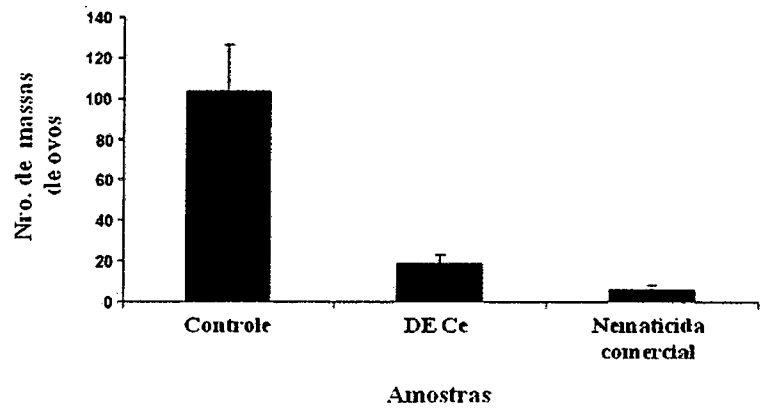


FIG 6

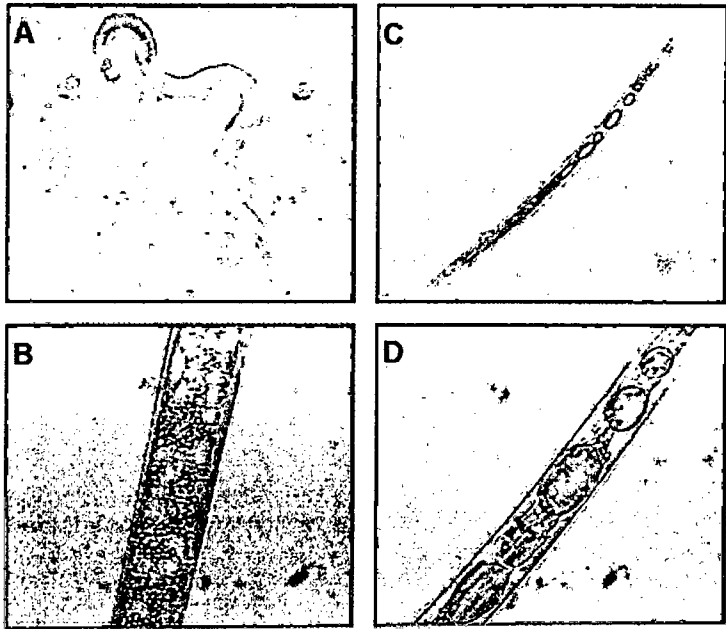


FIG 7

