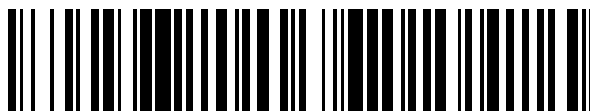


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 759**

51 Int. Cl.:

A61K 35/60 (2006.01)

A01N 35/02 (2006.01)

A01N 25/04 (2006.01)

A01N 41/02 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09821300 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2349293**

54 Título: **Composiciones de cinamaldehído-alicina y sus métodos de uso**

30 Prioridad:

17.10.2008 US 106191 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.02.2016

73 Titular/es:

**VALENT BIOSCIENCES CORPORATION (100.0%)
870 Technology Way
Libertyville, Illinois 60048, US**

72 Inventor/es:

**DEVISETTY, BALA, N.;
SHAMMO, BASSAM;
REHBERGER, LINDA, A.;
DICKENSON, REBECCA;
PATEL, HEEMANSHUBHAI, K. y
HEIMAN, DANIEL, F.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 559 759 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de cinamaldehído-alicina y sus métodos de uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a composiciones de cinamaldehído - alicina que tienen actividad sinérgica contra los nematodos parásitos de plantas y sus métodos de uso.

Antecedentes de la invención

10 Los nematodos parásitos de plantas causan graves daños económicos a muchos cultivos agrícolas en todo el mundo. Los nematodos de este grupo son gusanos microscópicos y en general son parásitos obligados de las plantas. Se alimentan principalmente de las raíces de las plantas huéspedes; sin embargo, varios géneros son conocidos por parasitar partes sobre el suelo incluyendo tallos, hojas y flores, también. Casi todas las especies de plantas de importancia económica son susceptibles a la infección por algunas especies de nematodos (excepciones notables son caléndulas y espárragos). Por ejemplo, nematodos de los nudos de la raíz (RKN), (*Meloidogyne spp.*) son capaces de parasitar más de 3,000 especies de plantas de cultivo. Estas plantas incluyen cultivos agronómicos, cultivos de hortalizas, árboles frutales, árboles de flores y arbustos. Según informes, los nematodos causan pérdidas de cosechas por valor de más de seis mil millones de dólares sólo en los Estados Unidos y más de cien mil millones de dólares en todo el mundo.

20 Los síntomas debido a una lesión de nematodos parásitos varían ampliamente dependiendo de la planta huésped, las especies de nematodos, la edad de la planta, la ubicación geográfica y las condiciones ambientales climáticas y externas. En general, se considera que un aspecto irregular en conjunto de las plantas en un campo es indicativo de infestación por nematodos. Más específicamente, los resultados de lesiones de nematodos en la excoiación de las raíces (hinchazón anormal en el tejido debido a la rápida multiplicación de las células en la región cortical) causada por especies de nematodos de nudo de la raíz (*Meloidogyne spp.*) y quiste (*Heterodera spp.*), la lesión (áreas decoloradas, localizadas) causadas por nematodos de lesiones (*Pratylenchus spp.*), supresión de la división celular que resulta en raíces cortas (*Trichodorus spp.*), anomalías de crecimiento incluyendo rizado o torsión de partes sobre el suelo (*Aphelenchoides spp.*), e incluso necrosis celular (muerte) en algunos casos. Los nematodos parásitos de plantas pueden ser endoparásitos en la naturaleza, como en el caso del nudo de la raíz y nematodos de la lesión, o ectoparásitos como en los nematodos daga (*Xiphinema spp.*) y nematodo lanza (*Hoplolaimus spp.*). Los nematodos pueden ser vectores de virus de plantas y también se sabe que inducen complejos de enfermedades, lo que predispone las plantas a la infección por otros hongos y bacterias patógenas de plantas.

30 Los nematicidas químicos, ya sea fumigantes de suelo o no fumigantes, han estado en uso durante muchos años y se encuentran entre las pocas opciones viables para combatir los nematodos. En la actualidad, se requieren aplicaciones repetidas de productos químicos sintéticos en el campo antes de la siembra del cultivo. Estos productos químicos son extremadamente tóxicos para los organismos no diana, además de nematodos y muchos de ellos pueden plantear graves amenazas para el medio ambiente. Con el énfasis en agua y aire limpios por grupos ambientalistas y agencias gubernamentales y la detección de muchos de estos principios activos o los metabolitos de los mismos en las aguas subterráneas y varios organismos no diana, ha habido gran preocupación en cuanto a la sabiduría de continuar el uso de estos productos químicos. Uno de los nematicidas más eficaces, económicos, y ampliamente utilizado, el DBCP (1,2-dibromo-3-cloropropano), encontrado en el agua subterránea ha sido juzgado por inducir la esterilidad masculina y la posible carcinogénesis. Otro producto químico ampliamente utilizado, el EDB (dibromuro de etileno), también se ha encontrado en el agua subterránea.

