(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 746 551**

(51) Int. CI.:

A01N 63/02 (2006.01)
A01P 7/00 (2006.01)
A01N 43/22 (2006.01)
A01N 43/56 (2006.01)
A01N 53/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2011 PCT/US2011/057541**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061082**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011 E 11838488 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2632272**

(54) Título: **Cromamida A (1), composiciones que comprenden cromamida A (1) con actividad insecticida**

(30) Prioridad:

25.10.2010 US 406569 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2020

(73) Titular/es:

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)
1540 Drew Avenue
Davis, CA 95618, US

(72) Inventor/es:

ASOLKAR, RATNAKAR;
HUANG, HUAZHANG;
KOIVUNEN, MARJA y
MARRONE, PAMELA

(74) Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E INVENCIONES, SLP

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

Cromamida A (1), composiciones que comprenden cromamida A (1) con actividad insecticida

Campo técnico

En este documento se describen composiciones bioactivas y metabolitos derivados de *Chromobacterium* y, en particular, de cultivo de *Chromobacterium substugae* responsables de controlar plagas, así como sus métodos de uso para controlar plagas.

Técnica antecedente

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos microbianos naturales ofrecen una fuente abundante de diversidad química y existe un largo historial de uso de productos naturales con fines farmacéuticos. A pesar del énfasis en los productos naturales para agentes terapéuticos en seres humanos, donde más del 50% derivan de productos naturales, Solo el 11% de los pesticidas derivan de fuentes naturales. No obstante, los plaguicidas de productos naturales tienen el potencial de desempeñar un papel importante para controlar plagas en granjas tanto convencionales como orgánicas. Los metabolitos secundarios producidos por microbios (bacterias, actinomicetos y hongos) proporcionan nuevos compuestos químicos que pueden usarse solos o en combinación con compuestos conocidos para controlar de manera eficaz plagas de insectos y para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia. Existen varios ejemplos bien conocidos de productos microbianos naturales que son exitosos como insecticidas agrícolas (Thompson et al., 2000; Arena *et al*., 1995; Krieg *et al*. 1983).

El desarrollo de un plaguicida microbiano comienza con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Luego procede con análisis sistemático de eficacia y espectro utilizando ensayos *in vitro, in vivo* o a escala piloto en un invernadero y en el campo. Al mismo tiempo, se aíslan e identifican los compuestos activos producidos por el microbio. Para la comercialización de un plaguicida microbiano, el microbio ha de producirse de manera económica mediante fermentación a escala industrial y se formula con aditivos biocompatibles y aprobados para aumentar la eficacia y maximizar la facilidad de aplicación, así como su estabilidad durante el almacenamiento en condiciones de campo.

A medida que los agricultores buscan expandir su arsenal de insecticidas y se comercializan nuevos productos microbianos, existe la posibilidad de una variedad de interacciones entre insecticidas nuevos y viejos. A menudo se han usado combinaciones de 2 o más insecticidas aplicados a un solo cultivo simultánea o secuencialmente. Para abordar estas preocupaciones, los científicos han examinado la interacción de los aceites, hongos y pesticidas químicos contra plagas e insectos beneficiosos utilizando métodos tópicos y de alimentación (véase, por ejemplo, Chalvet-Monfray, Sabatier *et al*. 1996; Meunier, Carubel *et a*l. 1999; Hummelbrunner e Isman 2001; Wirth, Jiannino *et al*. 2004; Farenhorst, Knols *et al*. 2010; Shapiro-Ilan, Cottrell *et al*. 2011); sin embargo, todavía no se han estudiado todas las interacciones.

El documento US 2007/0172463 A1 desvela *Chromobacterium subtsugae* sp. y su uso para el control de plagas de insectos. El documento KR10 2007 0088150 A desvela las propiedades nematicidas de la violaceína obtenida de *Chromobacterium violaceum*.

R. E. Smith *et al*. describen la actividad nematicida de una especie de *Chromobacterium* cianogénica (R. E. Smith, G. R. Wilt y R. M. Cody, Bacteriological Proceedings, vol. 69, 1 de enero de 1969, página 43).

El documento WO 91/00012 A1 desvela microbios para controlar plagas.

Phyllis A. W. Martin *et al*. desvela dos nuevos patógenos bacterianos del escarabajo de la patata de Colorado (*Coleoptera*: *Chrysomelidae*) (Phyllis A. W. Martin *et al*. , Journal of Economic Entomology, vol. 97, n.º 3, 1 de junio de 2004, páginas 774-780).

Dale B. Gelman *et al*. describen nuevos candidatos para el desarrollo de bioplaguicidas para controlar plagas de mosca blanca (Dale B. Gelman *et al*., Journal of Insect Science, vol. 8, 4, 10 de enero de 2008, páginas 19-20).