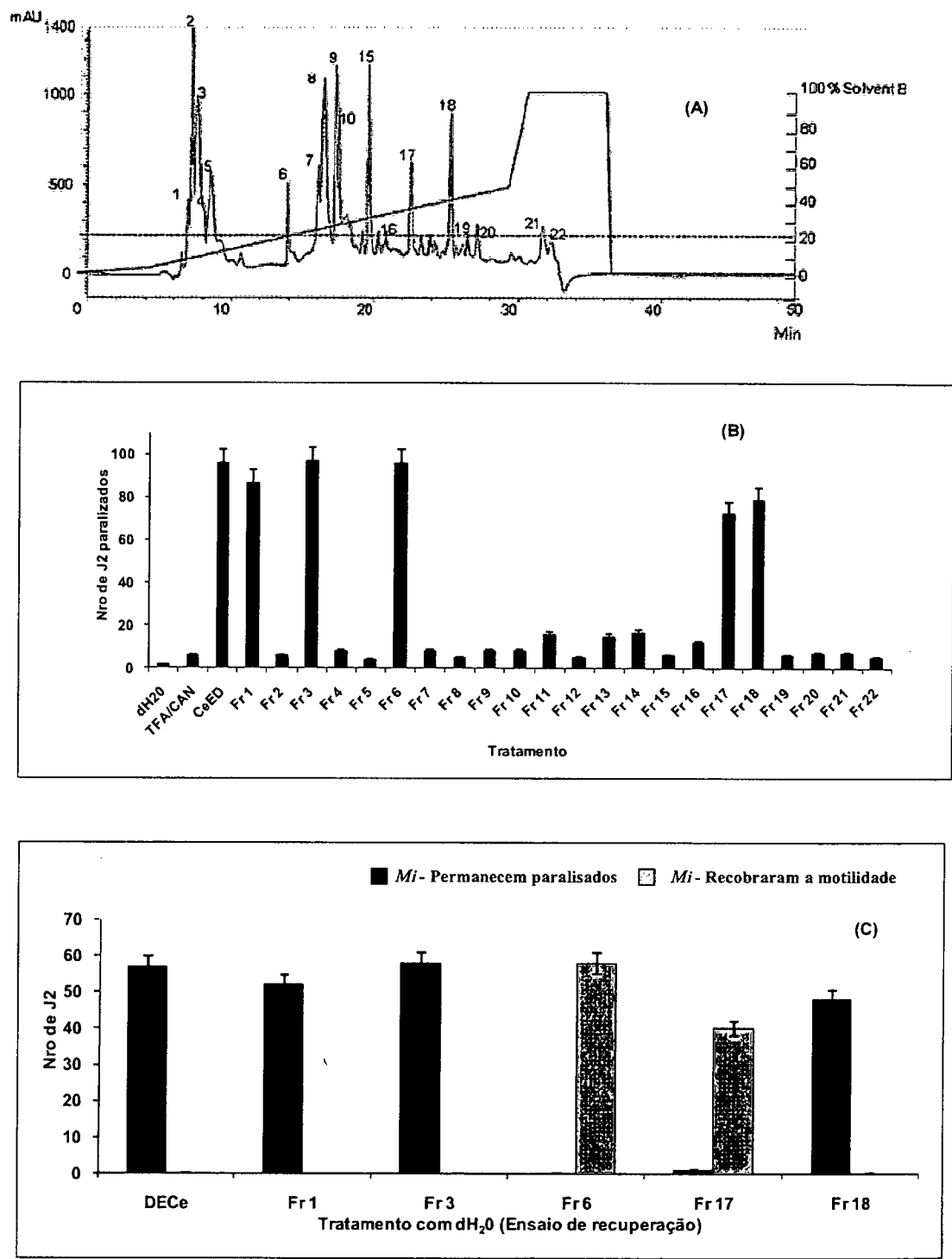
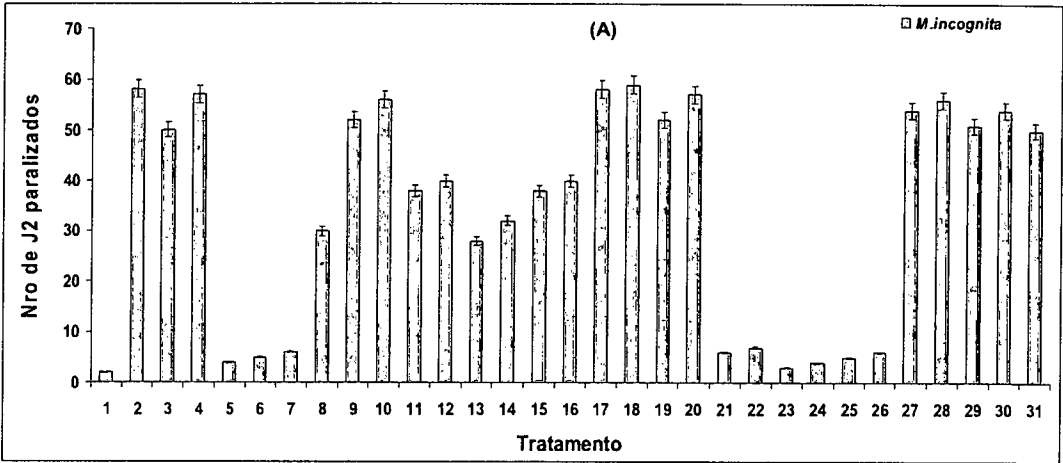
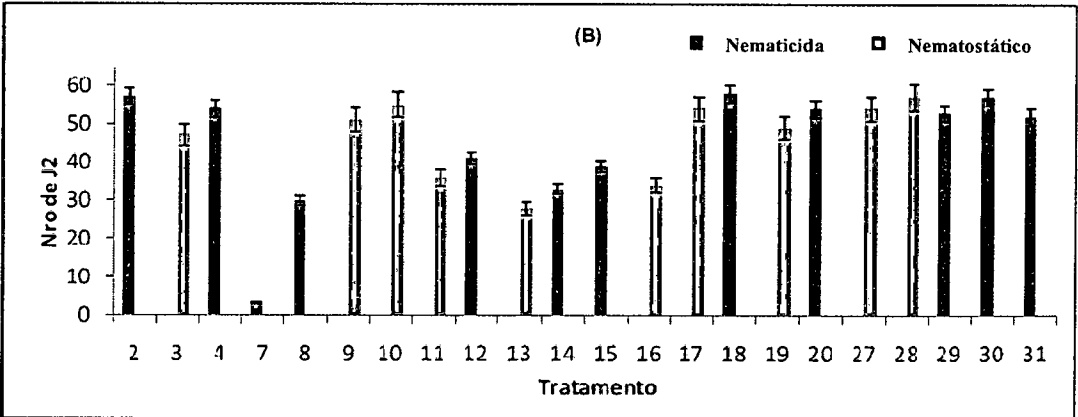


