



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 112013009862-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 112013009862-7

(22) Data do Depósito: 24/10/2011

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/05/2012

(51) Classificação Internacional: A01N 63/02; C07K 5/08; C07K 7/06; C07K 7/64; A01P 7/00.

(52) Classificação CPC: A01N 63/02; C07K 5/08; C07K 7/06; C07K 7/64.

(30) Prioridade Unionista: US 61/406,569 de 25/10/2010.

(54) Título: COMPOSIÇÃO INSETICIDA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UM COMPOSTO E MÉTODO PARA MODULAÇÃO DE INFESTAÇÃO POR PESTE EM UMA PLANTA

(73) Titular: MARRONE BIO INNOVATIONS, INC., Sociedade Norte-Americana. Endereço: 1540 Drew Ave., Davis, CA95618, California, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: RATNAKAR ASOLKAR; HUAZHANG HUANG; MARJA KOIVUNEN; PAMELA MARRONE.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 24/10/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 13/11/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO INSETICIDA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UM COMPOSTO E MÉTODO PARA MODULAÇÃO DE INFESTAÇÃO POR PESTE EM UMA PLANTA**".

5 CAMPO TÉCNICO

São descritos aqui composições bioativas e metabólitos derivados a partir de *Chromobacterium* e particularmente cultura de *Chromobacterium substugae*, responsável por controle de pestes, bem como seus métodos de uso para controle de pestes.

10 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Produtos naturais são substâncias produzidas por micróbios, plantas e outros organismos. Produtos naturais microbianos oferecem uma fonte abundante de diversidade química, e há um longo histórico de utilização de produtos naturais para propósitos farmacêuticos. Apesar da

15 ênfase em produtos naturais para terapêuticos humanos, onde mais de 50% são derivados a partir de produtos naturais, apenas 11% dos pesticidas são derivados a partir de fontes naturais. Entretanto, pesticidas de produto natural têm um potencial para desempenhar um papel importante no controle de pestes tanto em fazendas convencionais quanto em orgâ-

20 nicas. Metabólitos secundários produzidos por micróbios (bactérias, actinomicetos e fungos) proveem compostos químicos novos que podem ser utilizados tanto isoladamente quanto em combinação com compostos conhecidos para controlar efetivamente pestes de insetos e para reduzir o risco de desenvolvimento de resistência. Há vários exemplos bem conhe-

25 cidos de produtos naturais microbianos que são bem sucedidos como inseticidas agrícolas (Thompson *et al.*, 2000; Arena *et al.*, 1995; Krieg *et al.* 1983).

O desenvolvimento de um pesticida microbiano se inicia com o isolamento de um micróbio em uma cultura pura. Então, prossegue com a classificação de espectro e eficácia utilizando triagens *in vitro*, *in vivo* ou em escala

30 piloto em uma estufa e no campo. Ao mesmo tempo, compostos ativos produzidos pelo micróbio são isolados e identificados. Para a comercialização de um

pesticida microbiano, o micróbio deve ser produzido economicamente por fermentação em uma escala industrial e formulado com aditivos aprovados e biocompatíveis para aumentar a eficácia e maximizar a facilidade de aplicação, bem como a estabilidade de armazenamento sob condições em campo.

5 Como os fazendeiros buscam expandir seu arsenal de inseticida e como novos produtos microbianos são colocados no mercado, há um potencial para uma variedade de interações para ocorrer entre inseticidas novos e antigos. Combinações de 2 ou mais inseticidas aplicados a uma única plantação simultaneamente ou sequencialmente têm sido frequentemente utilizadas. Para se dirigir a esses assuntos, cientistas têm examinado a interação de óleos, fungos e pesti-
10 a esses assuntos, cientistas têm examinado a interação de óleos, fungos e pesti-
cidas químicos contra peste e insetos benéficos durante os métodos de alimentação e tópicos (vide, por exemplo, Chalvet-Monfray, Sabatier *et al.* 1996; Meunier, Carubel *et al.* 1999; Hummelbrunner e Isman 2001; Wirth, Jiannino *et al.* 2004; Farenhorst, Knols *et al.* 2010; Shapiro-Ilan, Cottrell *et al.* 2011); no entanto,
15 nem todas as interações foram estudadas ainda.

Cromobactéria

A cepa de beta-proteobactéria, *Chromobacterium subtsugae*, e-
xibe atividade inseticida contra uma variedade de insetos (Martin, Blackburn
et al. 2004; Martin 2004; Martin, Gundersen-Rindal *et al.* 2007; Martin, Hirose
20 *et al.* 2007; Martin, Shropshire *et al.* 2007). O modo de ação parece ser uma
combinação de atividade fagoinibidora e de toxina, com inibição de alimenta-
ção observada em doses sub-letais (Martin, Gundersen-Rindal *et al.* 2007).
Em particular, verificou-se que *Chromobacterium substugae* são efetivas
contra Besouro-da-batata (*Leptinotarse decemlineata*), Verme da Raiz do
25 Milho Ocidental adulto (*Diabrotica virgifera*), Southern Verme da Raiz do Mi-
lho do Sul larval e adulto (*Diabrotica undecimpunctata*), Pequeno coleóptero
das colmeias larval (*Aethina tumida*), Traças-das-crucíferas larvais (*Plutella*
xylostella), Mosca Branca da Batata-Doce larval e adulta (*Bernisia tabaci*) e
Marias-fedidas Verde do Sul adultas (*Nezara viridula*).

30 Desde a descoberta da *C. substugae* por Martin e seus colegas de trabalho, pelo menos três novas espécies de Cromobactérias foram isoladas e caracterizadas; Young *et al.* (2008) isolou uma espécie nova de *Cromobacterium*, *C. aquaticum*, a partir de amostras de água de nascente

em Taiwan, e Kampfer *et al.* (2009) isolou duas espécies, *C. piscinae* e *C. pseudoviolaceum*, a partir de amostras ambientais coletadas na Malaysia.

Metabólitos secundários do gênero de Cromobactéria

De todas as espécies conhecidas de Cromobactérias, a *Chromobacterium violaceum* é a mais estudada, e a informação publicada sobre metabólitos secundários produzidos por Cromobactérias é baseada em estudos sobre *Chromobacterium violaceum* apenas. Durán e Menck (2001) publicaram uma revisão compreensiva das perspectivas industriais e farmacológicas da *Chromobacterium violaceum*, uma saprófita Gram-negativa a partir do solo e da água. É normalmente considerada não patogênica para os humanos, mas como um patógeno oportunista, tem sido ocasionalmente o agente causador de septicemia e infecções fatais em humanos e animais. *Chromobacterium violaceum* é conhecida por produzir um pigmento púrpura, a violaceína, que é uma molécula de bisindol gerada através de uma fusão de duas moléculas de L-triptofano na presença de oxigênio (Hoshino *et al.*, 1987; Ryan e Drennan; 2009). A biossíntese de violaceína é regulada por percepção de quórum, um mecanismo comum de regulação de várias outras vias de metabolismo secundário em Bactéria Gram-negativa (McClellan *et al.*, 1997).

Outros metabólitos conhecidos de *Chromobacterium violaceum* resumidos por Durán e Menck (2001) incluem cianeto de hidrogênio, ferrioxamina E, B-lactâmicos, glicopeptídeos SQ28,504 e SQ28,546, antibióticos, tais como aerocianidina, aerocavina, 3,6-dihidroxi-indoxazeno, e monobactama SB-26.180, e um depsipeptídeo antitumoral FR901228. De acordo com o artigo de revisão de Durán e Menck (2001), a *Chromobacterium violaceum* também produz compostos de açúcar não usuais, tais como polissacarídeos e lipopolisdacarídeos extracelulares.

Nematódeos e Nematócido

Nematódeos são invertebrados semelhantes a vermes não segmentados, bilateralmente simétricos, que possuem uma cavidade corporal e sistema digestivo completo, mas não têm sistemas respiratório e circulatório. Sua parede corporal é composta por uma cutícula de camadas múltiplas,

uma hipoderme com quatro cordões nervosos longitudinais, e musculatura interna (Chitwood, 2003). Seus conteúdos corporais são principalmente ocupados pelos sistemas digestivo e reprodutor. A maioria dos nematódeos é de vida livre, mas um número menor de espécies são parasitas ubíquos de animais ou plantas.

Nematódeos das galhas (*Meloidogyne* spp.) parasitam uma ampla faixa de plantações anuais e perenes, impactando tanto na qualidade quanto na quantidade dos rendimentos comercializáveis. Nematódeos deste gênero são considerados os nematódeos parasitas de planta mais importante economicamente (Whitehead, 1998). Perdas na plantação anual causadas por nematódeos parasitas de plantas foram estimadas como excedendo os US\$100 bilhões (Koenning *et al.* 1999), com mais da metade causada pelo gênero *Meloidogyne*. O inóculo nesta cepa vem dos ovos que, sob condições favoráveis, chocam para liberar larvas no segundo estágio de infecção (J2s), que migram no solo, em direção a uma raiz da planta hospedeira. A infecção ocorre através da penetração da ponta da raiz, após a qual a larva se move para o tecido vascular onde os nematódeos se tornam sedentários, alimentando-se diretamente das células da planta. A planta responde produzindo células gigantes que formam bugalhos (galhas). Ao longo da vida reprodutiva, as fêmeas permanecem no tecido da planta, e apenas as massas de ovo se projetam a partir da raiz.

O meio mais eficiente para controlar nematódeos das galhas é via nematicidas que inibem ambos o chocamento do ovo, a mobilidade juvenil e/ou a possibilidade de infecção da planta. O desenvolvimento de controle químico para nematódeos parasitas de plantas é desafiador devido tanto a razões ambientais quanto fisiológicas: 1. A maioria dos nematódeos fitoparasitas vive em uma área confinada no solo próxima às raízes e, assim, a entrega de um nematicida químico é difícil. 2. A superfície externa de nematódeos é um alvo bioquímico fraco, e é impermeável a muitas moléculas orgânicas (Chitwood, 2003). Além disso, a entrega de compostos tóxicos por uma via oral é praticamente impossível devido à maioria das espécies de nematódeos parasitas de planta ingerir o material apenas após haverem pe-

netrado e infectado as raízes da planta. Portanto, os nematicidas tenderam a ser toxinas de amplo espectro com alta volatilidade ou com outras propriedades físicas e químicas promovendo sua mobilidade no solo.

5 Durante a década passada, hidrocarbonetos halogenados (por exemplo, dibrometo de etileno, brometo de metila) foram os nematicidas mais utilizados em peso nematicidas ao redor do mundo. Devido a sua alta toxicidade humana e efeitos prejudiciais na camada de ozônio estratosférica, esses compostos foram banidos pelo Protocolo de Montreal, mas o uso de brometo de metila para o controle de patógenos de planta e nematódeos foi
10 estendido nos EUA devido à falta de produtos de substituição. Juntamente com os organofosfatos, os carbamatos são os nematicidas de fumigantes mais efetivos. Infelizmente, a maioria dos carbamatos, tais como aldicarbe e oxamil são também altamente tóxicos. Como em Agosto de 2010, o fabricante de aldicarbe, Bayer, concordou em cancelar todos os registros do produto
15 em batatas e cítricos nos EUA, e o aldicarbe será completamente eliminado progressivamente por volta de Agosto de 2018. Recentemente, a abamectina - uma mistura de duas avermectinas produzidas por um actinomiceto de solo, *Streptomyces avermitilis* - foi registrada para uso como nematicida (Faske e Starr, 2006). A Syngenta comercializa esse ingrediente ativo como
20 um tratamento de semente para algodão e vegetais sob o nome comercial Avicta®.

Vários patógenos de nematódeos/planta microbianos foram relatados como sendo ativos contra nematódeos parasitas de planta (Guerena, 2006). Esses agentes de controle biológico incluem a bactéria *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pasteuria penetrans* e *P. usgae*. A Pasteuria Biosciences lançou a *P. usgae* contra nematódeos providos com agulha em turfa no sudoeste dos EUA. Fungos nematicidas incluem *Trichoderma harzianum*, *Hirsutella rhossiliensis*, *H. minnesotensis*, *Verticillium chlamydosporum*, *Arthrobotrys dactyloides*, e *Paecilomyces lilanicus* (comercializado como BioAct® e Melcon® pela Prophyta). Outro fungo, *Myrothecium verucaria* está disponível em uma formulação comercial, DiTera®, pela Valent Biosciences. Este é um fungo morto; uma vez que a atividade é devida a
30

compostos nematicidas. Outros bionematicidas comerciais incluem Deny[®] e Blue Circle[®] (*B. cepacia*), Activate[®] (*Bacillus chitinosporus*) (Quarles, 2005) e um produto israelita BioNem[®] (*Bacillus firmus*) (agora comercializado pela Bayer como um tratamento de semente Votivo[®]) (Terefe *et al.* 2009). Levantou-se a hipótese de que o efeito prejudicial dos isolados microbianos no chocamento de ovo de nematódeos, mobilidade juvenil e possibilidade de infecção podem ser atribuídos a toxinas produzidas por esses organismos (Hallman e Sikora, 1996; Marrone *et al.*, 1998; Siddiqui e Mahmood, 1999; Saxena *et al.*, 2000; Meyer e Roberts, 2002), a capacidade de parasitar ou até mesmo aprisionar nematódeos (Siddiqui e Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee e Muldoon, 1995), indução de resistência sistêmica (Hasky-Gunther *et al.* 1998), alteração do comportamento de nematódeos (Sikora e Hoffman-Hergarter, 1993) ou interferência no reconhecimento da planta (Oostendorp e Sikora, 1990)

15 Nematicidas botânicos, tais como extratos de planta e óleos essenciais, podem ser utilizados para controlar nematódeos (Kokalis-Burrelle e Rodriguez-Kabana, 2006). Chitwood resumiu as opções de uso de compostos derivados de planta para o controle de nematódeos em seu artigo de revisão recente (Chitwood, 2002). Siddiqui e Alam (2001) demonstraram que terra preparada para plantas emendada com partes de plantas a partir da árvore de neem (*Azadirachta indica*) e árvore de cinamomo (*Melia azadirah*) inibiu o desenvolvimento de nematódeos das galhas em tomates. No entanto, nenhum produto de está atualmente registrado nos EUA para uso contra nematódeos. Um novo produto botânico do Chile (Nema-Q[®]) com base em um extrato de árvore de *Quillaja saponaria* contendo saponinas (derivados bidesmosídico de ácido quilájico substituído com um trissacarídeo em C-3 e um oligossacarídeo em C-28) foi recentemente registrado como um nematicida orgânico através da US EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA) e listrado para agricultura orgânica pelo Organic Materials Review Institute (OMRI, Instituto de Revisão de Materiais Orgânicos). É comercializado pela Monterey AgResources.