Chromobacterium

La cepa *Beta-Proteobacterium*, *Chromobacterium subtsugae,* exhibe actividad insecticida contra una amplia variedad de insectos (Martin, Blackburn *et al*. 2004; Martin 2004; Martin, Gundersen-Rindal *et al*. 2007; Martin, Hirose *et al*. 2007; Martin, Shropshire *et al*. 2007). El modo de acción parece ser una combinación de actividad antialimentación y toxina, con inhibición de la alimentación observada a dosis subletales (Martin, Gundersen-Rindal *et al*. 2007). En particular, se ha encontrado que *Chromobacterium substugae* es eficaz contra el escarabajo de la patata de Colorado adulto *(Leptinotarse decemlineata),* gusano de la raíz de maíz occidental adulto *(Diabrotica virgifera),* gusano de la raíz del maíz adulto y larval del sur *(Diabrotica undecimpunctata),* escarabajo pequeño de la colmena *(Aethina tumida),* polillas larvales Diamondback *(Plutella xyllostella),* mosca blanca de la batata *(Bernisia tabaci)* adulta y larval y Chinche verde del sur *(* Nezara *viridula).*

Desde el descubrimiento de *C. substugae* por Martin y sus colaboradores, se han aislado y caracterizado al menos tres nuevas especies de *Chromobacteria*; Young *et al*. (2008) aislaron una nueva especie de *Chromobacterium*, *C. aquaticum*, de muestras de agua de manantial en Taiwán, y Kampfer *et al*. (2009) aislaron dos especies, *C. piscinae* y *C. pseudoviolaceum,* de muestras ambientales recogidas en Malasia.

Metabolitos secundarios del género *Chromobacterium*

De todas las especies de *Chromobacteria* conocidas, *Chromobacterium violaceum* es la que más se estudia, y la información publicada sobre los metabolitos secundarios producidos por *Chromobacteria* se basa únicamente en estudios sobre *Chromobacterium violaceum*. Durán y Menck (2001) han publicado una revisión exhaustiva de las perspectivas farmacológicas e industriales de *Chromobacterium violaceum,* un saprófito gramnegativo del suelo y el agua. Normalmente se considera no patógena para seres humanos, sino un patógeno oportunista, en ocasiones ha sido el agente causante de septicemia e infecciones letales en seres humanos y animales. Se sabe que *Chromobacterium violaceum* produce un pigmento púrpura, la violaceína, que es una molécula de bisindol generada por una fusión de dos moléculas de L-triptófano en presencia de oxígeno (Hoshino et al., 1987; Ryan y Drennan; 2009). La biosíntesis de la violaceína está regulada por detección de quórum, un mecanismo común que regula diversas rutas metabólicas secundarias diferentes en bacterias gramnegativas (McClean et al., 1997).

Otros metabolitos conocidos de *Chromobacterium violaceum* resumidos por Durán y Menck (2001) incluyen el cianuro de hidrógeno, ferrioxamina E, los glucopéptidos B-lactámicos SQ28.504 y SQ28.546, antibióticos, tales como aerocianidina, aerocarvina, 3,6-dihidroxi-indoxaceno y monobactam SB-26.180 y un depsipéptido antitumoral, FR901228. Según el artículo de revisión de Durán y Menck (2001), *Chromobacterium violaceum* también produce compuestos de azúcar inusuales, tales como polisacáridos y lipopolisacáridos extracelulares.

Nematodos y Nematicidas

Los nematodos son invertebrados no segmentados, bilateralmente simétricos, similares a gusanos que poseen una cavidad corporal y un sistema digestivo completo pero carecen de sistemas respiratorio y circulatorio. Su pared corporal está compuesta por una cutícula multicapa, una hipodermis con cuatro cuerdas longitudinales y musculatura interna (Chitwood, 2003). Su contenido corporal está ocupado principalmente por los sistemas digestivo y reproductor. La mayoría de los nematodos son de vida libre, pero un número menor de especies son parásitos ubicuos de animales o plantas.

Los nematodos del nudo de la raíz *(Meloidogyne* spp.) parasitan una amplia gama de cultivos anuales y perennes, teniendo impacto tanto en calidad como cantidad de rendimientos comercializables. Los nematodos de este género se consideran los nematodos parásitos vegetales más importantes desde el punto de vista económico (Whitehead, 1998). Se ha estimado que las pérdidas anuales de cultivos causadas por nematodos parásitos de plantas exceden los 100 mil millones de dólares americanos (Koenning *et al*. 1999), con más de la mitad causadas por el género *Meloidogyne.* El inóculo en esta cepa proviene de huevos que, en condiciones favorables, eclosionan para liberar larvas infecciosas de la segunda etapa (J2), que migran en el suelo hacia la raíz de la planta huésped. La infección se produce a través de la penetración de la punta de la raíz, después de lo que las larvas se mueven hacia el tejido vascular donde el nematodo se vuelve sedentario, alimentándose directamente de las células vegetales. La planta responde produciendo células gigantes que forman agallas (nudos de raíz). A lo largo de la vida reproductiva, las hembras permanecen incrustadas en el tejido vegetal, y solo las masas de huevos sobresalen de la raíz.