FIG 8



5



10

FIG 9

15

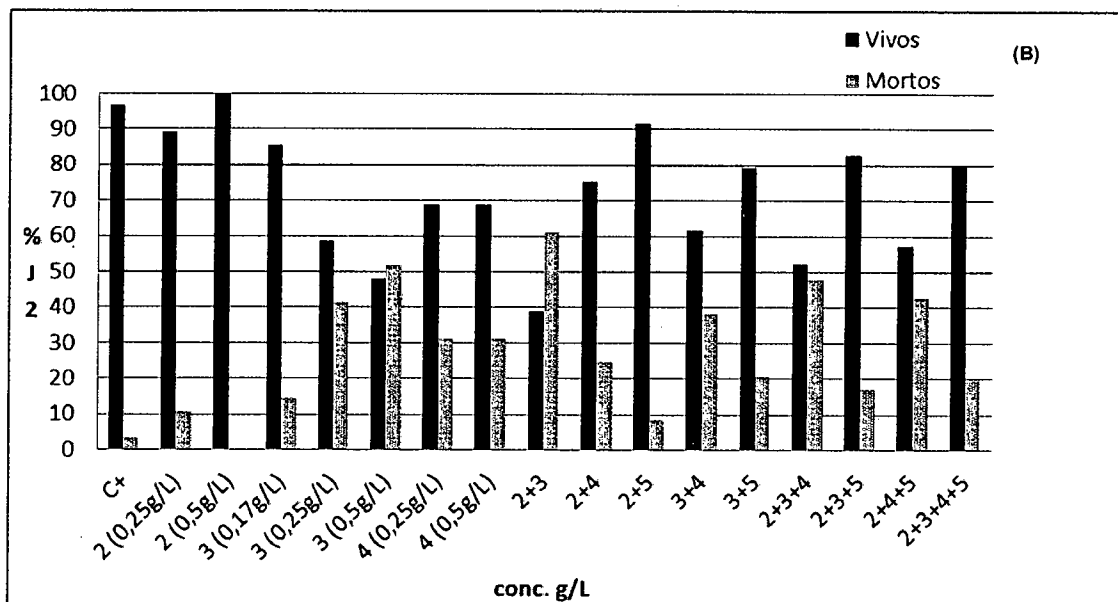
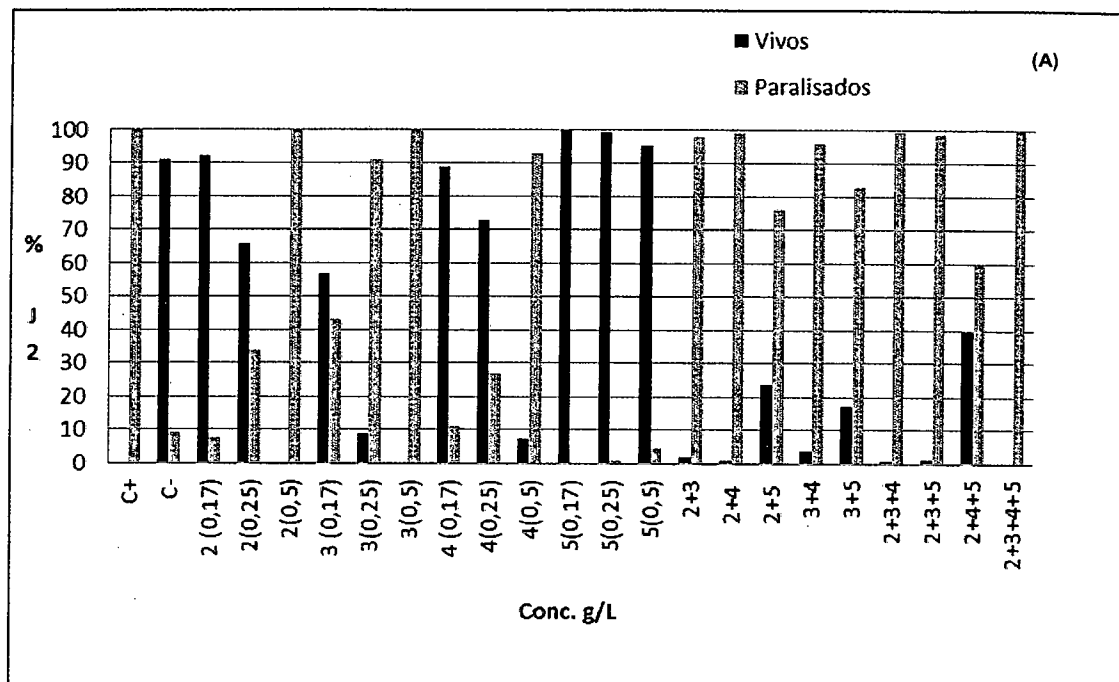