A rotação de plantações para uma plantação não hospedeira é

frequentemente adequada por si só para evitar que as populações de nematódeos alcancem níveis economicamente danosos (Guerena 2006). Aleloquímicos são compostos produzidos por planta que afetam o comportamento de organismos no ambiente planta. Exemplos de aleloquímicos nematicidas incluem politienis, glucisonolatos, alcaloides, lipídios, terpenoides, esteroides, triterpenoides e fenólicos (Kokalis-Burrelle e Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002). Quando cultivados como plantações de cobertura, compostos bioativos a partir de plantas alelopáticas são exsudados durante o período de crescimento e/ou liberados no solo durante a decomposição de biomassa. Plantações de Brassica podem ser utilizadas para biofumigação — uma estratégia de gerenciamento de peste com base na liberação de voláteis biocidas durante a decomposição de tecido incorporado ao solo (Kirkgaard e Sarwar, 1998). No entanto, os estudos de Roubtsova *et al.* (2007) no efeito de apodrecimento de tecido de brócolis em números de *M. incognita* indicaram que, para o controle apropriado, ao longo da mistura do tecido de planta com o volume de solo infectado por nematódeos completo foi necessário.

O futuro do controle de nematódeos nos solos agrícolas conta com dois fatores: o desenvolvimento de plantações resistentes um nematódeo e a descoberta e desenvolvimento de novos nematicidas menos tóxicos e de amplo espectro. O custo da pesquisa, desenvolvimento e registro de novos nematicidas químicos é extremamente alto (>\$200 milhões), o que limita seu desenvolvimento. Dos 497 novos ingredientes ativos registrados para uso como pesticida a partir de 1967 a 1997, apenas sete foram registrados como nematicidas (Aspelin e Grube, 1999). Além dos métodos químicos convencionais, o RNA interferente (RNAi) foi proposto como um método para controle de nematódeos. O uso de silenciamento de gene através de RNAi foi primeiramente demonstrado em *Caenorhabditis elegans* e muito recentemente também para nematódeos parasitas de planta, tais como *Meloidogyne* spp. (Bakhetia *et al.* 2005). A busca por novas cepas microbianas para uso como fontes de nematicidas biológicos é uma meta improtante a fim de reduzir o dano econômico significativo causado pelos nematódeos

parasitas de plantas bem como para reduzir o uso de compostos tóxico atualmente registrado para controle de nematódeos.

De acordo com Sasser e Freckman (1987), as perdas na planta-
ção por nematódeos estão na faixa de 8 a 20% em plantações importantes
5 ao redor do mundo. Nematódeos parasitas de planta podem causar danos
consideráveis à plantação com perdas anuais estimadas em US\$87 bilhões
mundialmente (Dong e Zhang, 2006). Variedades de plantação resistentes
um nematódeo e nematicidas químicos são atualmente as principais opções
para controle de nematódeos. Os fumigantes, tais como brometo de metila,
10 são muito efetivos no controle tanto de doenças de planta transmitidas pelo
solo quanto os nematódeos, mas devido à alta toxicidade para mamíferos,
efeitos de esgotamento de ozônio e outros efeitos residuais, o uso de brome-
to de metila já foi banido em vários países e sua retirada completa do mer-
cado é planejada por acordo internacional (Oka *et al.*, 2000). Alternativas
15 químicas, tais como iodeto de metila, 1,3-Dicloropropeno, e cloropicrina tam-
bém têm questões em relação aos mamíferos e a segurança ambiental. Ne-
maticidas não fumigantes químicos estão sendo progressivamente elimina-
dos e banidos. Mais recentemente, a US EPA anunciou que a aldicarbe es-
tava sendo progressivamente eliminada.

20 BREVE SUMÁRIO

São providos aqui usos e combinações e, em particular, compo-
sições compreendendo uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente,
uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma ce-
pa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, ainda mais particularmente,
25 uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características
de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No.
7,244,607.

Assim, é provido aqui um método para modulação de infestação
por nematódeos em uma planta compreendendo a aplicação a uma planta,
30 e/ou sementes da mesma e/ou substrato utilizado para crescimento da refe-
rida planta, de uma quantidade de um sobrenadante, filtrado e/ou extrato
e/ou um ou mais metabólitos a partir do referido sobrenadante, filtrado e/ou

extrato de uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* tendo as características de identificação de NRRL B- 30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 e, 5 opcionalmente, outra substância nematicida em uma quantidade efetiva para modular a referida infestação por nematódeos.

Também é provida aqui uma combinação pesticida sinérgica a pelo menos uma peste compreendendo como componentes ativos: (a) um 10 sobrenadante, filtrado e/ou extrato de uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Pa- 15 tente dos EUA No. 7,244,607 e/ou um ou mais metabólito(s) a partir do referido sobrenadante, filtrado e/ou extrato de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* tendo as 20 características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 e (b) outra substância pesticida, em que (a) e (b) estão presentes em quantidades sinérgicas. A peste, em uma modalidade particular, pode ser uma peste de inseto, mas também pode incluir, mas não se limita a, um nematódeo, fungo de planta, vírus de planta e bactéria de planta 25 e ervas. Ademais, a combinação pode ser uma composição. A substância pesticida pode ser (a) derivada a partir de um microrganismo; (b) um produto natural e/ou (c) um pesticida químico e, em particular, um nematocida químico.

Em particular, a combinação pode compreender um sobrenadante, 30 filtrado e/ou extrato de uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* e, até mesmo mais particu-

larmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 e uma substância pesticida derivada a partir de um microrganismo incluindo, mas não se limitando a *Bacillus* sp. (por exemplo, 5 *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus thuringiensis kurstaki*) e spinosad. Alternativamente, a combinação pode compreender um sobrenadante, filtrado e/ou extrato de uma cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa 10 de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 e uma substância pesticida derivada a partir de um produto natural, tal como piretro. Alternativamente, a combinação pode compreender um sobrenadante, filtrado e/ou extrato de uma cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente, 15 uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 e uma substância pesticida que é um pesticida químico, 20 particularmente, um inseticida, onde o inseticida inclui, mas não se limita a piretrinas, espirotetramato e diamida antranílica.

Em um aspecto relacionado, é provido aqui um método para modular sinergicamente a infestação de pelo menos uma peste ou espécie de peste em uma planta compreendendo a aplicação a uma planta, e/ou 25 sementes da mesma e/ou substrato para crescimento da referida planta, as combinações exibidas acima com uma quantidade da combinação efetiva para modular a infestação da referida peste ou espécie de peste. Também são providos aqui compostos isolados obteníveis ou derivados a partir de uma cepa de espécie de *Chromobacterium*, mais particularmente, *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, a cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de 30

NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 ou, alternativamente, organismos capazes de produzir esses compostos que podem ser utilizados para controlar várias pestes, e particularmente, pestes nematocidas.

5 Em uma modalidade, o composto pode ser um composto que (a) tem atividade pesticida; (b) tem um peso molecular de cerca de 840-900 conforme determinado por Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas (LC/MS) e (c) tem um tempo de retenção de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPCL) de cerca de 7-12 minutos em uma coluna C-18 para HPLC
10 de fase reversa utilizando um sistema de solvente gradiente de água:acetonitrila (CH₃CN) (0-20 min; 90 - 0% de CH₃CN aquosa, 20-24 min; 100% de CH₃CN, 24-27 min; 0-90% de CH₃CN aquosa, 27-30 min; 90% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm e (d) é opcionalmente obtível a partir de uma cepa de *Chromobacterium*
15 *sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607. O composto em uma modalidade pode ser
20 um peptídeo.

Em uma modalidade particular, o composto tem 43 carbonos, sete metilas, dez carbonos de metileno, doze metinos, 6 metinos olefínicos e oito carbonos quaternários, conforme determinado por ¹³C RMN.

Em uma modalidade específica, o composto "A": (a) é obtível
25 a partir de uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607; (b) é
30 tóxico a uma peste; (c) tem um peso molecular de cerca de 840-890 e, mais particularmente, 860 conforme determinado por Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas (LC/MS); (d) tem valores de ¹H RMN de δ

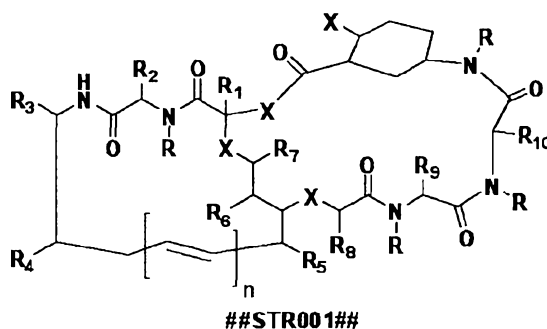
8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 e tem valores de ^{13}C RMN de
5 cerca de δ 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (e) tem um tempo de retenção de Cromatografia Líquida
10 de Alta Pressão (HPLC) de cerca de 7-12 minutos, mais especificamente de cerca de 9 minutos e ainda mais especificamente de cerca de 9,08 min em uma coluna C-18 para HPLC de fase reversa (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) utilizando uma água:acetoneitrila (CH_3CN) com um sistema de solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% de CH_3CN aquosa, 20-24
15 min; 100% de CH_3CN , 24-27 min; 0-90% de CH_3CN aquosa, 27-30 min; 90% de CH_3CN aquosa) em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm. Em particular, o espectro de ^{13}C RMN revela sinais para 43 carbonos, para sete metilas, dez carbonos de metileno, doze metinos, 6 metinos olefínicos, oito carbonos quaternários e/ou o espectro de ^1H RMN exibe ca-
20 racterísticas de um peptídeo típico, ilustrando cinco sinais de NH de amida [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96], um sinal de NH_2 amida [δ_{H} : 7.64, 6.65], seis prótons de α -amino [δ_{H} : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] e no espectro de ^{13}C RMN, seis/sete ressonâncias de éster ou amida [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45].

25 Em outra modalidade específica, o composto "B" tem as seguintes características: (a) é obténível a partir de uma cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp.
30 nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607; (b) é tóxico a uma peste; (c) tem um peso molecular de cerca de 850-900 e, mais particularmente, 874 conforme de-

terminado por Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas (LC/MS);
 (d) tem um tempo de retenção de Cromatografia Líquida de Alta Pressão
 (HPCL) de cerca de 7-12 minutos, mais especificamente de cerca de 9 minu-
 5 tos e ainda mais especificamente de cerca de 9.54 min em uma coluna C-18
 para HPLC de fase reversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x
 4.60 mm) utilizando uma água:acetonitrila (CH₃CN) com um sistema de sol-
 vente de gradiente (0-20 min; 90-0% de CH₃CN aquosa, 20-24 min; 100% de
 CH₃CN, 24-27 min; 0-90% de CH₃CN aquosa, 27-30 min; 90% de CH₃CN
 aquosa) em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm.

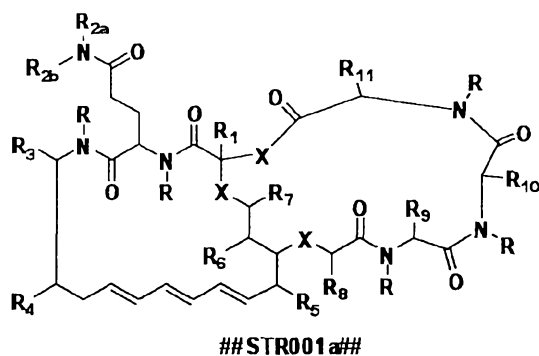
10 Em uma modalidade mais particular, são providos compostos in-
 cluindo, mas não se limitando a:

(A) um composto tendo a estrutura ##STR001##



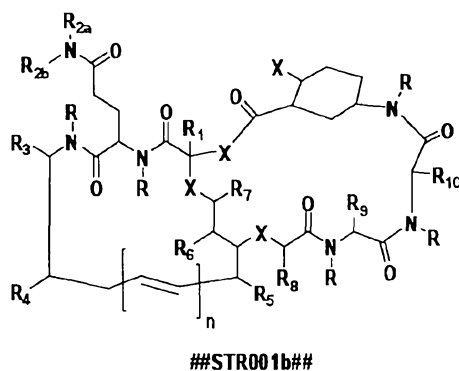
ou um sal pesticidamente aceitável ou estereoisômeros dos mesmos, em
 que R é -H, alquila de cadeia inferior contendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 por-
 15 ções de alquila, porção de arila ou arilalquila, alquila inferior substituída; X é
 O, NH, NR ou S; n é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈,
 R₉, R₁₀, R₁₁ são, cada um, independentemente H, são os mesmos ou dife-
 rentes e independentemente uma porção de cadeia lateral de aminoácido ou
 um derivado de cadeia lateral de aminoácido, alquila, alquila substituída, al-
 20 quenila, alquenila substituída, alquinila, alquinila substituída, arila, arila sub-
 tituída, heteroarila, heteroarila substituída, heterocíclico, heterocíclico substi-
 tuído, cicloalquila, cicloalquila substituída, alcóxi, alcóxi substituído, tioalqui-
 la, tioalquila substituída, hidróxi, halogênio, amino, amido, carboxila, -C(O)H,
 acila, oxiacila, carbamato, sulfonila, sulfonamida ou sulfurila;

(B) um composto tendo a estrutura ##STR001a##



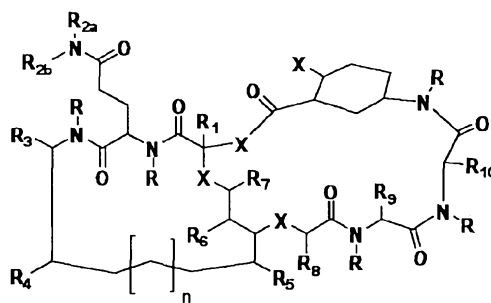
em que R é -H, alquila de cadeia inferior contendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 porções de alquila, porção de arila ou arilalquila, alquila inferior substituída; X é O, NH, NR ou S; R2a, R2b são independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em -H, alquila, alquila inferior, alquila substituída e alquila inferior substituída; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 são, cada um, independentemente H, são os mesmos ou diferentes e independentemente uma porção de cadeia lateral de aminoácido ou um derivado de cadeia lateral de aminoácido, alquila, alquila substituída, alquênica, alquênica substituída, alquinila, alquinila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heterocíclico, heterocíclico substituído, cicloalquila, cicloalquila substituída, alcóxi, alcóxi substituído, tioalquila, tioalquila substituída, hidróxi, halogênio, amino, amido, carboxila, -C(O)H, acila, oxiacila, carbamato, sulfonila, sulfonamida ou sulfurila.