45 Se ha encontrado que otro insecticida-nematicida muy común, aldicarb (2-metil-2-(metiltio)-propionaldehído-o-(metilcarbamoil) oxima), tiene una alta toxicidad aguda. Se ha encontrado aldicarb en el agua subterránea en varias regiones de los Estados Unidos. 1,3-D (1,3-diclorpropeno), incluso otro fumigante y nematicida de suelo de uso común, se identifica como un probable carcinógeno. La EPA de los Estados Unidos revocó recientemente todas las tolerancias de residuos de carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamoil) sobre los cultivos y canceló algunos registros de productos después de determinar que el riesgo de la exposición agregada no cumple su norma de seguridad. La reciente decisión de la EPA para limitar y eventualmente suspender el uso del fumigante del suelo, bromuro de metilo, para fines agrícolas, incluyendo su efecto como un nematicida, presenta una amenaza a la eficiencia y calidad de la producción agrícola en los Estados Unidos.

50 Los productos naturales tales como N-acetil-D-glucosamina, que se pueden derivar de microorganismos y que son los productos de desecho de procesos de fermentación industrial, han sido revelados como nematicidas en la Patente de los Estados Unidos No. 5,057,141.

55 Los biopesticidas se han desarrollado como una alternativa a los pesticidas químicos. Se obtienen por fermentación y se pueden utilizar ya sea como una biomasa en bruto o purificada. Por lo general, la fermentación se lleva a cabo a temperaturas en el intervalo de 20-40 °C. Por ejemplo, fermentación sumergida a 28-30 °C de aislado fúngico de *Paecilomyces fumosoruaes* ATCC No. 20874 produce una biomasa de hongos para el control de la infestación de

nematodos como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,360,607; caldo de fermentación completa de la fermentación a 28 °C de *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12015 se revela como nematocida en la Patente de los Estados Unidos No. 5,182,207; caldo obtenido de la fermentación de *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus* NRRL 15773 a 28 °C es eficaz contra los nematodos como se revela en la Patente de los Estados Unidos No. 5,439,934; y el caldo obtenido por fermentación de los hongos *Myrothecium verrucaria* a temperaturas de 25 a 30 °C se revela como nematocida en la Patente de los Estados Unidos No. 5,051,255.

Sin embargo, todavía existe una necesidad para el desarrollo de nematocidas nuevos y eficaces. Las plantas se sugirieron como una fuente de compuestos pesticidas eficaces como muchos aceites esenciales de plantas muestran actividad antimicrobiana, insecticida, fungicida y herbicida. Han sido aplicados como pesticidas para el manejo de plagas, enfermedades y malezas.

Ciertos aceites esenciales de plantas han sido evaluados por la EPA de los Estados Unidos y se ha determinado que reúnen las condiciones para una exención de registro como plaguicidas de riesgo mínimo y se enumeran en 40 CFR § 152.25 (b). Sin embargo, una alta volatilidad, fitotoxicidad y baja solubilidad en agua de algunos aceites han limitado su uso en la protección de cultivos.

Un aceite esencial de planta utilizado en aplicaciones agrícolas es ProGuard® acaricida, fungicida e insecticida fluido de cinamaldehído al 30%, (Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,750,256 B1 y 6,251,951 B1). Sin embargo, una desventaja de este producto comercial es que contiene el conservante químico o-fenilfenol.

Se informó la actividad nematocida de aceites esenciales de plantas, entre otros, por Y. Oka (Nematology, Vol. 3(2), pp. 159-164, 2001) y R. Pandey (J. Phytopathology 148, 501-502 (2000)). Los aceites esenciales de algunas plantas y sus componentes se han probado para la actividad nematocida in vitro y en el suelo. Algunos aceites esenciales de plantas, que estaban decididos a tener actividad nematocida, incluyen los aceites esenciales de menta de manzana (*Mentha rotundifolia*), alcaravea (*Carum carvi*), hinojo (*Foeniculunn vulgare*), orégano (*Origanum vulgare*), orégano de Siria (*Origanum syriacum*), y tomillo silvestre (*Coridothymus capitatus*). También, se informó que los aldehídos aromáticos y alifáticos, incluyendo aldehído cinámico (también conocido como cinamaldehído) poseen una fuerte actividad nematocida in vitro. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,251,951 B1 demuestra que el cinamaldehído tiene actividad nematocida en presencia de un vehículo 2% de Tween 80 y 6% de NaHCO₃.