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 25/32 (2006.01), A01N 31/02 (2006.01), A01N 33/04 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, DIALOG

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03075656 A2 (MCLAIRD MERRY B [US]) 18 September 2003 (2003-09-18)	
A	----- US 5192546 A (MYCOGEN CORP [US]) 09 March 1993 (1993-03-09)	
A	----- Stadler, M, et al. Fatty Acids and other compounds with Nematicidal Activity from Cultures of Basidiomycetes, Planta Med. 60 (1994), pgs. 128-132	
A	----- Timmermann, B.N., et al. Identification of nematicidal Fatty Acids and Triglycerides from seeds of <i>Jubaea chilensis</i> by CG-EI-MS and Chemical Tranformation Methods, Z. Naturforsch. 60C, 527-533 (2005)	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04/02/2014

Date of mailing of the international search report

260314

Name and mailing address of the ISA/BR

INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Rua Sao Bento nº 1, 17º andar

Facsimile No. cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

+55 21 3037-3663

Authorized officer

Renata de Melo Aguiar

Telephone No.

+55 21 3037-3984/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000598

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Souza Filho, A.P.S., Atividade Potencialmente alelopática de extratos brutos e hidro-alcoólicos de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>), Planta Daninha, Viçosa-MG, V.20, n.3, p.357-364, 2002.	1-33
A	----- Silva, G.S., et al., Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiro, Fitopatol. Bras. 27(4), 2002.	1-33
A	----- Inomoto, M.M., et al., Reação de seis adubos verdes a <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Pratylenchus brachyurus</i> , Nematol. Bras., vol 30(1), 39-44, 2006.	1-33
A	----- Rocha, T.L., et al., Fracionamento de extrato aquoso de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> , Circular Técnica 78 EMBRAPA, 2008.	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2013/000598