15 (C) um composto tendo a estrutura ##STR001b##



em que R é -H, alquila de cadeia inferior contendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 porções de alquila, porção arilalquila ou arila, alquila inferior substituída; X é O, NH, NR ou S; n é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9; R_{2a}, R_{2b} são independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em -H, alquila, alquila inferior, alquila substituída e alquila inferior substituída; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ são, cada um, independentemente H, são os mesmos ou diferentes e independentemente uma porção de cadeia lateral de aminoácido ou um derivado de cadeia lateral de aminoácido, alquila, alquila substituída, alquenila, alquenila substituída, alquinila, alquinila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heterocíclico, heterocíclico substituído, cicloalquila, cicloalquila substituída, alcóxi, alcóxi substituído, tioalquila, tioalquila substituída, hidróxi, halogênio, amino, amido, carboxila, -C(O)H, acila, oxiacila, carbamato, sulfonila, sulfonamida ou sulfurila.

(D) um composto tendo a estrutura ##STR001c##



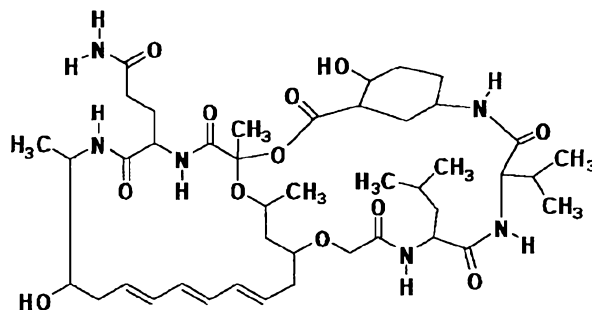
##STR001c##

em que R é -H, alquila de cadeia inferior, porção arilalquila ou arila, alquila inferior substituída contendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 porções de alquila; X é O, NH, NR ou S; n é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9; R_{2a}, R_{2b} são independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em -H, alquila, alquila inferior, alquila substituída e alquila inferior substituída; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ são, cada um, independentemente H, são os mesmos ou diferentes e independentemente uma porção de cadeia lateral de aminoácido ou um derivado de cadeia lateral de aminoácido, alquila, alquila substituída, alquenila, alquenila substituída, alquinila, alquinila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heterocíclico, heterocíclico

substituído, cicloalquila, cicloalquila substituída, alcóxi, alcóxi substituído, tioalquila, tioalquila substituída, hidróxi, halogênio, amino, amido, carboxila, -C(O)H, acila, oxiacila, carbamato, sulfonila, sulfonamida ou sulfurila.

Em uma modalidade mais particular, o composto é cromamida A

5 (1).



Cromamida A (1)

Esses compostos podem ser obtidos por (a) cultura de uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de 5 *Chromobacterium substugae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 em um meio de cultura ou caldo celular inteiro sob condições suficientes para produzir referido composto para obter uma cultura de *Chromobacterium* e (b) isolamento do referido composto produzido a partir do caldo celular inteiro de (a). Em particular, o composto na etapa (b) pode ser isolado por (i) aplicação do caldo celular inteiro a pelo menos um dentre uma coluna de troca de íon, uma coluna de exclusão por tamanho ou uma coluna para HPLC de fase reversa para obter frações de coluna; (ii) ensaio das frações de coluna for atividade pesticida e (iii) concentração de frações de coluna de (ii) para obter composto isolado.

São adicionalmente providas composições, particularmente composições pesticidas compreendendo referidos compostos, bem como outros compostos obteníveis a partir de uma cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particu-

larmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 com atividade pesticida. Esses outros compostos podem ter as seguintes características: (a) um peso molecular de cerca de 315-360 conforme determinado por Cromatografia Líquida/ Espectroscopia de Massas (LC/MS); (b) um tempo de retenção de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPCL) de cerca de 8-15 minutos em uma coluna C-18 para HPLC de fase reversa utilizando uma água:acetonitrila (CH₃CN) com um sistema de solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% de CH₃CN aquosa, 20-24 min; 100% de CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH₃CN aquosa, 27-30 min; 90% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm e podem ser obtidos por (A) cultura de uma cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 em um meio de cultura sob condições suficientes para produzir referido composto para obter uma cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos EUA No. 7,244,607 cultura e (B) isolamento do referido composto produzido a partir do caldo celular inteiro de (A).

Em uma modalidade particular, um composto utilizado na referida composição exibida acima, o composto "C", tem as seguintes características: (a) é obtível a partir de uma cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substugae* e, mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e, até mesmo mais particularmente, uma cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. tendo as características de identificação de NRRL B-30655 descritas na Patente dos

EUA No. 7,244,607; (b) é tóxico a pestes; (c) tem um peso molecular de cerca de 325-360 e, mais particularmente, cerca de 343 conforme determinado por Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas (LC/MS); (d) tem um tempo de retenção de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPCL) de cerca de 8-14 minutos, mais especificamente de cerca de 10 minutos e ainda mais especificamente de cerca de 10.88 min em uma coluna C-18 para HPLC de fase reversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) utilizando uma água:acetonitrila (CH₃CN) com um sistema de solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% de CH₃CN aquosa, 20-24 min; 100% de CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH₃CN aquosa, 27-30 min; 90% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm. Em uma modalidade particular, o composto "C" pode ser violaceína (2), um composto conhecido isolado previamente a partir de *Chromobacterium violaceum*.

Em outra modalidade, outro composto utilizado na composição exibida acima, o composto "D", tem as seguintes características: (a) é obtível a partir de uma espécie de *Chromobacterium*; (b) é tóxico a uma peste; (c) tem um peso molecular de cerca de 315-350 e, mais particularmente, cerca de 327 conforme determinado por Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas (LC/MS); (d) tem um tempo de retenção de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPCL) de cerca de 10-15 minutos, mais especificamente de cerca de 12 minutos e ainda mais especificamente de cerca de 12.69 min em uma coluna C-18 para HPLC de fase reversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) utilizando uma água:acetonitrila (CH₃CN) com um sistema de solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% de CH₃CN aquosa, 20-24 min; 100% de CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH₃CN aquosa, 27-30 min; 90% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm. Em uma modalidade particular, o composto "D" pode ser caracterizado como deoxiviolaceína (3), um composto conhecido isolado anteriormente a partir de *Chromobacterium violaceum*.

As referidas composições podem adicionalmente opcionalmente

compreender uma segunda substância, em que referida segunda substância é um pesticida biológico ou químico e/ou pelo menos um dentre um transportador, diluente, surfactante ou adjuvante.

5 Também é provido um método de uso dos compostos (por exemplo, compostos "A", "B", "C" e "D") e composições exibidas acima para modular a infestação por peste, particularmente, pestes nematocidas em uma planta compreendo a aplicação à planta de uma quantidade do composto ou composições e, opcionalmente, um segundo pesticida biológico ou químico efetivo para modular a referida infestação por peste. É adicional-
10 mente provido o uso dos compostos exibidos acima para formulação de uma composição para modulação de infestação por peste em uma planta.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma representação esquemática de esquema de purificação para a obtenção dos compostos da invenção a partir do caldo de
15 cultura.

A Figura 2 retrata o cromatograma ESI-LCMS para cromamida A (1).

A FIG.3 retrata os dados de HRMS para cromamida A (1).

A Figura 4 retrata 'H RMN para cromamida A (1) em DMSO- d_6 a
20 600 MHz.

A Figura 5 retrata ^{13}C RMN para cromamida A (1) em DMSO- d_6 a 600 MHz.

A Figura 6 retrata o cromatograma de HPLC para o composto B (MW 874).

25 A Figura 7 retrata estruturas químicas para cromamida A (1), violaceína (2) e deoxiviolaceína (3).

A Figura 8 Porcentagem de nematódeos móveis após o tratamento com caldo de *C. substugae* esterilizado por filtro (1x — não diluído; 0,1x — diluído 10 vezes) após 24 horas.

30 A Figura 9 Porcentagem de nematódeos móveis após o tratamento com caldo de *C. substugae* esterilizado por filtro (1x — não diluído; 0,1x — diluído 10 vezes) após 48 horas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Enquanto que as composições e métodos até aqui são suscetíveis a várias modificações e formas alternativas, modalidades exemplares serão aqui descritas em detalhes. Deve-se compreender, no entanto, que
5 não se pretende limitar a invenção às formas particulares descritas, mas, ao contrário, pretende-se cobrir todas as modificações, equivalentes e alternativas caindo dentro do espírito e escopo da invenção, conforme definido pelas reivindicações em anexo.

Onde uma faixa de valores é provida, compreende-se que cada
10 valor interveniente, a um décimo da unidade do limite inferior, a menos que o contexto claramente dite de outro modo, entre os limites superior e inferior daquela faixa e qualquer outra afirmada ou valor interveniente naquela faixa afirmada, está incluso na mesma. Faixas menores também estão inclusas. Os limites superior e inferior dessas faixas menores estão inclusos na mesma,
15 sujeitos a qualquer limite especificamente excluído na faixa afirmada.

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado como normalmente compreendido por aquele comumente versado na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles descritos aqui possam também ser utilizados na prática ou teste
20 da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são descritos agora.

Deve-se notar que, conforme utilizado aqui e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "um/a," "e" e "o/a" incluem referências plu-
25 rais, a menos que o contexto claramente dite de outro modo.

Conforme definido aqui, "derivado a partir de" significa diretamente isolado ou obtido a partir de uma fonte particular ou, alternativamente, tendo características de identificação de uma substância ou organismo isolado ou obtido a partir de uma fonte particular. No caso em que a "fonte" é
30 um organismo, "derivado a partir de" significa que este pode ser isolado ou obtido a partir do organismo em si ou meio utilizado para cultivar ou adquirir cultura do referido organismo.

Conforme definido aqui, "cultura de caldo inteiro" refere-se a uma cultura líquida contendo tanto células quanto meios. Caso as bactérias sejam cultivadas em uma placa, as células podem ser colhidas em água ou outra cultura inteira líquida.

5 O termo "sobrenadante" refere-se ao líquido remanescente quando as células cultivadas em caldo ou são colhidas em outro líquido a partir de uma placa de ágar e são removidos por centrifugação, filtração, sedimentação ou outros meios bem conhecidos na técnica.

10 Conforme definido aqui, "filtrado" refere-se ao líquido a partir de uma cultura de caldo inteiro que atravessou uma membrana.

Conforme definido aqui, "extrato" refere-se uma substância líquida removida a partir de células através de um solvente (água, detergente, tampão) e separada a partir das células por centrifugação, filtração ou outro método.

15 Conforme definido aqui, "metabólito" refere-se a um composto, substância ou subproduto de uma fermentação de um microrganismo, ou sobrenadante, filtrado ou extrato obtido a partir de um microrganismo que tem atividade pesticida e, particularmente, inseticida. Conforme definido aqui, um "composto isolado" é essencialmente livre de outros compostos ou substâncias, *por exemplo*, pelo menos cerca de 20% de pureza, preferencialmente pelo menos cerca de 40% de pureza, mais preferencialmente cerca de 60% de pureza, ainda mais preferencialmente cerca de 80% de pureza, o mais preferencialmente cerca de 90% de pureza, e ainda o mais preferencialmente cerca de 95% de pureza, conforme determinado por métodos analí-
20 ticos, incluindo, mas não se limitando a métodos cromatográficos, métodos eletroforéticos.

30 Conforme definido aqui, um "transportador" é um material inerte, orgânico ou inorgânico, com o qual o ingrediente ativo é misturado ou formulado para facilitar sua aplicação à planta ou outro objeto a ser tratado, ou seu armazenamento, transporte e/ou manuseio.

O termo "modular" é utilizado para alterar a quantidade de infestação por peste ou taxa de espalhamento de infestação por peste.

Conforme definido aqui, o termo "infestação por peste" é a presença de uma peste em uma quantidade que causa um efeito prejudicial incluindo uma doença ou infecção em uma população hospedeira ou emergência de uma erva indesejada em um sistema de crescimento.

5 Conforme definido aqui, um "pesticida" é uma substância derivada a partir de um produto biológico ou substância química que aumenta a mortalidade ou inibe a taxa de crescimento de pestes de planta e inclui, mas não se limita a nematócidos, inseticidas, fungicidas de planta, bactericidas de planta e virucidas de planta.

10 Conforme definido aqui, o termo "alquila" refere-se a um grupo de hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada monovalente tendo de um a cerca de 12 átomos de carbono, incluindo metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, terc-butila, n-hexila e similares.

15 Conforme definido aqui, "alquila substituída" refere-se grupos alquila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes selecionados dentre hidróxi, alcóxi, mercapto, cicloalquila, cicloalquila substituída, heterocíclico, heterocíclico substituído, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, arilóxi, arilóxi substituído, halogênio, ciano, nitro, amino, amido, $-C(O)H$, acila, oxiacila, carboxila, sulfonila, sulfonamida, sulfurila e similares.