La Patente de los Estados Unidos No. 6,231,865 B1 describe un efecto sinérgico cuando el aceite de ajo o extracto se combina con aceites esenciales, lo que resulta en una actividad fungicida/insecticida mejorada. El extracto de ajo se define en esta patente como cualquier líquido eliminado de dientes de ajo y puede incluir aceite de ajo y agua. El aceite esencial preferido en la mezcla fue reivindicado para ser aceite de semilla de algodón y/o aceite de canela. Se utilizó lauril sulfato de sodio a 10% para emulsionar el extracto de ajo. Ningún intento se hizo para describir o cuantificar la composición real de jugo de ajo. Los constituyentes en el jugo de ajo pueden variar sustancialmente dependiendo de la fuente de ajo y el método de extracción. La actividad nematocida con el jugo de ajo, sin embargo, no se describe.

WO/2006/109028 "Un pesticida y repelente" describe el uso de concentrado líquido de ajo como un insecticida, nematocida y molusquicida. Se ha demostrado que el concentrado de ajo tiene las propiedades asociadas con extracto de ajo fresco/aceite de ajo en términos de su repelencia a diversas formas de vida y su acción como un pesticida, pero no requiere la etapa de destilación involucrada en el aislamiento del aceite de ajo y es estable al almacenamiento a largo plazo sin una disminución en la actividad del material. Se demostró que los componentes activos, alil poli-sulfuros, resultantes de la descomposición de la alicina en el concentrado líquido de ajo, estaban en el intervalo de 2 a 4% peso/peso. Esta solicitud de patente publicada también reveló que los sulfuros de dialilo de la fórmula RSR, RS₂R, RS₃R, y RS₄R representan el 66% (±10%) en peso del total de poli-sulfuros presentes. Se determinó que estos sulfuros de dialilo estaban presentes en la relación aproximada de 4-5%; 5-8%; 31-38%, y 19-22 % en peso, respectivamente, del total de poli-sulfuros presentes. La solicitud de patente publicada describe también una formulación granular de concentrado de ajo impregnado sobre harina de madera con un aglutinante. Los gránulos (NEMguard) fueron evaluados con éxito como nematocida.

WO 99/52359 A1 describe formulaciones activas de pesticidas sinérgicos de un aceite esencial, por ejemplo, aceite de ajo, aceite de canela o aceite de soja con lauril sulfato de sodio. GB 1 465 533 A describe emulsiones sinérgicas que comprenden aceite de canela y aceite de ajo para la protección de los productos alimenticios preparados a partir de hongos y bacterias. EP 0 843 965 A1 describe un método para proteger productos agrícolas, que comprende calentar una composición que contiene un aditivo alimentario volátil en una facultad para el cultivo de productos agrícolas, comprendiendo la composición cinamaldehído como el componente esencial, extracto de ajo y un emulsionante.

La actividad nematocida del componente de acetato de cinamilo de aceite a partir de *Cinnamomum verum* y de disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo de ajo (*Allium sativum*) se reportó por Park et al, in 2005 (Nematology 7(5), 2005, 767-774). Estos fueron los aceites esenciales más activos procedentes de especies de 43 plantas ensayadas. Los principales componentes de los aceites esenciales con actividad nematocida en el estudio del 2005 fueron reportados por Park et al, in 2002 (J. Pesti. Sci. 6, 2002, 271-278) por tener actividad insecticida o acaricida contra cinco principales plagas de artrópodos. El disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo de *Allium* fueron reportados por Auger et al,

(Agroindustria 3(3), 2004, 5-8) como que tienen una buena actividad contra hongos patógenos del suelo, insectos y termitas.

5 Aunque tanto el cinamaldehído y el extracto de ajo son conocidos en la literatura para su actividad nematocida, insecticida, fungicida y acaricida, el cinamaldehído puede dar lugar a la fitotoxicidad para las plantas diana especialmente cuando se utiliza en tasas nematocidas (500 ppm y por encima). A concentraciones de 300 ppm, la actividad nematocida sólo es marginal. Mientras que en dosis de 300 ppm y superiores, el extracto de ajo puede ser eficaz en el control de nematodos, y presenta no fitotoxicidad, su costo por acre tratado puede ser prohibitivo.