WO 03075656 A2	2003-09-18	AR 038726 A1	2005-01-26
		AU 2003225651 A1	2003-09-22
		CA 2478589 A1	2003-09-18
		CN 1649578 A	2005-08-03
		EP 1480633 A2	2004-12-01
		US 2003166714 A1	2003-09-04
		US 6887900 B2	2005-05-03
		US 2003176402 A1	2003-09-18
		US 6903052 B2	2005-06-07
		US 2004157803 A1	2004-08-12
		US 2008249160 A1	2008-10-09
		WO 03075656 A3	2004-07-08
		WO 2005023989 A2	2005-03-17
US 5192546 A	1993-03-09	AT 183883 T	1999-09-15
		AU 645861 B2	1994-01-27
		AU 6276594 A	1994-09-26
		AU 8883691 A	1992-07-23
		CA 2056352 A1	1992-07-16
		DE 69229885 D1	1999-10-07
		EP 0501026 A1	1992-09-02
		ES 2137156 T3	1999-12-16
		JP H04342506 A	1992-11-30
		JP 3259246 B2	2002-02-25
		US 5346698 A	1994-09-13
		WO 9419947 A1	1994-09-15

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional N°

PCT/BR2013/000598

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A01N 25/32 (2006.01), A01N 31/02 (2006.01), A01N 33/04 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

A01N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, DIALOG

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
A	WO 03075656 A2 (MCLAIRD MERRY B [US]) 18 setembro 2003 (2003-09-18)	1-33
A	US 5192546 A (MYCOGEN CORP [US]) 09 março 1993 (1993-03-09)	1-33
A	Stadler, M, et al. Fatty Acids and other compounds with Nematicidal Activity from Cultures of Basidiomycetes, Planta Med. 60 (1994), pgs. 128-132	1-33
A	Timmermann, B.N., et al. Identification of nematicidal Fatty Acids and Triglycerides from seeds of <i>Jubaea chilensis</i> by CG-EI-MS and Chemical Transformation Methods, Z. Naturforsch. 60C, 527-533 (2005)	1-33

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

04/02/2014

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

260314

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 3037-3663

N° de fax:

Funcionário autorizado

Renata de Melo Aguiar

N° de telefone:

+55 21 3037-3984/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
A	Souza Filho, A.P.S., Atividade Potencialmente alelopática de extratos brutos e hidro-alcoólicos de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>), Planta Daninha, Viçosa-MG, V.20, n.3, p.357-364, 2002.	1-33
A	----- Silva, G.S., et al., Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiro, Fitopatol. Bras. 27(4), 2002.	1-33
A	----- Inomoto, M.M., et al., Reação de seis adubos verdes a <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Pratylenchus brachyurus</i> , Nematol. Bras., vol 30(1), 39-44, 2006.	1-33
A	----- Rocha, T.L., et al., Fracionamento de extrato aquoso de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> , Circular Técnica 78 EMBRAPA, 2008.	1-33

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2013/000598

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 03075656 A2	2003-09-18	AR 038726 A1 AU 2003225651 A1 CA 2478589 A1 CN 1649578 A EP 1480633 A2 US 2003166714 A1 US 6887900 B2 US 2003176402 A1 US 6903052 B2 US 2004157803 A1 US 2008249160 A1 WO 03075656 A3 WO 2005023989 A2	2005-01-26 2003-09-22 2003-09-18 2005-08-03 2004-12-01 2003-09-04 2005-05-03 2003-09-18 2005-06-07 2004-08-12 2008-10-09 2004-07-08 2005-03-17
----- US 5192546 A	----- 1993-03-09	----- AT 183883 T AU 645861 B2 AU 6276594 A AU 8883691 A CA 2056352 A1 DE 69229885 D1 EP 0501026 A1 ES 2137156 T3 JP H04342506 A JP 3259246 B2 US 5346698 A WO 9419947 A1	----- 1999-09-15 1994-01-27 1994-09-26 1992-07-23 1992-07-16 1999-10-07 1992-09-02 1999-12-16 1992-11-30 2002-02-25 1994-09-13 1994-09-15
-----	-----	-----	-----