El medio más eficaz para controlar los nematodos del nudo de la raíz es a través de nematicidas que inhiben la eclosión del huevo, movilidad juvenil y/o infectividad de plantas. El desarrollo del control químico de los nematodos parásitos de plantas es un desafío debido a razones ambientales y fisiológicas: 1. La mayoría de los nematodos fitoparasitarios viven en un área confinada en el suelo cerca de las raíces y, por tanto, el suministro de un nematicida químico es difícil. 2. La superficie externa de los nematodos es una mala diana bioquímica y es impermeable a muchas moléculas orgánicas (Chitwood, 2003). Además, el suministro de compuestos tóxicos por vía oral es casi imposible porque la mayoría de las especies de nematodos parásitos de plantas ingieren material solo después de haber penetrado e infectado las raíces de las plantas. Por tanto, los nematicidas han tendido a ser toxinas de amplio espectro con alta volatilidad o con otras propiedades químicas y físicas que promueven su movilidad en el suelo.

Durante la última década, los hidrocarburos halogenados (por ejemplo, dibromuro de etileno, bromuro de metilo) han sido los nematicidas más utilizados en todo el mundo. Debido a su alta toxicidad humana y efectos perjudiciales sobre la capa de ozono estratosférico, estos compuestos se prohibieron en el Protocolo de Montreal, pero el uso de bromuro de metilo para el control de nematodos y patógenos de plantas se extendió en los Estados Unidos debido a la falta de productos de sustitución. Junto con los organofosforados, los carbamatos son los nematicidas no fumigantes más efectivos. Desafortunadamente, la mayoría de los carbamatos tales como aldicarb y el oxamilo también son altamente tóxicos. Desde agosto de 2010, el fabricante de aldicarb, Bayer, acordó cancelar todos los registros de productos en patadas y cítricos en los Estados Unidos, y aldicarb se eliminará por completo a fines de agosto de 2018. Recientemente, abamectina - una mezcla de dos avermectinas producidas por un actinomiceto del suelo, *Streptomyces avermitilis* - se ha registrado para uso nematicida (Faske y Starr, 2006). Syngenta comercializa este

ingrediente activo como un tratamiento de semillas para algodón y vegetales con el nombre comercial Avicta®.

Se ha informado que varios patógenos microbianos de plantas/nematodos son activos contra nematodos parásitos de plantas (Guerena, 2006). Estos agentes de control biológico incluyen la bacteria *Bacillus thuringiensis, Burkholderia cepacia, Pasteuria penetrans* y *P. usgae.* Pasteuria Biosciences ha lanzado *P. usgae* contra nematodos picadores en césped en el sureste de los Estados Unidos. Los hongos nematicidas incluyen *Trichoderma harzianum, Hirsutella rhossiliensis, H. minnesotensis, Verticillium chlamydosporum, Arthrobotrys dactyloides,* y *Paecilomyces lilanicus* (comercializado como BioAct® y Melcon® by Prophyta). Otro hongo, *Myrothecium verrucaria* está disponible en una formulación comercial, DiTera®, en Valent Biosciences. Este es un hongo muerto; por tanto la actividad se debe a compuestos nematicidas. Otros bionematicidas comerciales incluyen Deny® y Blue Circle® (*B. cepacia),* Activate® *(Bacillus chitinosporus)* (Quarles, 2005) y un producto israelí BioNem® *(Bacillus firmus)* (ahora comercializado por Bayer como tratamiento de semillas Votivo®) (Terefe *et al*. 2009). Se ha planteado la hipótesis de que el efecto perjudicial de los aislamientos microbianos en la eclosión de los huevos de nematodos, la movilidad juvenil y la infectividad pueden atribuirse a las toxinas producidas por estos organismos (Hallman y Sikora, 1996; Marrone *et al*., 1998; Siddiqui y Mahmood, 1999; Saxena *et al*., 2000; Meyer y Roberts, 2002), capacidad para parasitar o incluso atrapar nematodos (Siddiqui y Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee y Muldoon, 1995), inducción de resistencia sistémica (Hasky-Gunther *et al*. 1998), cambiar el comportamiento de los nematodos (Sikora y Hoffman-Hergarter, 1993) o interferir en el reconocimiento de plantas (Oostendorp y Sikora, 1990)