20 Conforme definido aqui, "alquenila" refere-se a grupos hidrocarbila de cadeia linear ou ramificada tendo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono, e tendo na faixa de cerca de 2 até 12 átomos de carbono, e "alquenila substituída" refere-se a grupos alquenila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

25 Conforme definido aqui, "alquinila" refere-se a grupos hidrocarbila de cadeia linear ou ramificada tendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono, e tendo na faixa de cerca de 2 até 12 átomos de carbono, e "alquinila substituída" refere-se a grupos alquinila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

30 Conforme definido aqui, "arila" refere-se a grupos aromáticos tendo na faixa de 6 até 14 átomos de carbono e "arila substituída" refere-se

a grupos arila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

Conforme definido aqui, "heteroarila" refere-se a anéis aromáticos contendo um ou mais heteroátomos (por exemplo, N, O, S, ou similares) como parte da estrutura de anel, e tendo na faixa de 3 até 14 átomos de carbono e "heteroarila substituída" refere-se a grupos heteroarila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

Conforme definido aqui, "alcóxi" refere-se à porção --O-alkil-, em que alkila é conforme definido acima, e "alcóxi substituído" refere-se a grupos alcóxila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

Conforme definido aqui, "tioalquila" refere-se à porção --S-alkil-, em que alkila conforme definido acima, e "tioalquila substituída" refere-se a grupos tioalquila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

Conforme definido aqui, "cicloalquila" refere-se a grupos alkila contendo anel contendo na faixa de cerca de 3 até 8 átomos de carbono, e "cicloalquila substituída" refere-se a grupos cicloalquila adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

Conforme definido aqui, "heterocíclico", refere-se a grupos cíclicos (ou seja, contendo anel) contendo um ou mais heteroátomos (por exemplo, N, O, S, ou similares) como parte da estrutura de anel, e tendo na faixa de 3 até 14 átomos de carbono e "heterocíclico substituído" refere-se a grupos heterocíclicos adicionalmente sustentando um ou mais substituintes conforme exibido acima.

MÉTODOS DE PRODUÇÃO

Conforme notado acima, compostos ou metabólitos podem ser obtidos, são obtíveis ou derivados a partir de um organismo tendo as características de identificação de uma espécie de *Chromobacterium*, mais particularmente, a partir de um organismo tendo as características de identificação de uma cepa de *Chromobacterium substugae*, mais particularmente a partir de uma cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que pode ter

as características de identificação de NRRL B-30655, ou, alternativamente, a partir de qualquer outro microrganismo. Os métodos compreendem o cultivo desses organismos e obtenção dos compostos e/ou composições da presente invenção por isolamento desses compostos a partir da cultura desses organismos.

Em particular, os organismos são cultivados em meio nutriente utilizando métodos conhecidos na técnica. Os organismos podem ser cultivados por cultivo em frascos agitados, fermentação em pequena escala ou grande escala (incluindo, mas não se limitando a fermentações contínuas, em lote, em lote alimentado ou em estado sólido) em laboratório ou fermentadores industriais desempenhadas em meio adequado e sob condições permitindo o crescimento celular. O cultivo pode ocorrer em meio nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos, utilizando procedimentos conhecidos na técnica. Meios adequados estão disponíveis ou podem estar disponíveis a partir de fontes comerciais ou preparadas de acordo com composições publicadas.

Após o cultivo, um sobrenadante, filtrado e/ou extrato de ou derivado a partir de *Chromobacterium* sp. pode ser utilizado na formulação de uma composição pesticida.

Alternativamente, após o cultivo, os compostos e/ou metabólitos podem ser extraídos a partir do caldo de cultura.

O extrato pode ser fracionado por cromatografia. Frações cromatográficas podem ser ensaiadas para atividade tóxica contra, por exemplo, Lagarta falsa-medideira (*Trichoplusia ni*) ou Lagarta militar da beterraba (*Spodoptera exigua*) utilizando métodos conhecidos na técnica. Esse processo pode ser repetido uma ou mais vezes utilizando os mesmos métodos cromatográficos ou diferentes.

Composições

As composições podem compreender culturas de caldo inteiro, culturas líquidas ou suspensões de uma cepa a partir de uma *Chromobacterium* sp., por exemplo, uma cepa tendo as características de identificação de *Chromobacterium substugae* sp. Nov e, mais particularmente, tendo as ca-

racterísticas de identificação de NRRL B-30655 (vide Patente dos EUA No. 7,244,607), bem como sobrenadantes, filtrados ou extratos obtidos a partir de uma cepa de uma *Chromobacterium sp.*, por exemplo, uma cepa tendo as características de identificação de *Chromobacterium substugae sp. Nov*
5 e, mais particularmente, tendo as características de identificação de NRRL B-30655 (vide Patente dos EUA No. 7,244,607), ou o sobrenadante, filtrado e/ou extrato ou um ou mais metabólitos ou compostos isolados derivados a partir de uma cepa de uma *Chromobacterium sp.* ou combinações do precedente que, em particular, têm atividade nematicida.

10 As composições exibidas acima podem ser formuladas de qualquer modo. Exemplos de formulação não limitantes incluem, mas não se limitam a, Concentrados passíveis de emulsificação (EC), Pós passíveis de umedecimento (WP), líquidos solúveis (SL), Aerossóis, Soluções de concentrado de volume ultra-baixo (ULV), Pós solúveis (SP), Microencapsulação,
15 Grânulos dispersos em água, reduzíveis (FL), Microemulsões (ME), Nanoemulsões (NE), etc. Em qualquer formulação descrita aqui, a porcentagem do ingrediente ativo está dentro de uma faixa de 0,01% a 99,99%.

As composições pode estar na forma de um líquido, gel ou sólido.

20 Uma composição sólida pode ser preparada através da suspensão de um transportador sólido em uma solução de ingrediente(s) ativo(s) e secagem da suspensão sob condições moderadas, tais como evaporação à temperatura ambiente ou evaporação a vácuo a 65°C ou menos.

Uma composição pode compreender ingrediente(s) ativo(s) encapsulado(s) em gel. Tais materiais encapsulados em gel podem ser preparados por mistura de um agente de formação de gel (por exemplo, gelatina, celulose ou lignina) com uma cultura ou suspensão de *Chromobacterium* viva ou inativa, ou um filtrado livre de célula ou fração celular de uma cultura ou suspensão de *Chromobacterium*, ou uma fração celular, célula ou cultura
25 criodissecada ou dissecada por aspersão em uma solução de compostos pesticidas utilizadas no método da invenção; e induzindo a formação de gel do agente.
30

A composição pode adicionalmente compreender um surfactante a ser utilizado para o propósito de emulsificação, dispersão, umedecimento, espalhamento, integração, controle de desintegração, estabilização de ingredientes ativos, e melhoria da fluidez ou inibição de ferrugem. Em uma modalidade particular, o surfactante é um surfactante não iônico não fitotóxico que preferencialmente pertence à Lista 4B da EPA. Em outra modalidade particular, o surfactante não iônico é monolaurato de polioxietileno (20). A concentração de surfactantes pode estar na faixa entre 0,1-35% da formulação total, a faixa preferencial é 5-25%. A escolha de agentes de dispersão e emulsificação, tais como agentes de dispersão e emulsificação catiônicos, anfotéricos, aniônicos e não iônicos, e a quantidade empregada é determinada pela natureza da composição e a capacidade do agente de facilitar a dispersão das composições da presente invenção.

A composição exibida acima pode ser combinada com outro microrganismo e/ou pesticida (por exemplo, nematócido, fungicida, inseticida). O microrganismo pode incluir, mas não se limita a um agente derivado a partir de *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacillus sp.*, *Lecanicillium sp.*, *non-Ampelomyces sp.*, *Pseudozyma sp.*, *Streptomyces sp.*, *Burkholderia sp.*, *Trichoderma sp.*, *Gliocladium sp.* Alternativamente, o agente pode ser um óleo natural ou um produto oleoso tendo atividade fungicida e/ou inseticida (por exemplo, óleo parafínico, óleo de melaleuca, óleo de capim-limão, óleo de cravo, óleo de canela, óleo cítrico, óleo de alecrim, piretro). Além disso, o pesticida pode ser um agente antifúngico de sítio único que pode incluir, mas não se limita a benzimidazol, um inibidor de desmetilação (DM1) (por exemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilopirimidina, fosforotiolato, inibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilopirimidina, fenilpirrol, hidrocarboneto aromático, ácido cinâmico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, benzenoide (xililalanina), um inibidor de desmetilação selecionado a partir do grupo consistindo em imidazol, piperazina, pirimidina e triazol (por exemplo, bitertanol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, triadimefon, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebu-

conazol, tetraconazol), miclobutanil, uma diamida antranílica (por exemplo, clorantranilipol) e um inibidor externo de quinona (por exemplo, estrobilurina). A estrobilurina pode incluir, mas não se limita a azoxistrobina, metilcresoxima ou trifloxistrobina. Em ainda outra modalidade particular, o agente antifúngico é uma quinona, por exemplo, quinoxifeno (5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter). O agente antifúngico pode também ser derivado de um extrato de *Reynoutria*.

O fungicida pode também ser um fungicida químico não orgânico de sítios múltiplos, selecionado a partir do grupo consistindo em cloronitrila, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridin-amina, ciano-acetamida oxima.

A composição pode, conforme notado acima, adicionalmente compreender um inseticida. O inseticida pode incluir, mas não se limita a avermectina, Bt (por exemplo, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*), óleo de neem, spinosads, *Burkholderia* sp. conforme exposto em W02011/106491, fungos entomopatogênicos, tais como uma *Beauveria bassiana* e inseticida químicos incluindo, mas não se limitando a compostos de organocloro, compostos de organofósforo, carbamatos, piretroides, piretrinas e neonicotinoides.

Conforme notado acima, a composição pode adicionalmente compreender um nematócido. Esse nematócido pode incluir, mas não se limita a, avermectina, produtos microbianos, tais como Biome (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp e produtos orgânicos, tais como saponinas.

As composições podem ser aplicadas utilizando métodos conhecidos na técnica. Especificamente, essas composições podem ser aplicadas a plantas ou partes de planta. Plantas devem ser compreendidas como significando, no presente contexto, todas as plantas e populações de planta, tais como plantas selvagens desejadas e indesejadas ou plantas de plantação (incluindo plantas de plantação de ocorrência natural). Plantas de plantação podem ser plantas, que podem ser obtidas por métodos de otimização e criação de planta convencionais ou por métodos de engenharia genética ou biotecnológica ou por combinações desses métodos, incluindo as plantas

transgênicas e incluindo cultivares de planta passíveis de proteção ou não pelos direitos dos criadores de plantas. Partes de planta devem ser compreendidas como significando todas as partes e órgãos de plantas acima e abaixo do chão, tal como galho, folha, flor e raiz, exemplos que podem ser mencionados sendo folhas, agulhas, caules, troncos, flores, corpos de fruta, 5 frutas, sementes, raízes, bulbos e rizomas. As partes de planta também incluem material colhido, e material de propagação gerativa e vegetativa, por exemplo, cortes, bulbos, rizomas, ramificações e sementes.

O tratamento das plantas e partes de planta com as composições exibidas acima pode ser executado diretamente ou permitindo que as composições atuem nas cercanias, habitat ou espaço de armazenamento por, por exemplo, imersão, aspersão, evaporação, enevoamento, disseminação, coloração, injeção. No caso em que a composição é aplicada a uma semente, a composição pode ser aplicada à semente, como um ou mais revestimentos antes do plantio da semente utilizando um ou mais revestimen- 15 vestimentos utilizando métodos conhecidos na técnica.

Usos

As composições, culturas, sobrenadantes, metabólitos e compostos pesticidas exibidos acima podem ser utilizados como pesticidas. Em particular, as composições, culturas, sobrenadantes, metabólitos e compostos pesticidas conforme exibido acima podem ser utilizados como inseticidas e nematócidos, isoladamente ou em combinação com uma ou mais substâncias pesticidas exibidas acima. 20

Especificamente, nematódeos que podem ser controlados utilizando o método estabelecido acima inclui, mas não se limita a nematódeos parasitas, tais como nematódeos das galhas, cisto e lesão, incluindo, mas não se limitando a *Meloidogyne* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera*, sp., *Trichodorus* sp., *Paratrichodorus* sp., *Xiphinema* sp., e *Criconema* sp.; particularmente *Meloidogyne incognita* (nematódeos das galhas), bem como *Globodera rostochiensis* e *globodera pallida* (nematódeos de cisto de batata); *Heterodera glycines* (nematódeos de cisto de soja); *Heterodera schachtii* 25 30

(nematódeos de cisto de beterraba); e *Heterodera avenae* (nematódeos de cisto de cereal).