10 El extracto de ajo utilizado en los estudios de formulación anteriores es a menudo de base acuosa y la estabilidad de los componentes activos en preparaciones acuosas no está bien establecida. No existe una técnica previa para formulaciones que contienen concentrados versión en polvo seco de extracto de ajo (alicina) y cinamaldehído para el control eficaz y económico de los nematodos, hongos patógenos, insectos y ácaros.

De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de desarrollar sistemas de administración seguros, fácil de usar, rentables, con el fin de mejorar la eficacia biológica de los aceites esenciales de plantas/extractos de plantas, para aplicaciones agrícolas.

15 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones en suspensión de aceite emulsificable apropiadas para uso agrícola nematocida que comprenden cinamaldehído (también conocido como aldehído cinámico), alicina, aceite de soja, un emulsionante, un solvente, un aditivo reológico, un aditivo polar y un surfactante no iónico, en donde la relación cinamaldehído: alicina varía de 5:1 a 20:1 peso/peso.

20 La invención se refiere además a métodos para proteger una planta a partir de al menos un nematodo parásito de plantas que comprende la aplicación, en el locus, suelo o semillas de la planta, de una cantidad eficaz de las formulaciones reivindicadas. La frase "proteger una planta" significa el control del crecimiento de plagas y patógenos, que puede implicar matar las plagas y patógenos y/o ralentizar o detener su proliferación, o proporcionar una acción repelente o de confusión de modo que la plaga o patógeno sea incapaz de estar en contacto con la planta y atacarla. Las plagas y patógenos representativos incluyen los nematodos.

30 El control excelente de los nematodos del nudo de la raíz se obtiene a tasas de aplicación de estas composiciones que se reducen considerablemente en comparación con los requeridos para cada uno de estos ingredientes activos aplicados individualmente. Por ejemplo, una mezcla que comprende cinamaldehído de 100 a 250 ppm y que comprende además de 20 a 50 ppm de alicina da lugar a más de un 95% de reducción de excoriaciones en las raíces que cuando se aplicó cinamaldehído solo a 300 ppm o se aplica alicina sola a 300 ppm.

Descripción detallada de la invención

Se descubrió sorprendentemente que los problemas mencionados anteriormente causados por nematodos parásitos de plantas son resueltos por las composiciones de la presente invención que comprenden cinamaldehído y alicina

35 en ciertas relaciones, de tal manera que la composición sea sinérgica contra los nematodos. Se han desarrollado varias composiciones que comprenden tanto cinamaldehído como alicina.

40 En una realización, la invención proporciona una formulación apropiada para uso agrícola que comprende un concentrado en suspensión emulsificable, que comprende un ingrediente activo, cinamaldehído, disuelto en un solvente de baja volatilidad (tal como aceite vegetal) y un segundo ingrediente activo, alicina, como un polvo suspendido en la fase de aceite con la ayuda de un aditivo reológico apropiado y un emulsionante para facilitar la dilución en agua y la aplicación. La composición de la presente invención es más eficaz, no fitotóxica y requiere menos de cada ingrediente activo en la mezcla que cuando se utiliza individualmente cualquiera de los ingredientes activos etanol/agua (relación 95: 5) o metanol/agua (relación 95: 5) también se puede utilizar. La concentración del aditivo polar preferido puede variar de 0.5 a 3% peso/peso, y más preferiblemente es de aproximadamente 1% peso/peso de la formulación. El aditivo polar actúa como una cuña para abrir las plaquetas de arcilla con el fin de que sean capaces de desarrollar el máximo de gelificación. La formulación también puede contener otros aditivos apropiados, tales como un antioxidante y/u otros surfactantes para la penetración en el suelo de los ingredientes activos.

En otra realización, la invención proporciona un método para proteger una planta de al menos un nematodo parásito de plantas que comprende la aplicación a la planta de una cantidad eficaz de las formulaciones reivindicadas.

50 En una realización, el cultivo diana protegido contra los daños por nematodos puede ser cualquier vegetal, árboles frutales, viñas y cultivo en hileras de importancia económica. También puede ser césped, lecho de flores, plantas en macetas o un cultivo en vivero de plantas ornamentales o forestales.

En una realización, la aplicación de la formulación se realiza mezclándola en una cantidad apropiada de agua u otro portador líquido compatible y su aplicación al suelo o cosecha diana, ya sea por el equipo de aspersión o por medio de equipo de riego. El producto también se puede pulverizar sobre las plántulas o camas de siembra y se incorpora en el medio de cultivo o el suelo.