Los nematicidas botánicos, tales como extractos de plantas y aceites esenciales, pueden usarse para controlar nematodos (Kokalis-Burrelle y Rodriguez-Kabana, 2006). Chitwood ha resumido las opciones de uso de compuestos derivados de plantas para el control de nematodos en su reciente artículo de revisión (Chitwood, 2002). Siddiqui y Alam (2001) demostraron que la tierra para macetas modificada con partes de planta de nim *(Azadirachta indica)* y árbol de mora china *(Melia azadirah)* inhibía el desarrollo de nematodos de los nudos de la raíz de los tomates. Sin embargo, actualmente no hay productos de nim registrados en los Estados Unidos para su uso contra nematodos. Recientemente se ha registrado un nuevo producto botánico de Chile (Nema-Q®) basado en un extracto del árbol *Quillaja saponaria* que contiene saponinas (derivados bidesmosídicos del ácido quilájico sustituido con un trisacárido en C-3 y un oligosacárido en C-28) como nematicida orgánico a través de US EPA y catalogado para agricultura orgánica por el Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI). Se comercializa en Monterey AgResources.

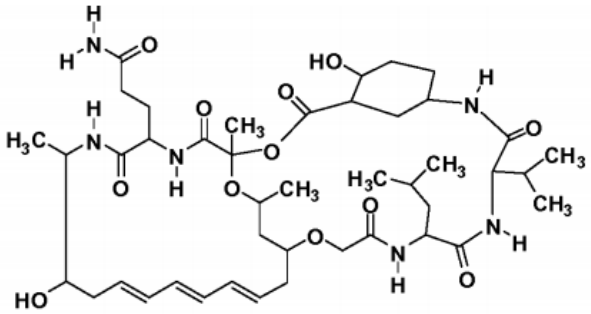
La rotación de cultivos a un cultivo que no sea huésped a menudo es adecuada por sí misma para evitar que las poblaciones de nematodos alcancen niveles económicamente perjudiciales (Guerena 2006). Los aleloquímicos son compuestos producidos por plantas que afectan al comportamiento de los organismos en el ambiente de la planta. Ejemplos de aleloquímicos nematocidas incluyen politienilos, glucisonolatos, alcaloides, lípidos, terpenoides, esteroides, triterpenoides y compuestos fenólicos (Kokalis-Burrelle y Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002). Cuando se cultivan como cultivos de cobertura, los compuestos bioactivos de plantas alelopáticas se exudan durante el período de crecimiento y/o se liberan al suelo durante la descomposición de la biomasa. Los cultivos de *Brassica* pueden usarse para la biofumigación, una estrategia de manejo de plagas basada en la liberación de volátiles biocidas durante la descomposición del tejido incorporado al suelo (Kirkegaard y Sarwar, 1998). Sin embargo, los estudios de Roubtsova *et al*. (2007) sobre el efecto de la descomposición del tejido de brócoli en los números de *M. incognita* indicaron que para un control adecuado, fue necesario mezclar completamente el tejido vegetal con el volumen completo del suelo infectado con nematodos.

El futuro del control de nematodos en suelos agrícolas depende de dos factores: desarrollo de cultivos resistentes a nematodos y el descubrimiento y desarrollo de nematicidas nuevos, de amplio espectro, menos tóxicos. El coste de investigación, desarrollo y registro de un nuevo nematicida químico es extremadamente alto (>200 millones $), lo que limita su desarrollo. De los 497 nuevos ingredientes activos registrados para su uso como pesticida desde 1967 hasta 1997, solo siete se registraron como nematicidas (Aspelin y Grube, 1999). Además de los métodos químicos convencionales, la interferencia de ARN (ARNi) se ha propuesto como un método para controlar los nematodos. El uso del silenciamiento génico a través de ARNi se demostró por primera vez en *Caenorhabditis elegans* y muy recientemente también en nematodos parásitos de plantas tales como *Meloidogyne* spp. (Bakhetia *et al*. 2005). La búsqueda de nuevas cepas microbianas para usar como fuentes de nematicidas biológicos es un objetivo importante para reducir el daño económico significativo causado por los nematodos parásitos de las plantas así como para reducir el uso de compuestos tóxicos actualmente registrados para el control de nematodos.

Según Sasser y Freckman (1987), las pérdidas de cultivos por nemátodos varían de 8 a 20% en los principales cultivos de todo el mundo. Los nematodos parásitos de plantas pueden causar daños considerables a los cultivos con pérdidas anuales estimadas en 87 mil millones $ en todo el mundo (Dong y Zhang, 2006). Las variedades de cultivos resistentes a nematodos y nematicidas químicos son actualmente las principales opciones para el control de los nematodos. Los fumigantes como el bromuro de metilo son muy eficaces para controlar las enfermedades de plantas y nematodos transmitidos por el suelo, pero debido a la alta toxicidad en mamíferos, efectos de agotamiento de ozono y otros efectos residuales, el uso de bromuro de metilo ya se ha prohibido en varios países y su retirada total del mercado está prevista por acuerdo internacional (Oka *et al*., 2000). Alternativas químicas tales como yoduro de metilo, 1,3-dicloropropeno y clororpicrina también tienen problemas de seguridad ambiental y en mamíferos. Los nematicidas químicos no fumigantes están siendo eliminados y prohibidos. Más recientemente, US-EPA anunció que el aldicarb se iba a eliminar gradualmente.