Insetos fitopatogênicos controlados pelo método exibido acima incluem, mas não se limitam a insetos larvais não-*Culicidae* a partir da ordem (a) *Lepidoptera*, por exemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crociodolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Ope-rophtha* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* e *Yponomeuta* spp.; (b) *Coleoptera*, por exemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptus* spp., *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. e *Trogoderma* spp.; (c) *Orthoptera*, por exemplo, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. e *Schistocerca* spp.; (d) *Isop-tera*, por exemplo, *Reticulitermes* spp.; (e) *Psocoptera*, por exemplo, *Liposcelis* spp.; (f) *Anoplura*, por exemplo, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. e *Phylloxera* spp.; (g) *Mallophaga*, por exemplo, *Damalinea* spp. e *Trichodectes* spp.; (h) *Thysanoptera*, por exem-

plo, *Frankliniella* spp., *Hercinotrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*,
Thrips tabaci e *Scirtothrips aurantii*; (i) *Heteroptera*, por exemplo, *Cimex*
spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster*
spp., *Leptocorisa* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp., *Rhodnius* spp., *Sahlber-*
 5 *gella singularis*, *Scotinophara* spp. e *Tnatomia* spp.; (j) *Homoptera*, por e-
 xemplo, *Aleurothrixus floccosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphi-*
didae, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp., *Chry-*
somphalus aonidium, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*,
Empoasca spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp., *Gascardia* spp., *La-*
 10 *odelphax* spp., *Lecanium corni*, *Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *My-*
zus spp., *Nephotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp.,
Planococcus spp., *Pseudaulacaspis* spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp.,
Pulvinaria aethiopica, *Quadraspidotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia*
spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp., *Trialeurodes vapura-*
 15 *riorum*, *Trioza erytrae* e *Unaspis citri*; (k) *Hymenoptera*, por exemplo, *A-*
cromyrmex, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia poly-*
toma, *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion*
spp., *Solenopsis* spp. e *Vespa* spp.; (l) *Diptera*, por exemplo, *Aedes* spp.,
Antherigona soccata, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis*
 20 *spp.*, *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila*
melanogaster, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma*
spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp.,
Musca spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*,
Phorbia spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus*
 25 *spp.*, *Tannia* spp. e *Tipula* spp.; (m) *Siphonaptera*, por exemplo, *Ceratophyl-*
lus spp. e *Xenopsylla cheopis* e (n) from the order *Thysanura*, por exemplo,
Lepisma saccharina. Os ingredientes ativos de acordo com a invenção po-
 dem ser adicionalmente utilizados para controlar besouro-pulga *crucifer* (*Ph-*
yllotreta spp.), larvas de raiz (*Delia* spp.), gorgulho de pericarpo de repolho
 30 (*Ceutorhynchus* spp.) e afídeos em plantações de óleo de semente, tais co-
 mo canola (colza), semente de mostrada e híbridos dos mesmos, e também
 arroz e milho. Em uma modalidade particular, o inseto pode ser um membro

da *Spodoptera*, mais particularmente, *Spodoptera exigua*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* ou *Euschistus* sp.

A aplicação de um controle de pesticida efetivo a quantidade de um sobrenadante, filtrado ou extrato contendo um metabólito pesticidamente ativo, ou composto isolado produzido pela *Chromobacterium* sp. ou aplicação de combinações do precedente é provido. A cepa ou sobrenadante ou filtrado ou extrato, metabólito e/ou composto são aplicados, isoladamente ou em combinação com outra substância pesticida, em um controle de peste efetivo ou quantidade pesticida. Uma quantidade efetiva é definida conforme as aquelas quantidades de células de microrganismo, sobrenadante, filtrado ou extrato, metabólito e/ou composto isoladamente ou em combinação com outra substância pesticida que é suficiente para modular a infestação por peste. A taxa efetiva pode ser afetada pela espécie de peste presente, estágio do crescimento da peste, densidade de população de peste, e fatores ambientais, tais como temperatura, velocidade do vento, chuva, momento do dia e sazonalidade. A quantidade que estará dentro de uma faixa efetiva em uma instância particular pode ser determinada por testes de campo ou laboratório.

EXEMPLOS

A composição e métodos exibidos acima serão adicionalmente ilustrados nos Exemplos não limitantes a seguir. Os exemplos são ilustrativos de várias modalidades apenas e não limitam a invenção reivindicada em relação aos materiais, condições, razões de peso, parâmetros de processo e similares citados aqui.

Exemplo 1: EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS A PARTIR DE CHROMOBACTERIUM SUBSTUGAE

O procedimento a seguir é utilizado para a purificação de compostos extraídos a partir da cultura de *Chromobacterium substugae*:

O caldo de cultura derivado a partir de fermentação de 10L de *C. substugae* em caldo de L é extraído com resina Amberlite XAD-7 (Asolkar *et al.*, 2006) por agitação da suspensão de célula com resina em 225 rpm durante duas horas à temperatura ambiente. A resina e a massa celular são

coletadas por filtração através de gaze de algodão e lavadas com água DI para remover sais. A resina, massa celular e a gaze de algodão são então embebidas durante 2h em acetona/metanol (50/50) após o que a acetona/metanol é filtrada e secada sob vácuo utilizando evaporador rotativo para
5 fornecer extrato bruto. O extrato bruto é então fracionado através da utilização de cromatografia de exclusão por tamanho Sephadex LH 20 (CH₂C1₂/CH₃OH; 50/50) para fornecer 7 frações (Figura 1). Essas frações são então concentradas para secagem utilizando evaporador rotativo e os resíduos de secagem resultantes são classificados para atividade biológica
10 utilizando um ensaio de análise com Lagarta falsa-medideira (*Trichoplusia ni*) ou Lagarta militar da beterraba (*Spodoptera exigua*). As frações ativas são então sujeitadas à HPLC de fase reversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para fornecer compostos puros, que são então classificados em bioensaios mencionados acima para localizar/identificar os compostos ativos. Para confirmar a identidade do composto, dados de espectroscopia adicionais, tais como LC/MS e RMN são registrados.
15

Cromamida A (1) e composto B foram isolados a partir de frações 1 e 2 respectivamente, enquanto que a violaceína (2) e deoxiviolaceína (3) foram isoladas a partir da fração 5, todas as quais foram obtidas a partir
20 de cromatografia Sephadex LH 20. As estruturas desses compostos são exibidas na Figura 7.

Purificação de Compostos

A purificação de cromamida A (1) foi desempenhada através da utilização de coluna C-18 para HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A,
25 250 x 10), sistema de solvente de gradiente de água:acetonitrila (0-10 min, 80-75% de CH₃CN aquosa; 10-45 min, 75-60% de CH₃CN aquosa; 45-55 min, 60-50% de CH₃CN aquosa; 55-65 min, 50-100% de CH₃CN aquosa; 65-70 min, 100% de CH₃CN; 55-70 min, 0-80% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 2,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm. A cromamida A (1) de
30 composto ativo tem tempo de retenção 23.19 min.

A purificação do composto B da invenção foi desempenhada através da utilização de coluna C-18 para HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18

(2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente de água:acetonitrila (0-10 min, 80-75% de CH₃CN aquosa; 10-45 min, 75-60% de CH₃CN aquosa; 45-55 min, 60 - 50% de CH₃CN aquosa; 55-65 min, 50 - 100% de CH₃CN aquosa; 65-70 min, 100% de CH₃CN; 55-70 min, 0-80% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 2,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm, o composto ativo B, tempo de retenção 26,39 min (vide Figura 6).

A purificação de violaceína (2) e deoxiviolaceína (3) foram desempenhadas através da utilização de coluna C-18 para HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente de água:acetonitrila (0-10 min, 70-60% de CH₃CN aquosa; 10-40 min, 60 - 20% de CH₃CN aquosa; 40-60 min, 20 - 0% de CH₃CN aquosa; 60-65 min, 100% de CH₃CN; 65-75 min, 0-70% de CH₃CN aquosa) em taxa de fluxo de 2,5 mL/min e detecção de UV de 210 nm, os compostos ativos de violaceína (2) tiveram um tempo de retenção de 7,86 min e de deoxiviolaceína (3), tempo de retenção 12,45 min.

Análise de Espectroscopia de Massas de Compostos

A análise de espectroscopia de massas de picos ativos é desempenhada em um instrumento eletroaspersor Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ESI) utilizando ambos os modos de ionização positivo e negativo em um modo de varredura completa (m/z 100-1500 Da) em um Espectômetro de Massas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). O instrumento Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) equipado com detector Finnigan Surveyor PDA plus, autoamostrador plus, bomba MS e uma coluna de 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5 μ 100A (Phenomenex). O sistema de solvente consistiu em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A fase móvel se inicia em 10% de solvente B e é aumentada linearmente para 100% do solvente B ao longo de 20 min e então mantida durante 4 min, e finalmente retirada para 10% do solvente B ao longo de 3 min e mantida durante 3 min. A taxa de fluxo é 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 10 μ L e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em um autoamostrador. Os compostos são analisados por LC-MS utilizando o LC e a cromatografia de fase reversa. A análise de espectroscopia de massas dos presen-

tes compostos é desempenhada sob as seguintes condições: A taxa de fluxo do gás nitrogênio foi fixado em 30 e 15 arb para o estojo e a taxa de fluxo de gás de arraste/aux, respectivamente. A ionização de eletroaspersão foi desempenhada com uma tensão de aspersão estabelecida em 5000 V e uma
5 tensão capilar em 35,0 V. A temperatura capilar foi estabelecida em 400°C. Os dados foram analisador no software Xcalibur. A cromamida A (1) tem uma massa molecular de 860 no modo de ionização positiva (vide Figura 2). O cromatograma LC-MS para outro composto ativo B sugere uma massa molecular de 874 no modo de ionização positiva. A violaceína (2) e a deoxi-
10 violaceína (3) tiverem massas moleculares de 313 e 327 respectivamente no modo de ionização positiva.

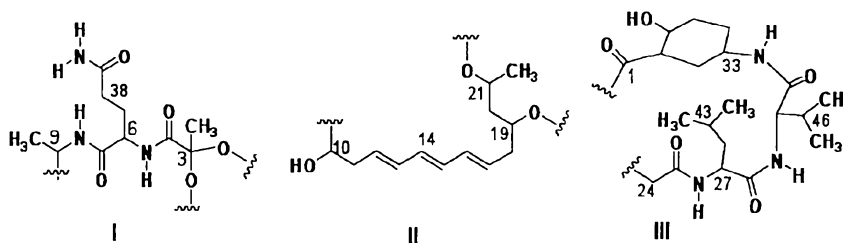
Análise de Espectroscopia RMN de Compostos

Os espectros de RMN-RMN foram medidos em um espectrômetro de campo de gradiente Bruker 600 MHz. A referência é estabelecida no
15 tetrametilsilano padrão interno (TMS, 0.00 ppm). As análises de aminoácido foram executadas no analisador de aminoácido 8800.

Para elucidação de estrutura, a cromamida A purificada com peso molecular 860 é adicionalmente analisada utilizando um instrumento de RMN de 600 MHz, e tem valores de ^1H RMN 6 em 8.89, 8.44, 8.24, 8.23,
20 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 (vide Figura 4) e tem valores de ^{13}C RMN de 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98,
25 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (vide Figura 5). A cromamida A foi isolada como um sólido branco, que, analisado para a fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (13 graus de instauração), por espectrometria de massas de alta resolução ESI (obsd M^+ m/z
30 861.5376, calcd M^+ m/z 861.5343) (Figura 3). Os dados espectrais de ^1H RMN de cromamida A em DMSO-d_6 exibidos sinais de próton 68, em que

nove prótons [δ_H : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96, 7.64, 6.65, 5.10, 4.13], foram designados como NH ou OH devido à falta de correção de carbono em uma análise de RMN de correlação heteronuclear (HMQC). O espectro ^{13}C RMN mostrou sete sinais de carbonil [δ_C : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45] e no espectro de ^1H RMN, seis sinais de prótons de α -amino característicos [δ_H : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] foram observados, o que demonstra que a cromamida A é um peptídeo.

A interpretação de dados de 2D RMN levaram à designação de três unidades de aminoácido dos seis, uma leucina (Leu), uma valina (Val) e uma glutamina (Gln). A presença desses aminoácidos foi confirmada pelos resultados de análise de aminoácido, que também mostraram a presença dos três aminoácidos acima. A análise adicional de DEPT e dados espectrais de 2D RMN (COSY, HSQC e HMBC) estabeleceu a presença de três sub-estruturas I, II e III conforme mostrado abaixo.



As conexões das três sub-estruturas em 1 foram obtidas por análise de HMBC RMN de rotina utilizando correlações entre o próton de α -amino e/ou o próton de amida secundária e as ressonâncias de carbonil carbono e consideração de deslocamento químico. A ligação de C-9 a partir da sub-estrutura I para C-10 a partir da sub-estrutura II foi estabelecida por correlações de HMBC a partir de CH_3 -40 [δ_H : 1.00] e o próton de α -amino de alanina [δ_H : 3.42] para o carbono C-10 [δ_C : 70.11]. Isso foi adicionalmente confirmado pela correção de HMBC de três ligações a partir de hidroxila em [δ_H : 5.10] para C-9 em [δ_C : 49.78]. O metileno em [δ_H : 3.50] a partir da sub-estrutura III mostrou uma correlação de HMBC de três ligações para C-19 [δ_C : 68.31] que conectou a sub-estrutura I e II. O carbono quaternário em C-3 [δ_C : 98.09] foi conectado a C-21 [δ_C : 64.40] através de uma correlação fraca a

partir de H-21 [δ_{11} : 3.95] juntamente com seus valores de deslocamento químico para formar um sistema de anel. Por fim, a ligação de fechamento de anel foi presa por uma correlação de HMBC de três ligações a partir de H₃-36 [δ_A : 1.43] para C-1 [δ_C : 172.17], que permitiu que a estrutura planar de cromamida A (1) fosse designada.

O composto B com um peso molecular 874 exibiu dados de RMN e UV semelhantes sugerindo que esse composto B também pertença à classe de peptídeo.

A estrutura para violaceína (2) e deoxiviolaceína (3) foi designada por comparação dos dados desses compostos com aqueles publicados na literatura. As estruturas de cromamida A, violaceína e deoxiviolaceína são mostradas na Figura 7.

Exemplo 2: Análise de aminoácidos de cromamida A

Cromamida A (0,05 mg) foi hidrolisada por utilização de hidrólise de fase líquida (HCL 6N, 1% de Fenol, 110°C, 24h, em vácuo). Após o resfriamento, a mistura de reação foi secada e o produto hidrolisado foi dissolvido em tampão de diluição de Norleu para 1,0 mL de volume. 50 μ l da amostra foram carregados na coluna de troca de íon para análise.