- 5 Estas realizaciones representativas son en absoluto limitativas y se describen únicamente para ilustrar algunos aspectos de la invención.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1

Tabla 1: Ejemplos de tres composiciones de formulación prototipo evaluadas para actividad nematocida

No.	Componente	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso
	ID de la formulación y relación de cinamaldehído: alicina	1-A 5:1	1-B 7:1	1-C 10:1
1	Isopar M (Aceite isoparafínico)	22.4	18.0	11.3
2	Éster metílico del aceite de soja	32.7	32.7	32.7
3	Cinamaldehído, 98.5%	11.1	15.5	22.2
4	Alicina (10%)	21.8	21.8	21.8
5	Arcilla organofílica hectorita	1.1	1.1	1.1
6	Ésteres de ácidos grasos de polioles y derivados polietoxilados de los mismos	9.8	9.8	9.8
7	Polisorbato 20 (Tween 20)	1.1	1.1	1.1
	Total	100	100	100

10

Método de preparación de concentrado en gel para su uso en las formulaciones prototipo como se detalla en la Tabla 1:

Un concentrado en gel se prepara en primer lugar mediante la combinación, bajo alta cizalla, aceite de soja (76 partes), arcilla hectorita modificada orgánicamente (12 partes) y ésteres de ácidos grasos de poliol emulsionante y sus derivados (12 partes).

- 15 Método de preparación de formulaciones prototipo de cinamaldehído + alicina (10%) como se detalla en la Tabla 1:

Isopar M fluido isoparafínico en primer lugar se carga a un recipiente de tamaño apropiado y equipado con un mezclador/agitador de velocidad variable. A continuación, se adiciona la cantidad requerida de concentrado en gel y se mezcló hasta que se dispersa homogéneamente. El cinamaldehído disuelto en éster metílico de aceite de soja se carga y se mezcla. Se adicionan emulsionante y polisorbato y el propulsor se mezclan. La alicina (10%) se carga lentamente mientras se mezcla con alta cizalla. La mezcla se continúa hasta que el extracto de ajo se dispersa homogéneamente.

20

Ejemplo 2

Tabla 2: Ejemplos de tres formulaciones preferidas que muestran actividad sinérgica contra los nematodos del nudo de la raíz.

No.	Componente	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso
	ID de la formulación y relación de cinamaldehído: alicina	2-A 5:1	2-B 7:1	2-C 10:1
1	Aceite de soja	61.74	57.74	51.54
2	Cinamaldehído, 98.5%	10.20	14.20	20.40

ES 2 559 759 T3

3	Alicina (10%)	20.00	20.00	20.00
4	Arcilla organofílica hectorita	1.60	1.60	1.60
5	Ésteres de ácidos grasos de polioles y derivados polietoxilados de los mismos	5.00	5.00	5.00
6	Carbonato de propileno Jeffsol AG1555 (Huntsman Corp.)	0.96	0.96	0.96
7	Polisorbato 20 (Tween 20)	0.50	0.50	0.50
	Total	100	100	100

Ejemplo 3

Tabla 3: Ejemplo de una formulación preferida que muestra actividad sinérgica contra nematodos de los nudos de la raíz.

No.	Componente	% peso/peso
	ID de la formulación y relación de cinamaldehído: alicina	7:1
1	Aceite de soja	49.78
2	Cinamaldehído, 98.5%	17.8
3	Alicina (10%)	25.00
4	Arcilla organofílica hectorita	1.20
5	Ésteres de ácidos grasos de polioles y derivados polietoxilados de los mismos	5.00
6	Carbonato de propileno Jeffsol AG1555 (Huntsman Corp.)	0.72
7	Polisorbato 20 (Tween 20)	0.50
	Total	100

5

Método de preparación de concentrado en gel para su uso en las formulaciones preferidas se detallan en la Tabla 2 y 3:

10 Un concentrado en gel se prepara en primer lugar mediante la combinación, bajo alta cizalla, aceite de soja (87 partes), arcilla hectorita modificada orgánicamente (5 partes), mezcla emulsionante que contiene ésteres de ácidos grasos de poliol y derivados polietoxilados de los mismos (5 partes) y carbonato de propileno (3 partes). La cantidad de arcilla organofílica hectorita en el concentrado en gel puede oscilar entre 2 a 10% peso/peso. Del mismo modo, la cantidad de carbonato de propileno u otros aditivos polares puede variar de 0.5% a 5% peso/peso.