Breve sumario

La invención se refiere a un compuesto aislado que tiene la estructura:



Cromamida 1 (A)

y que tiene actividad insecticida.

La invención se refiere además a una composición que comprende el compuesto aislado de la reivindicación 1, a un método para modular la infestación de insectos en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta la composición de la reivindicación 2 en una cantidad eficaz para modular dicha infestación de insectos, y un método para modular la infestación de nematodos en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta la composición de la reivindicación 2, en una cantidad eficaz para modular dicha infestación de nematodos.

La invención se refiere además a una combinación pesticida sinérgica para inhibir gusano soldado de remolacha que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida, en donde dicha sustancia pesticida se selecciona entre espinosad y Bt var. Kurstaki o sinérgica para inhibir orugas de la col que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida, en donde dicha sustancia pesticida se selecciona de clorantraniliprol, espinosad y piretrinas.

La invención se refiere además a un método para modular sinérgicamente la infestación de gusano soldado de remolacha en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta el compuesto aislado de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida en una cantidad eficaz para modular sinérgicamente dicha infestación, en donde la segunda sustancia se selecciona de espinosad y Bt var. Kurstaki o para modular sinérgicamente la infestación de orugas de la col en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta el compuesto aislado de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida en una cantidad eficaz para modular sinérgicamente dicha infestación, en donde la segunda sustancia se selecciona de clorantraniliprol, espinosad, y piretrinas.

En este documento se desvelan nuevos usos y combinaciones y, en particular, composiciones que comprenden una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607.

De ese modo se desvela en este documento un método para modular la infestación de nematodos en una planta que comprende aplicar a una planta, y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta una cantidad de sobrenadante, filtrado y/o extracto y/o uno o más de los metabolitos de dicho sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 y opcionalmente otra sustancia nematicida en una cantidad eficaz para modular dicha infestación de nematodos.

También se describe en este documento una combinación pesticida sinérgica para al menos una plaga que comprende como componentes activos: (a) un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 y/o uno o más metabolitos de dicho sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de

NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 y (b) otra sustancia pesticida, en donde (a) y (b) están presentes en cantidades sinérgicas. La plaga, en una realización particular, puede ser una plaga de insectos, pero también puede incluir, pero sin limitarse a, un nematodo, hongo vegetal, virus de planta y bacterias de planta y maleza. Además, la combinación puede ser una composición. La sustancia pesticida puede (a) derivar de un microorganismo; (b) un producto natural y/o (c) un pesticida químico y, en particular, un nematicida químico.

Como se describe en este documento, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 y una sustancia pesticida derivada de un microorganismo que incluye pero sin limitación *Bacillus sp.* (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus thuringiensis kurstaki)* y espinosad. Alternativamente, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 y una sustancia pesticida derivada de un producto natural tal como piretro. Alternativamente, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 y una sustancia pesticida que es un pesticida químico, particularmente, un insecticida, donde el insecticida incluye pero sin limitación piretrinas, espirotetramet y diamida antranílica.

En un aspecto relacionado, en este documento se proporciona un método para modular sinérgicamente la infestación de al menos una plaga o especie de plaga en una planta que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta las combinaciones establecidas anteriormente con una cantidad de la combinación efectiva para modular la infestación de dicha plaga o especie de plaga. También se proporcionan en el presente documento compuestos aislados obtenibles o derivados de una cepa de especies de *Chromobacterium*, más particularmente, *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que pueden usarse para controlar diversas plagas, y particularmente, plagas de nemátodos.

Como se describe en este documento, el compuesto puede ser un compuesto que (a) tiene actividad pesticida; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-900 determinado por cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC/MS) y (c) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos en una Columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90 - 0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN, 24-27 min; 0-90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) en 0,5 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm y (d) es opcionalmente obtenible a partir de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607. En una realización el compuesto puede ser un péptido.

Como también se desvela en este documento, el compuesto tiene 43 carbonos, siete metilos, diez carbonos metileno, doce metinos, 6 metinos olefínicos y ocho carbonos cuaternarios tal como se determina mediante RMN ^{13}C.