Para padrões e calibração, uma solução de padrões de aminoácido para hidrolisato de proteína no Hitachi 8800 à base de Na (Sigma, A-9906) é utilizada para determinar fatores de resposta, e então calibrar o analisador Hitachi 8800 para todos os aminoácidos. Cada injeção contém Norleucina como um padrão interno para permitir a correção dos resultados para variações em volume de amostra e variáveis de cromatografia. O sistema utiliza tampões Pickering Na, Pierce Sequanal grau HCl (hidrólise), uma coluna de Troca de Íon Transgenômica e um método otimizado desenvolvido pela Molecular Structure Facility (MSF), UC Davis, e o aminoácido individual presente na amostra são relatados. Os aminoácidos presentes na amostra (cromamida A) foram verificados como sendo Glx (Glutamina/Ácido glutâmico), leu (leucina) e Val (Valina).

Exemplo 3: Confirmação de toxicidade em Lagarta falsa-medideira (*Trichoplusia ni*)

A toxicidade do composto de interesse na fração 1 (F1) foi confirmada em um ensaio *in vitro* utilizando 1º. ínstar de larvas de lagarta falsa-medideira como um objeto de teste.

5 Duas centenas de microlitros de dieta de lagarta falsa-medideira comercial foram distribuídas em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Após a dieta ter solidificado, 100 uL de solução contendo 50 uL de extrato (correspondente a quatro picos individuais verificados na fração 1; H1-H4), 350 uL de EtOH e 600 uL de água DI esterilizada foram pipetados em cada poço, após o que a placa foi secada utilizando um ventilador portátil. A quantidade de extrato em cada poço era de 10 microgramas. Cada tratamento foi replicado oito vezes, e uma mistura de etanol puro e água foi utilizada como um controle negativo.

15 Um inseto de teste (1º. ínstar de larva de lagarta falsa-medideira) foi colocado em cada poço, e a placa foi coberta com uma vedação adesiva. A vedação foi perfurada para aeração, e a placa vedada foi incubada a 26°C durante quatro dias.

Os resultados apresentados na Tabela 1 abaixo mostram boa atividade (>60% de mortalidade) com um composto no pico H1. Esse pico particular corresponde à cromamida A (1) (FIG.1).

20

Tabela 1:

Mortalidade de Lagarta falsa-medideira (%) em 10 ug/poço

F1 H1	66,7
F1 H2	11,1
F1 H3	33,3
F1 H4	11,1

Exemplo 4 - Determinação de LC₅₀ para violaceína para Lagarta falsa-medideira (*Trichoplusia ni*)

25 O sistema de ensaio de placa de 96 poços descrito no exemplo anterior foi utilizado para determinar a concentração de violaceína pura necessária para matar 50% do 1º. ínstar de larva de lagarta falsa-medideira. Os valores de mortalidade registrados após 4 dias de incubação a 26°C são

apresentados na Tabela 2 abaixo. Com base nos dados, a violaceína é um inseticida potente com um valor de LC_{50} estimado em $7 * 10^{-6}$ microgramas por poço para larva de lagarta falsa-medideira em um ensaio de camada de dieta *in vitro*.

5

Tabela 2.

Efeito de Violaceína na Moralidade de Lagarta falsa-medideira

Violaceína ug/poço	% de mortalidade Dia 4
10	100
1	100
0,1	100
0,01	100
0,001	100
0,0001	100
0,00001	71,4
0,000001	14,2
1E-07	0

EXEMPLO 5 - Atividade nematicida de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) em Nematódeos das Galhas Jovens

Para avaliar o efeito de *C. substugae* esterilizada por filtro na mobilidade (e recuperação subsequente) de nematódeos das galhas (*Meloidogyne incognita* VW6) jovens (J2), o seguinte teste foi conduzido em placas de cultura celular plástica de 24 poços:

Uma alíquota de 300 ul de cada solução de teste (tanto caldo esterilizado por filtro de 1x quanto 0,1x) foi adicionada em poços apropriados após o que quinze nematódeos dispensados em 10 ul de água DI foram adicionados em cada poço, a placa foi fechada com uma tampa e incubada a 25°C durante 24 horas. Água e Avid (avermectina) em diluição de 20,000x foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. O efeito de cada composto na mobilidade de nematódeos foi checado após 24 horas por inserção de sonda em cada nematódeo com uma agulha, e a proporção de nematódeos imóveis em cada tratamento foi registrada em uma ca-

derneta utilizando uma escala %. Para avaliar a recuperação da mobilidade em cada tratamento, um volume de 200 µl foi removido de cada poço e a solução remanescente em cada poço foi diluída pela adição de 2 mL de água DI. As placas foram agora incubadas durante 24 horas conforme descrito acima, após o que a segunda avaliação de mobilidade (48 - hora) foi desempenhada.

Os resultados apresentado nas Figuras 8 e 9 mostram que o caldo esterilizado por filtro não diluído pode imobilizar nematódeos das galhas juvenis de vida livre. Esse efeito dura pelo menos 48 horas, o que sugere que o caldo de *C. substugae* tem atividade nematicida.

Exemplo 6: Efeito de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) em Embugalhamento de Raízes de Pepino

MBI-203 foi testada para sua atividade intrínseca contra os nematódeos das galhas *Meloidogyne sp.* em dois testes de mini-imersão.

15 *Materiais e Métodos*

Especificamente, a MBI-203 foi testada em um ensaio de estufa conduzido em recipiente 45 ml. Sementes de pepino cf. Toshka foram semeados diretamente em recipientes preenchidos com um solo de marga arenoso. Dez dias após os recipientes serem, cada um, tratados com 5 ml de uma suspensão. posteriormente, recipientes foram inoculados com 3000 ovos de *M. incognita*. Quatro replicações foram preparadas para cada tratamento e taxa. A triagem foi colhida quatorze dias após a aplicação e inoculação da triagem. O embugalhamento da raiz foi avaliado de acordo com o índice de embugalhamento de Zeck (Zeck, 1971). Condições específicas são exibidas abaixo na Tabela 3.

A fitotoxicidade foi medida como uma redução de crescimento da muda de pepino emergente em comparação com o controle.

Tabela 3

MBI-203	
Fostiazato (Standard, EC 150)	
5	Espécie de Teste <i>Meloidogyne sp.</i> Aplicada em 3000 ovos por recipiente de mini-imersão (em 2 ml)
	Planta de Teste <i>Cucumis sativus</i> (pepino cf. Toschka)
	Formulação de Teste MBI-203 = 96% de formulação líquida
10	Concentrações de Teste para MBI-203 Teste de mini-imersão #1: 100, 50 ml/L Teste de mini-imersão #2: 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
	Aplicação de Teste Aplicação de imersão

ResultadosTeste de mini-imersão no. 1

15 A atividade dos tratamentos foi alta e uma redução de quase 100% foi observada quando aplicada em uma concentração de 50 ml/L (MBI- 203). Menor fitotoxicidade foi observada para MBI-203. O fostiazato desempenhou conforme o usual (100% de controle em 20 ppm).

Teste de mini-imersão no. 2

20 A MBI-203 mostrou fitotoxicidade nas concentrações mais altas de 50 e 25 ml/L e as avaliações não puderam ser realizadas nessas taxas.

Em uma concentração de 12,5 ml/L de controle de nematódeos foi acima de 95%, o que diminuiu para 33% em 3 ml/L. Em uma taxa de 1,5 ml/L, nenhuma atividade foi registrada.

25 O fostiazato desempenhou conforme o usual (100% de controle em 20 ppm).

Exemplo 8: Estudos Sinérgicos com testes de Sinergia de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203)

30 Foram desempenhados testes sinérgicos por dieta artificial de tratamento em placas de 96 poços e dieta tratada de alimentação para larvas neonatas. 100 µL de tratamento foram pipetados em poços múltiplos de cada placa. MBI-203 (o caldo celular inteiro concentrado em 7,6% de peso celular seco) isoladamente, o inseticida comercial isolado, e a combinação

dos 2 foram testados utilizando concentrações de LC_{50} predeterminadas ou frações dos mesmos. A dieta foi secada por ventilador para remover o excesso de umidade. Lagarta militar da beterraba nenoata, *Spodoptera exigua*, ou Lagartas falsa-medideiras, *Trichoplusia ni*, foram transferidas para cada 5 poço da placa de poços múltiplos. Placas infestadas foram cobertas com vedador de placa adesivo e um único orifício pequeno foi empurrado para dentro do vedador sobre cada poço para permitir a aeração. As placas foram armazenadas em um incubador em 26°C, 16h de luz/8h de ciclo escuro durante 3 dias. No terceiro e quarto dias após a infestação, a mortalidade foi 10 obtida.

A determinação de uma interação sinérgica, antagonista ou aditiva foi determinada utilizando os métodos de (Colby 1967). Devido à variação em bioensaios, determinou-se que as razões entre 0 e 0,9 seriam consideradas antagonistas, razões entre 0,9 -1,1 seriam aditivas e as razões acima de 1,1 seriam considerados relacionamentos sinérgicos. 15

A sinergia de MBI-203 com inseticidas contra Lagartas falsa-medideiras foi testada. Clorantranilipol (comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spirosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Espirotetramato 20 (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) e Piretro/piretrinas (comercializadas como Pyganic®, Arbico Organics) foram testados com MBI-203. Conforme notado acima, exceto onde indicado, concentrações de LC_{50} de MBI-203 e inseticidas foram utilizadas. Os resultados são mostrados na Tabela 4. Todos, exceto Bt var. kurstaki e 1 instância de concentração de 25 LC_{50} mostrou sinergismo.

Tabela 4:

MBI-203 +Inseticida: Efeito em Lagartas falsa-medideiras

Produto	MBI-203 isolada % de Morte	Produto isolado % de Morte	Combo Calculado % de Morte	Combo Real % de Morte	Razão	Relações Definidas
Clorantranilipol	21	3	23,4	33,3	1,42	sin
Bt var. kurstaki	61,7	89,6	96	100	1,04	adit
Spinosad	41,5	54,3	72,99	100,00	1,37	sin
Espirotetramato	87,9	23,8	86,34	89,87	1,04	adit
Espirotetramato (0,5X LC ₅₀); MBI-203 (0,3X LC ₅₀)	90,6	41,5	91,90	94,94	1,03	adit
Piretro	19,7	2,8	21,93	55,37	2,53	sin

^a sin=sinérgico; adit= aditivo.

A sinergia de MBI-203 com inseticidas contra Lagarta militar da beterraba (BAW) foi testada. Clorantranilipol (comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Espirotetramato (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) e Piretro/piretrinas (comercializadas como Pyganic®, Arbico Organics) foram testadas com MBI-203. Conforme notado acima, exceto onde indicado, concentrações de LC₅₀ de MBI-203 e inseticidas foram utilizados. Os resultados são mostrados na Tabela 5. A MBI-203 e Clorantranilipol interagiram aditivamente enquanto *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* e Spinosad mostrou controle sinérgico de BAW com MBI-203. Combinações de piretro com MBI-203 foram antagonistas. Combinações de espirotetramato e MBI-203 foram primariamente antagonistas contra Lagarta militar da beterraba.

Tabela 5:

MBI-203 +Inseticida: Efeito em Lagarta militar da beterraba

Produto	MBI-203 isolada % de Morte	Produto isolado % de Morte	Combo Calculado % de Morte	Combo Real % de Morte	Razão	Relações Definidas
Cloranthranilipol	11,6	9,1	19,69	19,9	1,01	adit
Bt var. kurstaki	24,5	19,8	39,4	68,3	1,73	sin
Spinosad	23,8	68,7	83,33	100	1,2	sin
Espirotetramato	0	21,6	36,10	27,60	0,76	antag
Espirotetramato (0,53X LC ₅₀); MBI-203 (0,7X LC ₅₀)	0	42,9	38,55	41,67	1,08	adit
Espirotetramato	21,4	53,3	60,57	53,70	0,89	antag
Espirotetramato (1,4X LC ₅₀); MBI-203 (1,2X LC ₅₀)	10	77,5	78,22	41,23	0,53	antag
Piretro	14,4	74,5	78,17	12,16	0,16	antag
Piretro	70,7	11,1	73,97	27,78	0,38	antag

^a sin=sinérgico; adit= aditivo; antag=antagonista.

embora esta invenção tenha sido descrita com referência a modalidades específicas, os detalhes da mesma não devem ser interpretados como limitantes, uma vez que é óbvio que se pode utilizar vários equivalentes, alterações e modificações e ainda estar dentro do escopo da presente invenção.

Várias referências são citadas ao longo desta especificação, cada uma das quais está incorporada aqui por referência em sua totalidade.

Referências

Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759.

Arena, J. P., K. K. Liu, et al. (1995). "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological acti-

vity." Journal of Parasitology 81: 286-294.

Balibar, C.J. and C.T. Welsh (2006). "In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*." Biochemistry 45: 15444-15457.

5 Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, et al. (1996). "Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach." Environmental Toxicology and Chemistry 15(4): 525-534.

Chitwood, D. J. (2003). Nematicides. Encyclopedia of Agrochemicals, vol 3. J. R. Plimmer. New York, John Wiley & Sons. 3: 1104-1115.

10 Colby, S. R. (1967). "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations." Weeds 15(1): 20-22.

Durán, N., G. Z. Justo, et al. (2007). "Minireview. Violacein: properties and biological activities." Biotechnol. Appl. Biochem. 48: 127-133.

15 Durán, N. and C. F. M. Menck (2001). "*Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives." Crit. Rev. Microbiol. 27: 201-222.

Farenhorst, M., B. G. J. Knols, et al. (2010). "Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes." PLoS ONE 5(8): e12081.

20 Hoshino, T., T. Takano, et al. (1987). "Biosynthesis of violacein: origins of the hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus." Agric. Biol. Chem. 51: 2733-2741.

25 Hummelbrunner, L. A. and M. B. Isman (2001). "Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae)." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(2): 715-720.

Hungria, M., S. Astolfi-Filho, et al. (2005). "Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon." Lett. Appl. Microbiol. 41: 17-23.

30 Krieg, A., A. M. Huger, et al. (1983). "*Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. 96: 500-508.

Kämpfer, P., H.-J. Busse, et al. (2009). "*Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2486-2490.

5 Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, et al. (2007a). "*Chromobacterium substugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 993-999.

Martin, P.A., A.D.S. Shropshire, et al., (2007b). "*Chromobacterium substugae* sp. nov for control of insect pests" U.S. Patent No. 7244607 B2.