Método de preparación de formulaciones preferidas de cinamaldehído + alicina (10%) como se detallan en la Tabla 2 y 3:

15 El aceite de soja se carga en primer lugar a un recipiente de acero inoxidable de tamaño apropiado y equipado con un mezclador/agitador de velocidad variable. Mientras que se mezcla, el cinamaldehído se carga y se mezcla para disolver. A continuación, se adiciona la cantidad requerida de concentrado en gel y se mezcló hasta que se dispersa homogéneamente. La alicina (10%) se carga lentamente y se mezcla hasta que se dispersa homogéneamente. El emulsionante y Polisorbato 20 se cargan y mezclan hasta que todos los contenidos se dispersan homogéneamente. La suspensión formada de este modo se pasa a través de un tamiz de abertura de 149 micras.

20

ES 2 559 759 T3

Ejemplo 4

Tabla 4: Ejemplos de dos formulaciones preferidas que se pueden preparar por el procedimiento del Ejemplo 3.

No.	Componente	% peso/peso	% peso/peso
	ID de la formulación y relación de cinamaldehído: alicina	-A 15:1	-B 20:1
1	Aceite de soja	41.39	31.09
2	Cinamaldehído, 98.5%	30.46	40.61
3	Alicina (10%)	20.00	20.00
4	Arcilla organofílica hectorita	1.65	1.70
5	Ésteres de ácidos grasos de polioles y derivados polietoxilados de los mismos	5.00	5.00
6	Carbonato de propileno Jeffsol AG1555 (Huntsman Corp.)	1.00	1.10
7	Polisorbato 20 (Tween 20)	0.50	0.50
	Total	100.0	100.0

Ejemplo 5

Evaluación de la eficacia de las composiciones de formulación que contiene cinamaldehído y alicina (10%) a relaciones de 5: 1, 7: 1, y 10: 1.

5 Procedimiento para ensayos de macetas de invernadero:

10 Macetas de 2" x 2" de plástico se llenan con 140 a 150 g de medio de cultivo de las plantas que se compone de arena no pasteurizada y suelo en relación 2: 1. Tres semillas de pepino (variedad Straight Eight; en el caso de los tomates, variedad Rutgers) se plantan a una profundidad y con regado uniforme. Tras la emergencia, dos plántulas uniformes se dejan crecer en cada maceta retirando la tercera plántula. Las plántulas se seleccionan cuando salió la primera hoja verdadera, generalmente 5 a 7 días después de la siembra. Cada maceta se trata con material de ensayo diluido en 25 ml de agua que es apenas suficiente para humedecer el suelo, pero no escurre. A excepción de control no tratado, todas las macetas de prueba se inocularon con cerca de 800 jóvenes de segunda etapa de nematodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne incognita*). Las plantas se riegan según sea necesario. Doce a catorce días después de que las macetas se inoculan, las plantas se retiraron cuidadosamente de las macetas, las raíces se lavan suavemente libre de suelo y se colocan sobre toallas de papel, y se toman los datos sobre el peso fresco de los brotes, raíces, número de excoriaciones/tratamiento y/o por gramo de raíz. Las raíces también están clasificadas para excoriaciones en una escala de 0 a 9, donde cero representa raíces que no presentan excoriaciones y 9 representa las raíces que muestran excoriaciones masivas.

Tabla 5: evaluaciones de eficacia de tres composiciones de formulación prototipo que se detallan en la Tabla 1.

No.	Detalle del tratamiento	Clasificación de media de excoriaciones (0-9)	% de reducción de excoriaciones en relación con control de <i>M.i</i>
1	control sin tratar	0	0
2	Control <i>M.i.</i> (nematodo)	8.25	0
3	Cinamaldehído a 300 ppm (ingrediente activo base) (formulación de cinamaldehído al 50% (VBC-90009))	5.50	33.3
4	Alicina a 300 ppm mezclada en agua	2.25	72.7
5	Relación cinamaldehído (250 ppm): alicina (50 ppm) - 5: 1 (Tabla 1.1-A)	4.75	42.2
6	Relación cinamaldehído (262.5 ppm): alicina (37.5 ppm) - 7: 1 (Tabla 1.1-B)	4.00	51.5

7	Relación cinamaldehído (272.7 ppm): alicina (27.3 ppm) - 10: 1 (Tabla 1.1-C)	2.00	75.8
---	--	------	------

5 Los datos para la clasificación de excoiación y % de reducción de excoiaciones como se muestra en la Tabla 5 revela que la alicina a 300 ppm es más eficaz que el cinamaldehído a una concentración similar de 300 ppm. Entre las proporciones ensayadas, la relación 10: 1 que contiene 272.7 ppm de cinamaldehído y 27.3 ppm de alicina da una reducción de excoiaciones similar a la alicina solo en 300 ppm.