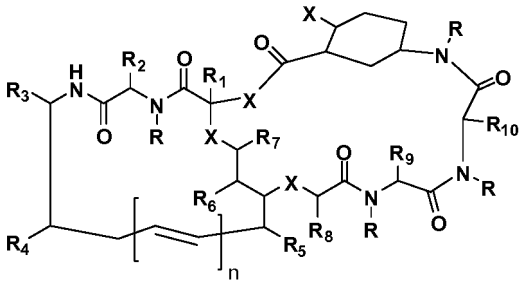
Como se desvela en este documento, el compuesto "A": (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-890 y más particularmente, 860 según se determina por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene valores de RMN ^{1}H 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 y tiene valores de RMN ^{13}C 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) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 9,08 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 µ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN, 24-27 min; 0-90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a una velocidad de flujo

de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm. En particular, el espectro de RMN ^{13}C revela señales para 43 carbonos, para siete metilos, diez carbonos metileno, doce metinos, 6 metinos olefínicos, ocho carbonos cuaternarios y/o el espectro de RMN ^{1}H muestra características de un péptido típico, ilustrando cinco señales NH de amida [δ_H: 8,89, 8,44, 8,23, 8,22, 7,96], una señal de amina NH_2 [δ_H: 7,64, 6,65], seis α-amino protones [δ_H: 4,07, 4,06, 3,96, 3,95, 3,88, 3,72] y en el espectro de RMN ^{13}C, seis/siete resonancias de amida o éster [δ_C: 173,62, 172,92, 172,25, 172,17, 171,66, 171,28, 170,45].

Como se desvela en este documento, el compuesto "B" tiene las siguientes características: (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 850-900 y más particularmente, 874 según se determina por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 9,54 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 µ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN, 24-27 min; 0-90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm.

También se proporcionan compuestos que incluyen pero sin limitación:

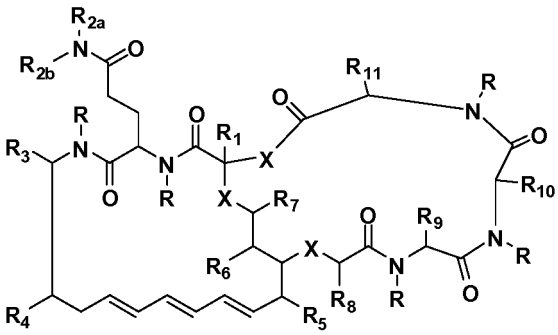
(A) un compuesto que tiene la estructura ##STR001##



##STR001##

o una sal pesticidamente aceptable o estereoisómeros del mismo, en donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

(B) un compuesto que tiene la estructura ##STR001a##

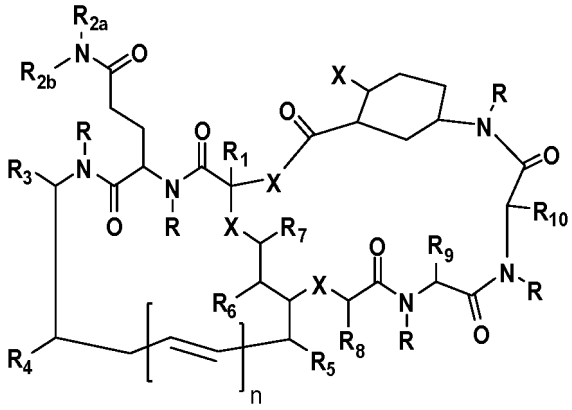


##STR001a##

en donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; R2a, R2b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo,

alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

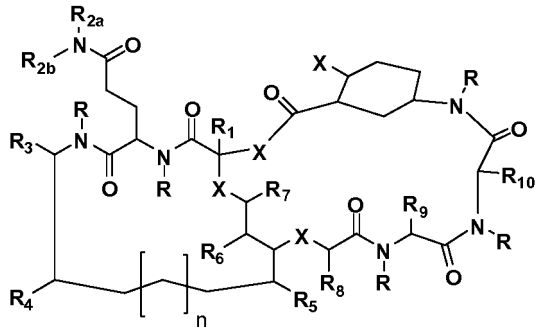
(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR001b##



##STR001b##

en donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R2a, R2b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

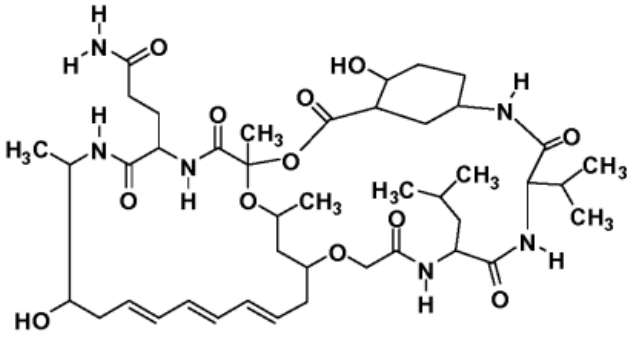
(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR001c##



##STR001c##

en donde R es -H, cadena de alquilo inferior, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R2a, R2b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

En un aspecto, la invención se refiere al compuesto que es cromamida A (1).