10 Martin, P.A.W., Hirose, E., and Aldrich, J.R. 2007c. " Toxicity of *Chromobacterium substugae* to southern green stink bug (Heteroptera:Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae)". J. Econ. Entomol. 100: 680-684.

15 Martin, P. A. W. (2004). "A freeze-dried diet to test pathogens of Colorado potato beetle." Biological Control 29(1): 109-114.

McClellan, K. H., M. K. Winson, et al. (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones" Microbiology 143: 3703-3711.

20 Meunier, L., P. Carubel, et al. (1999). Insecticidal combinations including an insecticide from the family chloronicotynyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. U. States. United States, Rhone-Poulenc Agrochimie: 6.

25 Pederson, M. and H. S. Woldum. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, US 2009/0111579, published April 30 2009.

Puritch, G. and G. Salloum. Environmentally Safe Insecticide, US 5047424, issued September 10, 1991..

30 Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol 104(1): 14-20

Ryan, K. S. and C. L. Drennan (2009). "Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products." Chemistry&Biology 16: 351-364.

5 Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol 104(1): 14-20.

Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science 56: 696-702.

10 Whitehead, A. G. (1998). Plant nematode control. Wallingford, UK, CAB International.

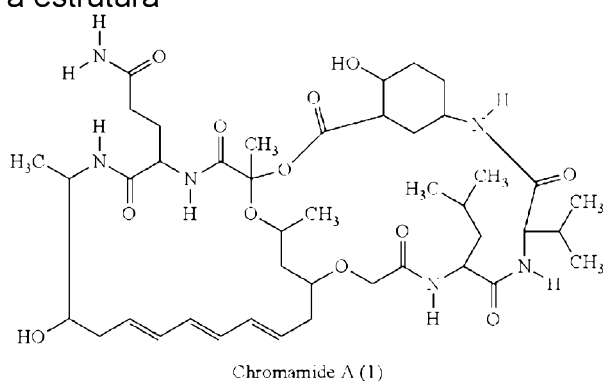
Wirth, M. C., J. A. Giannino, et al. (2004). "Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*." Journal of Medical Entomology 41: 935-941.

15 Young, C.-C., A. B. Arun, et al. (2008). "*Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 877-880.

Zeck W.M. (1971) Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten Bayer 24,1: 144-147.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição inseticida, caracterizada por compreender o composto conforme a estrutura



, e

5 um transportador, diluente, surfactante ou adjuvante.

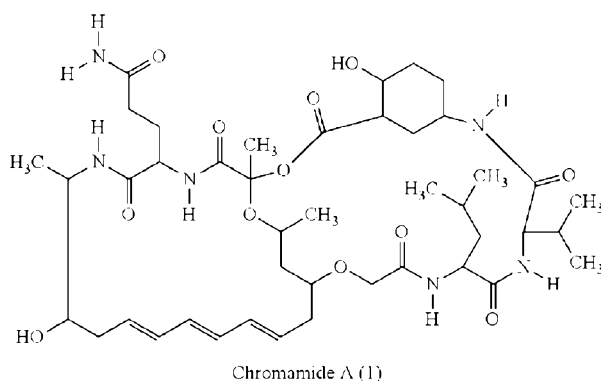
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o composto é isolado de *Chromobacterium subtsugae*.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a *Chromobacterium subtsugae* é *Chromobacterium subtsugae* sp. nov (NRRL B-30655).

4. Método para obtenção de um composto a partir de *Chromobacterium subtsugae*, caracterizado por compreender:

(A) a cultura de uma cepa de uma *Chromobacterium subtsugae* em um caldo celular inteiro sob condições suficientes para produzir o referido composto; e

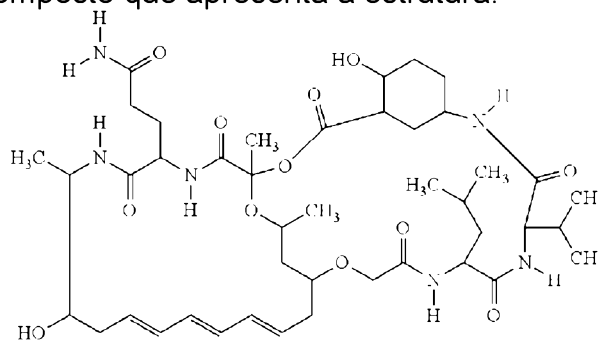
(B) o isolamento do referido composto produzido em (A) a partir do referido caldo celular inteiro, em que o referido composto apresenta a estrutura:



5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que *Chromobacterium subtsugae* é *Chromobacterium subtsugae* sp.

nov (NRRL B-30655).

6. Método para modulação de infestação por insetos em uma planta, caracterizado por compreender a aplicação à planta, e/ou sementes da mesma e/ou substrato utilizado para crescimento da referida planta de uma quantidade do composto que apresenta a estrutura:



Chromamide A (1)

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o composto é isolado de *Chromobacterium subtsugae*.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a *Chromobacterium subtsugae* é *Chromobacterium subtsugae sp. nov* (NRRL B-30655).

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito composto é aplicado ao substrato.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o substrato é o solo.

11. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o composto é aplicado à planta.

12. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito composto é aplicado às sementes.

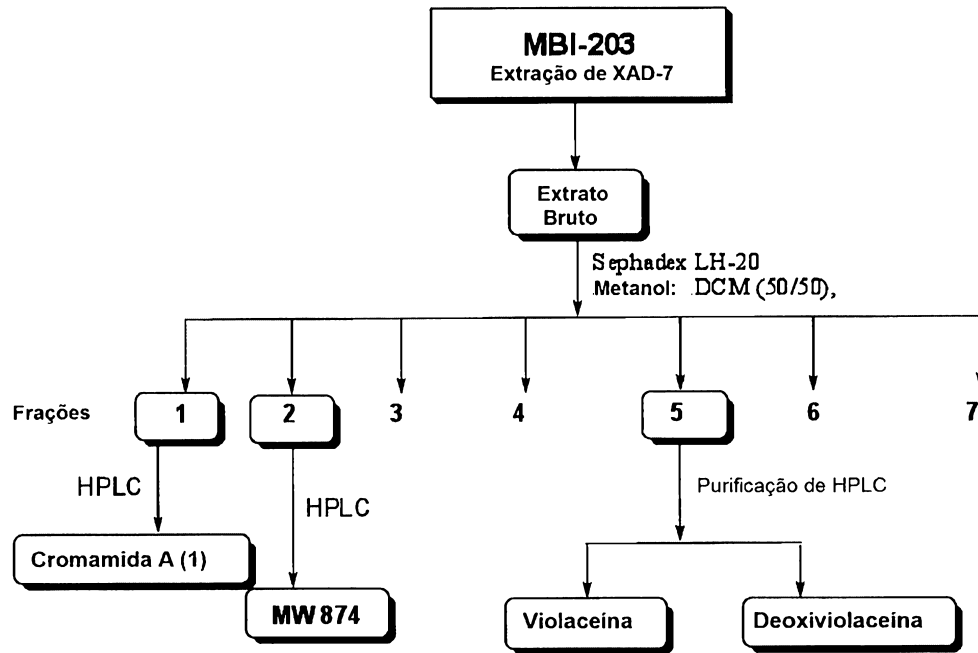


FIG. 1

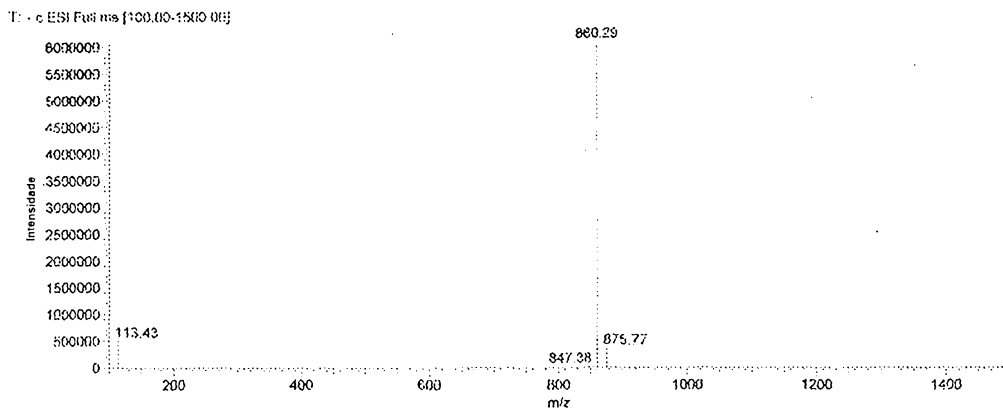
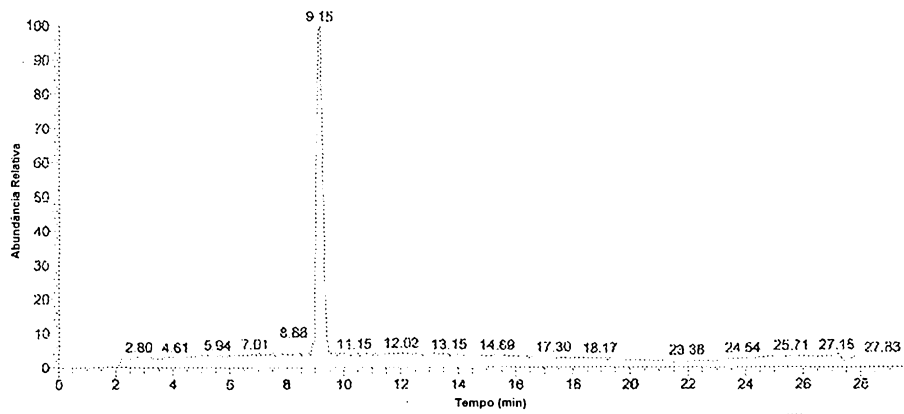
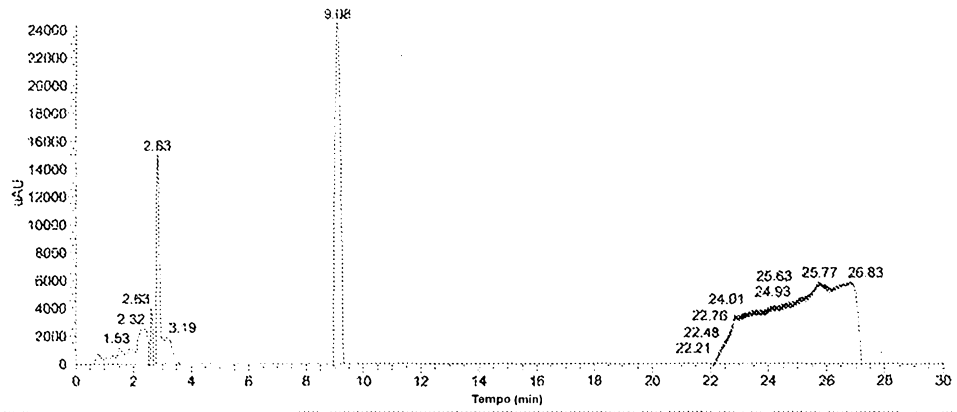