Tabla 6: Evaluaciones de eficacia de tres formulaciones preferidas como se describe en la Tabla 2 en clasificación de excoiaciones de la raíz de pepino.

No.	Detalle del tratamiento	Clasificación media de excoiaciones (0-9)	% de reducción de excoiaciones en relación con control de <i>M.i.</i>
1	Control sin tratar	0	0
2	Control <i>M.i.</i> (nematodo)	9	0
3	Cinamaldehído a 300 ppm (base de ingrediente activo) (composición igual que en la Tabla 2.2-C menos extracto de ajo)	7.25	19.4
4	Alicina a 300 ppm (composición igual en la Tabla 2.2-C menos cinamaldehído)	5.25	41.7
5	Relación cinamaldehído (250 ppm): alicina (50 ppm) - 5: 1 (Tabla 2.2-A)	0.5	94.4
6	Relación cinamaldehído (262.5 ppm): alicina (37.5 ppm) - 7: 1 (Tabla 2.2-B)	0.5	94.4
7	Relación cinamaldehído (272.7 ppm): alicina (27.3 ppm) - 10: 1 (Tabla 2.2-C)	0	100.0

10 Los datos mostrados en la Tabla 6 demostraron claramente una respuesta sinérgica para todas las tres formulaciones reduciendo sustancialmente o casi eliminando excoiaciones causadas por nematodos de los nudos de la raíz. Los datos revelan además que las composiciones detalladas en la Tabla 2 son más preferidos que los que se detallan en la Tabla 1. En el ejemplo anterior, esta invención tiene una implicación práctica en que estas composiciones son más económicas, además de su potencial en la sustitución de nematocidas sintéticos ambientalmente peligrosos tales como DBCP y EDB.

15 Tabla 7: Evaluaciones de eficacia de la formulación más preferida como se describe en la Tabla 3 en clasificación de excoiaciones en raíz de pepino utilizando suelo no pasteurizado, y bioensayo estándar de invernadero (media de tres ensayos)

No.	Detalle del tratamiento	Clasificación media de excoiaciones (0-9)	% de reducción de excoiaciones en relación con control de <i>M.i.</i>
1	Control sin tratar	0	0
2	Control <i>M.i.</i> (nematodo)	9	0
3	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 300 ppm de A.I. total	0	98.0

Bioensayo de invernadero estándar:

El bioensayo se realiza mediante el uso de plántulas de pepino cultivadas en macetas de 2". El material de ensayo se diluye a la concentración apropiada y se aplica en un volumen de 25 ml/maceta. Las macetas son monitoreadas durante 10-12 días y se cosechan después. Después de la cosecha, se recolectan los datos sobre el peso de plántulas frescas y la clasificación de excoriaciones.

- 5 Los datos de la Tabla 7 demuestran claramente la capacidad de la composición descrita en el Ejemplo 3 para eliminar la excoriación de la raíz a la tasa probada.

Tabla 8: Evaluaciones de eficacia de la formulación descrita en la Tabla 3 en clasificación de excoriaciones de raíz de tomate utilizando suelo madre (suelo altamente infectado con huevos y jóvenes).

No.	Detalle del tratamiento	Clasificación media de excoriaciones (0-9)	% de reducción de excoriaciones en relación con control de <i>M.i</i>
1	Control sin tratar	0	0
2	Suelo madre	6.9	0
4	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7:1) a 5000 PPM A.I. total	0.0	100
5	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 3000 PPM A.I. total	0.3	96
6	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 2000 PPM A.I. total	0.0	100
7	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 1500 PPM A.I. total	2.0	71
8	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 1000 PPM A.I. total	4.5	35
9	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 500 PPM A.I. total	5.8	16

- 10 Suelo madre se define como suelos altamente infectados, suelo con huevos y jóvenes de nematodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne incognita*). Este experimento evalúa el rendimiento de la formulación del Ejemplo 3 bajo infestación extrema por nematodos del suelo. Las tasas necesarias para alcanzar los resultados comparables en condiciones de campo en realidad podrían ser inferiores a las de la Tabla 8.