Cromamida 1 (A)

Estos compuestos pueden obtenerse (a) cultivando una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 en un medio de cultivo o caldo celular completo en condiciones suficientes para producir dicho compuesto para obtener un cultivo de *Chromobacterium* y (b) aislar dicho compuesto producido a partir del caldo celular completo de (a). En particular, el compuesto de la tapa (b) puede aislarse (i) aplicando el caldo celular completo a al menos una de una columna de intercambio iónico, una columna de exclusión por tamaño o una columna de HPLC de fase inversa para obtener fracciones de columna; (ii) analizando las fracciones de la columna para determinar la actividad pesticida y (iii) concentrando las fracciones de la columna de (ii) para obtener el compuesto aislado.

Además se desvelan en este documento composiciones, particularmente composiciones pesticidas que comprenden dichos compuestos así como otros compuestos obtenibles de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 con actividad pesticida. Estos otros compuestos pueden tener las siguientes características: (a) un peso molecular de aproximadamente 315-360 determinado por cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC/MS); (b) un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm y puede obtenerse (A) cultivando una cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir dicho compuesto para obtener una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607 cultivo y (B) aislando dicho compuesto producido a partir del caldo celular completo de (A).

Como se desvela en este documento, un compuesto usado en dicha composición expuesta anteriormente, el compuesto "C", tiene las siguientes características: (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium sp.,* particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. e incluso más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607; (b) es tóxico para plagas; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 325-360 y más particularmente, aproximadamente 343 determinado mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-14 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 10,88 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm. Como también se desvela en este documento, el compuesto "C" puede ser violaceína (2), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium violaceum.*

Como se desvela en este documento, otro compuesto usado en la composición expuesta anteriormente, el compuesto "D", tiene las siguientes características: (a) se obtiene a partir de una especie de *Chromobacterium*; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-350 y más particularmente, aproximadamente 327 determinado mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, más específicamente

aproximadamente 12 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 12,69 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 µ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm. Como se describe en este documento, el compuesto "D" puede caracterizarse como desoxiviolaceína (3), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium violaceum.*

Dichas composiciones pueden comprender además opcionalmente una segunda sustancia, en donde dicha segunda sustancia es un pesticida químico o biológico y/o al menos uno de un vehículo, diluente, tensioactivo o adyuvante.

También se desvela un método para usar los compuestos (por ejemplo, los compuestos "A", "B", "C" y "D") y las composiciones expuestas anteriormente para modular la infestación de plagas, particularmente plagas de nemátodos en una planta que comprende aplicar a la planta una cantidad del compuesto o composiciones y opcionalmente un segundo pesticida químico o biológico eficaz para modular dicha infestación de plagas. Además se proporciona el uso de los compuestos expuestos anteriormente para formular una composición para modular la infestación de plagas en una planta.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la invención a partir de caldo de cultivo.
La FIG. 2 representa el cromatograma ESI-LCMS para cromamida A (1).
La figura 3 representa datos de HRMS para cromamida A (1).
La FIG. 4 representa RMN ^{1}H para cromamida A (1) en DMSO-d_6 a 600 MHz.
La FIG. 5 representa RMN ^{13}C para cromamida A (1) en DMSO-d_6 a 600 MHz.
La FIG. 6 representa el cromatograma de HPLC para el compuesto B (MW 874).
La FIG. 7 representa estructuras químicas para cromamida A (1) violaceína (2) y desoxiviolaceína (3).
La FIG. 8 Porcentaje de nematodos móviles después de tratamiento con caldo de *C. substugae* esterilizado con filtro (1x - sin diluir; 0,1x - diluido 10 veces) después de 24 horas.
La FIG. 9 Porcentaje de nematodos móviles después de tratamiento con caldo de *C. substugae* esterilizado con filtro (1x - sin diluir; 0,1x - diluido 10 veces) después de 48 horas.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se define en el presente documento, "procedente de" significa aislado u obtenido directamente de una fuente particular o, como alternativa, que tiene características identificativas de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular. En caso de que la "fuente" sea un organismo, "derivado de" significa que puede aislarse u obtenerse del propio organismo o del medio utilizado para cultivar o hacer crecer dicho organismo.

Como se define en el presente documento, "cultivo de caldo completo" se refiere a un cultivo líquido que contiene células y medios. Si las bacterias crecen en una placa, las células pueden cosecharse en agua u otro cultivo completo líquido.

El término "sobrenadante" se refiere al líquido restante cuando las células crecen en caldo o se cosechan en otro líquido de una placa de agar y se eliminan por centrifugación, filtración, sedimentación, u otros medios bien conocidos en la técnica.

Como se define en el presente documento, "filtrado" se refiere al líquido de un cultivo de caldo completo que ha pasado a través de una membrana.

Como se define en el presente documento, "extracto" se refiere a la sustancia líquida retirada de las células por un solvente (agua, detergente, tampón) y separada de las células por centrifugación, filtración u otro método.