FIG 2

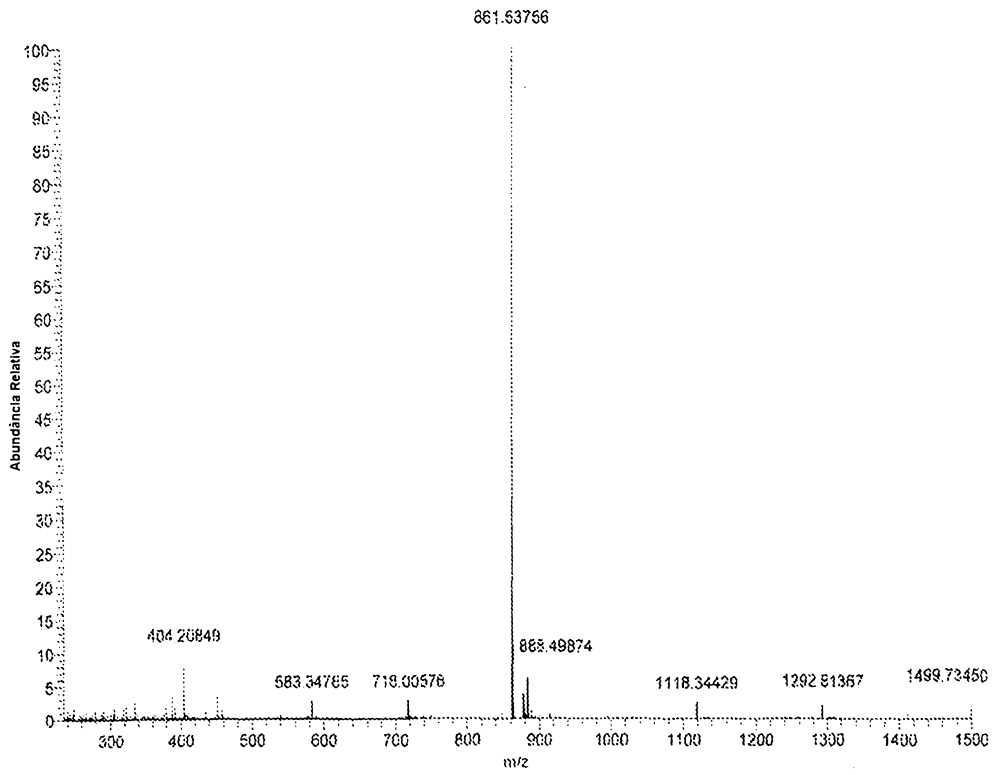


FIG 3

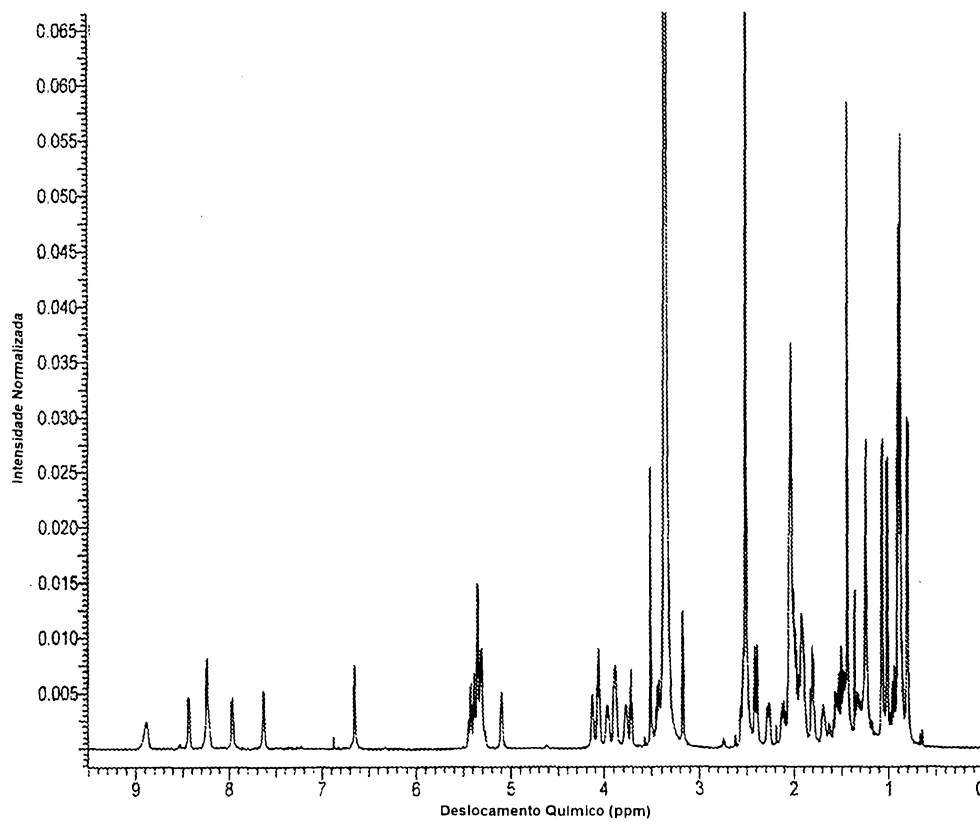


FIG. 4

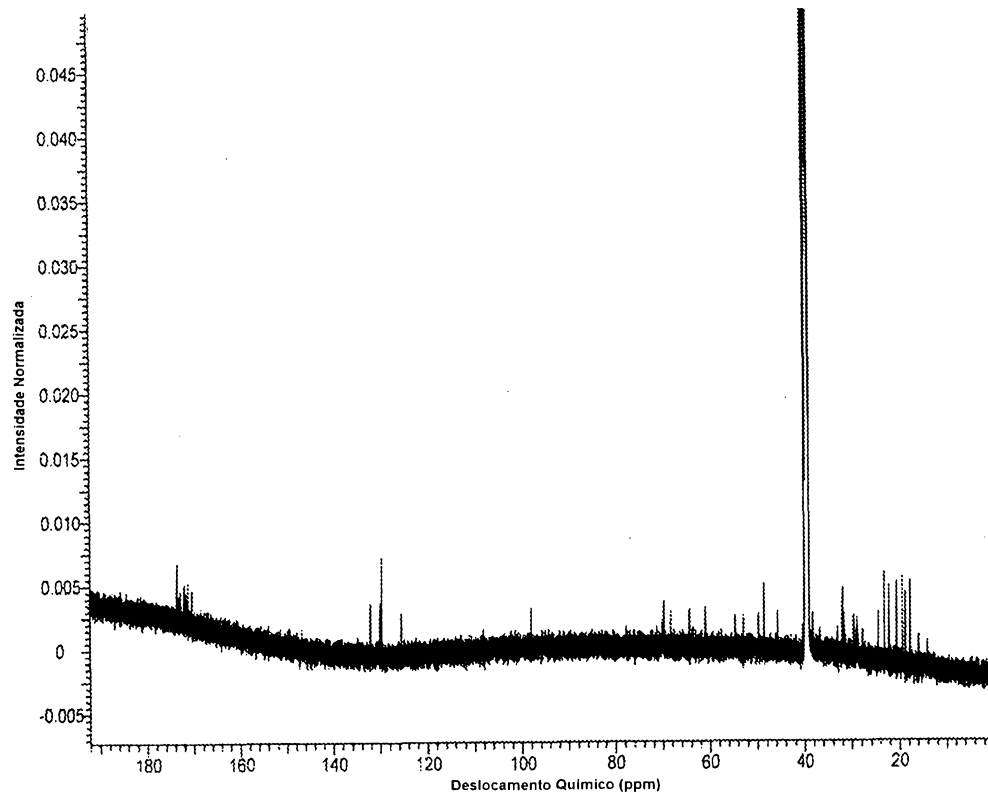


FIG. 5

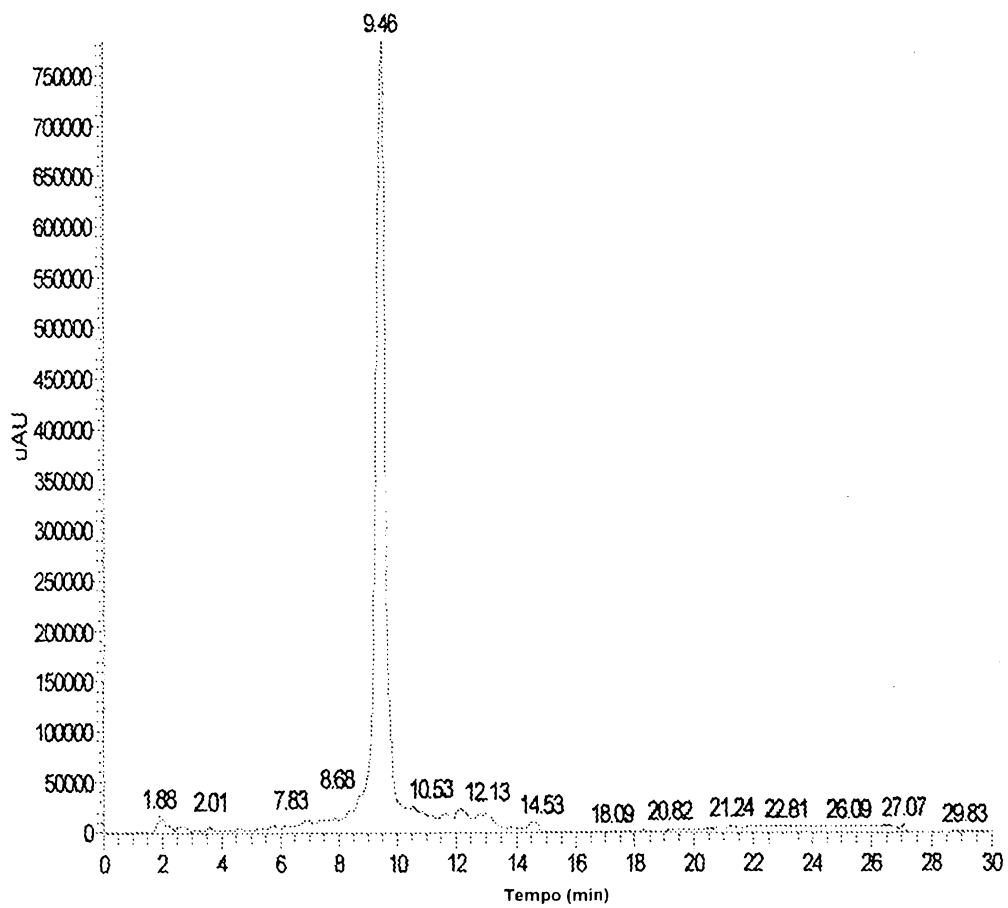
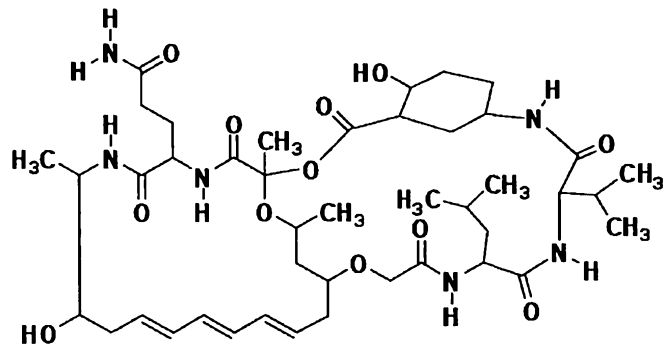
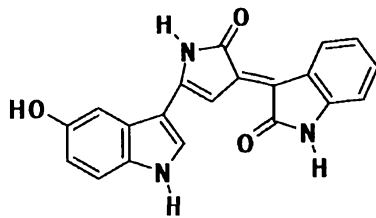


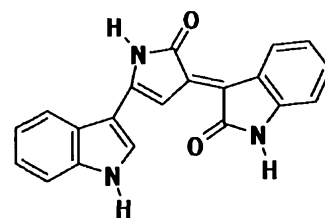
FIG. 6



Cromamida A (1)



Violaceína (2)



Deoxiviolaceína (3)

FIG. 7

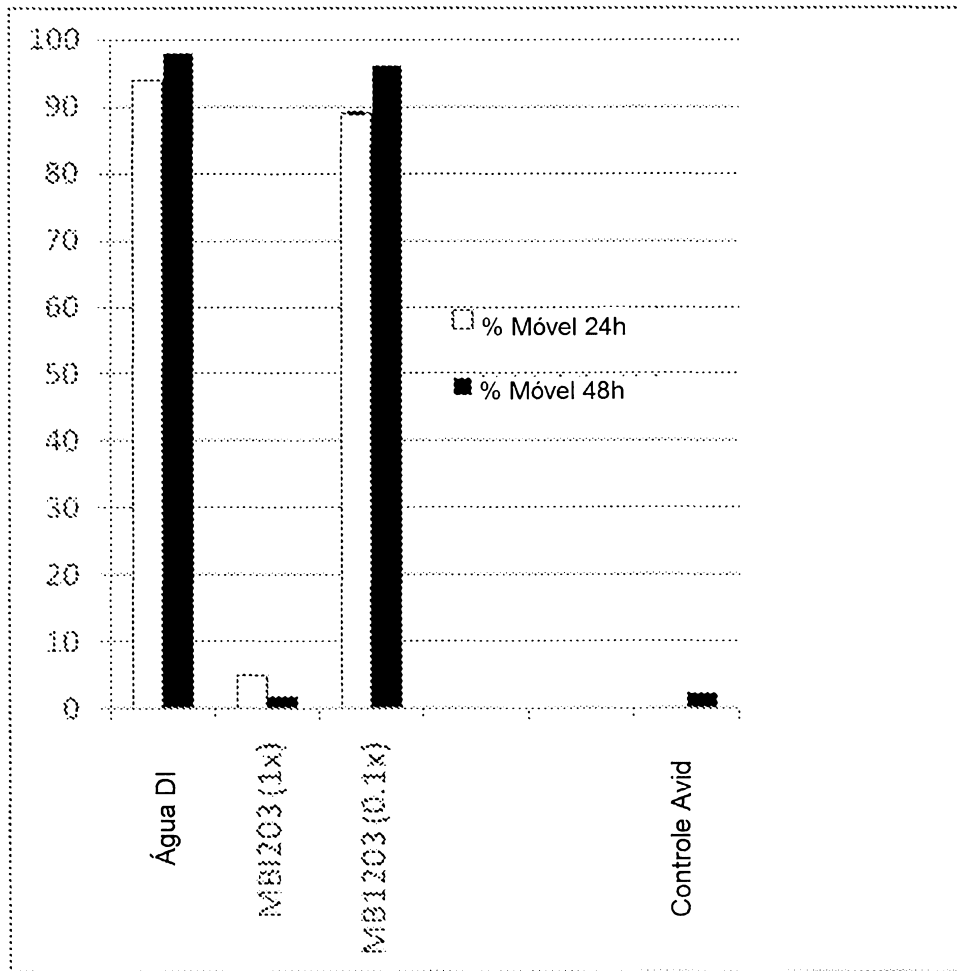


FIG. 8

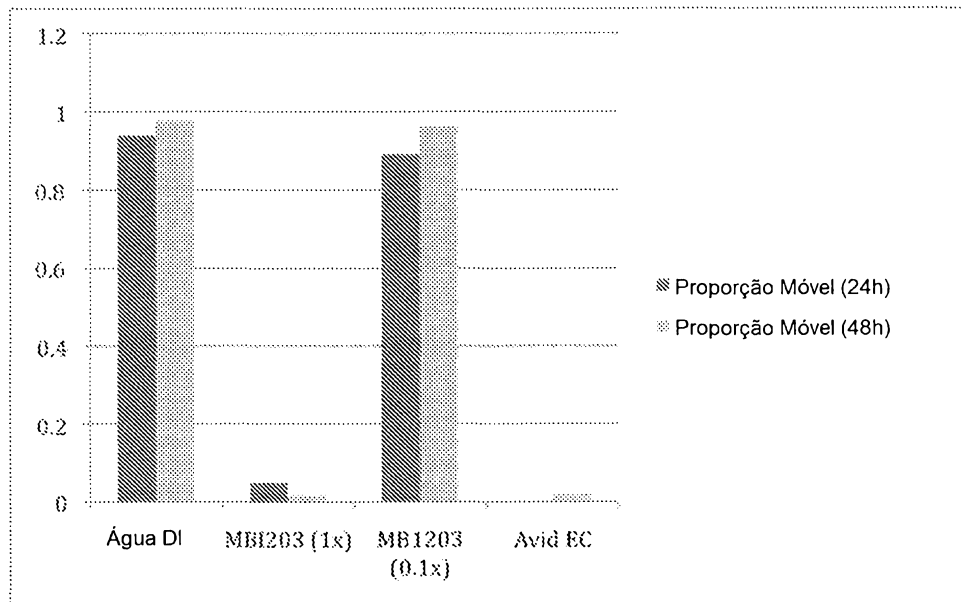


FIG.9