Los métodos de prueba en el suelo madre (prueba de maceta):

- 15 Macetas de 4" se llenan con suelo madre a 500 g/maceta. El material de ensayo se diluye a la concentración apropiada y se aplica en un volumen de 90 ml a cada maceta. Después de la solicitud inicial, las macetas se envuelven con una película de polietileno (envoltura saran). Una semana después de la solicitud inicial, las plántulas de tomate se trasplantan en cada maceta y luego son monitoreadas durante dos semanas. En la cosecha, peso fresco y control de excoriaciones se evalúa para todas las plantas.
- 20 Los datos de la Tabla 8 muestran que la formulación del Ejemplo 3 controla efectivamente las excoriaciones de la raíz en suelos altamente infectados.

Tabla 9: Evaluación en campo de la formulación descrita en el Ejemplo 3 para el control de nematodos en calabaza

No.	Detalle del tratamiento	Clasificación media de excoriaciones de raíz (0-10)
1	Sin tratar	9.71
2	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 1.15 gal/A antes de la siembra	6.24

ES 2 559 759 T3

3	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 1.15 gal/A antes de la siembra + 21 días después de la siembra (un total de 2 aplicaciones)	7.21
4	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) a 1.15 gal/A antes de la siembra + 21 días después de la siembra + 35 días después de la siembra (un total de 3 aplicaciones)	7.37
5	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) en el 2.3 gal/A antes de la siembra	5.27
6	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) en el 2.3 gal/A antes de la siembra + 21 días después de la siembra (un total de 2 aplicaciones)	4.49
7	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) 2.3 gal/A antes de la siembra + De 21 días después de la siembra + 35 días después de la siembra (un total de 3 aplicaciones)	4.86
8	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) 3,45 gal/A antes de la siembra	4.76
9	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) 3.45 gal/A antes de la siembra + 21 días después de la siembra (un total de 2 aplicaciones)	8.58
10	Composición del Ejemplo 3 (cinamaldehído: alicina 7: 1) 3,45 gal/A antes de la siembra + 21 días después de la siembra + 35 días después de la siembra (un total de 3 aplicaciones)	4.32
11	Vydate (2 pintas/A) antes de la siembra (Control Químico)	5.97

Los datos para la clasificación de excoiaciones como se muestra en la Tabla 9 revelan que la formulación del Ejemplo 3 controla con eficacia la excoiación causada por nematodos de los nudos de la raíz. Los datos muestran que esta composición tiene el potencial de reemplazar nematicidas sintéticos peligrosos para el medio ambiente.

Reivindicaciones

1. Una formulación apropiada para uso agrícola nematocida que comprende cinamaldehído, alicina, aceite de soja, un emulsionante, un solvente, un aditivo reológico, un aditivo polar y un surfactante no iónico, en donde la relación cinamaldehído: alicina varía de 5:1 a 20:1 peso/peso.
- 5 2. La formulación de la reivindicación 1, donde el solvente se selecciona del grupo que consiste en aceite de soja, oleato de metilo, lactato de etilo, soyato de metilo, aceite parafínico, aceite isoparafínico, y otros aceites de semillas.
3. La formulación de la reivindicación 2, en donde dicha alicina es alicina (10%).
4. La formulación de la reivindicación 3, en donde el solvente es aceite de soja.
- 10 5. La formulación de la reivindicación 4, en donde dicho emulsionante es un éster de ácido graso de poliol o derivado polietoxilado del mismo.
6. La formulación de la reivindicación 5, en donde dicho aditivo reológico es una arcilla organofílica hectorita y dicho aditivo polar es carbonato de propileno.
- 15 7. La formulación de la reivindicación 6, en donde cinamaldehído más alicina (10%) comprende aproximadamente de 30% a 50.0% peso/peso de la formulación total, aceite de soja comprende aproximadamente de 50 a 80% peso/peso de la formulación total, emulsionante comprende aproximadamente de 3 a 12% peso/peso de la formulación total, arcilla organofílica hectorita comprende de 0.8 a 2% peso/peso, aditivo polar carbonato de propileno comprende de 0.5 a 3% peso/peso, y otros adyuvantes tales como un surfactante no iónico comprende aproximadamente de 0.5 a 2% peso/peso
- 20 8. Un método para proteger una planta de al menos un nematodo parásito de plantas que comprende aplicar al suelo o planta una cantidad eficaz de la formulación de la reivindicación 7.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la dicha formulación puede ser aplicada ya sea antes de la siembra o después de la siembra, pura o diluida en agua u otros portadores agrícolas y al suelo o la planta, ya sea mediante un equipo de aspersión o mediante un equipo de riego u otros modos de aplicación convenientes.