Como se define en el presente documento, "metabolito" se refiere a un compuesto, sustancia o subproducto de una fermentación de un microorganismo o sobrenadante, filtrado o extracto obtenido de un microorganismo que tiene actividad pesticida y particularmente insecticida. Como se define en el presente documento, un "compuesto aislado" está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferentemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferentemente aproximadamente 60% puro, incluso más preferentemente aproximadamente 80% puro, más preferentemente aproximadamente 90% puro, e incluso lo

más preferentemente aproximadamente 95% puro, según se determina por métodos analíticos, incluidos, entre otros, métodos cromatográficos, métodos electroforéticos.

Como se define en el presente documento, un "vehículo" es un material inerte, orgánico o inorgánico, con el que se mezcla o formula el principio activo para facilitar su aplicación a una planta u otro objeto que se vaya a tratar o su almacenamiento, transporte y/o manipulación.

El término "modular" se usa para indicar alterar la cantidad de infestación de plagas o la tasa de propagación de la infestación de plagas.

Como se define en el presente documento, La expresión "infestación de plagas" es la presencia de una plaga en una cantidad que causa un efecto nocivo que incluye una enfermedad o infección en una población huésped o la aparición de una maleza no deseada en un sistema de crecimiento.

Como se define en el presente documento, un "pesticida" es una sustancia derivada de un producto biológico o sustancia química que aumenta la mortalidad o inhibe la tasa de crecimiento de las plagas de plantas e incluye, entre otros, nematicidas, insecticidas, fungicidas para plantas, bactericidas para plantas y viricidas para plantas.

Como se define en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, incluyendo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, n-hexilo, y similares.

Como se define en el presente documento, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que llevan además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxi, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido,-C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo, y similares.

Como se define en el presente documento, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 a 12 átomos de carbono, y "alquenilo sustituido" se refiere a grupos alquenilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 a 12 átomos de carbono, y "alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquinilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo de 6 a 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similar) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "alcoxi" se refiere al resto -O-alquil-, en donde alquilo es como se definió anteriormente, y "alcoxi sustituido" se refiere a grupos alcoxilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "tioalquilo" se refiere al resto -S-alquil-, en donde alquilo es como se definió anteriormente, y "tioalquilo sustituido" se refiere a grupos tioalquilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo que contienen anillos que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 a 8 átomos de carbono, y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se define en el presente documento, "heterocíclico", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen anillos) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similar) como parte de la estructura del anillo, y que tiene en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

Como se indicó anteriormente, pueden obtenerse compuestos o metabolitos, son obtenibles o derivados de un

organismo que tiene las características de identificación de una especie de *Chromobacterium*, más particularmente, de un organismo que tiene las características identificativas de una cepa de *Chromobacterium substugae,* más particularmente, de una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que puede tener las características identificativas de NRRL B-30655 o como alternativa, de cualquier otro microorganismo. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos del cultivo de estos organismos.

En particular, los organismos se cultivan en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden cultivarse mediante cultivo en matraces de agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluidas, entre otras, fermentaciones continua, discontinua, en lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores industriales o de laboratorio realizados en medio adecuado y en condiciones que permitan el crecimiento celular. El cultivo puede producirse en medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados pueden estar disponibles de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con composiciones publicadas.

Tras el cultivo, un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium* sp. puede usarse para formular una composición pesticida.

Alternativamente, tras el cultivo, los compuestos y/o metabolitos pueden extraerse del caldo de cultivo.

El extracto puede fraccionarse mediante cromatografía. Las fracciones cromatográficas pueden analizarse para determinar la actividad tóxica contra, por ejemplo, oruga de la col *(Trichoplusia ni)* o gusano soldado de remolacha *(Spodoptera exigua)* utilizando métodos conocidos en la técnica. Este proceso puede repetirse una o más veces utilizando los mismos o diferentes métodos cromatográficos.

Composiciones

Las composiciones pueden comprender cultivos enteros de caldo, cultivos líquidos, o suspensiones de una cepa de *Chromobacterium sp.,* por ejemplo, una cepa que tiene las características de identificación de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 (véase la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607), así como sobrenadantes, filtrados o extractos obtenidos de una cepa de *Chromobacterium sp.,* por ejemplo, una cepa que tiene las características de identificación de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 (véase la patente de Estados Unidos n.º 7.244.607), o el sobrenadante, filtrado y/o extracto o uno o más metabolitos o compuestos aislados derivados de una cepa de *Chromobacterium sp.* o combinaciones de los anteriores que en particular tienen actividad nematicida.

Las composiciones expuestas anteriormente pueden formularse de cualquier manera. Ejemplos de formulación no limitantes incluyen, pero sin limitación, concentrados emulsionables (CE), polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones concentradas de volumen ultra-bajo (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, gránulos dispersos en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En cualquier formulación descrita en este documento, el porcentaje del ingrediente activo está dentro de un intervalo de 0,01% a 99,99%.

Las composiciones pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido.

Puede prepararse una composición sólida suspendiendo un vehículo sólido en una solución de ingrediente(s) activo(s) y secando la suspensión en condiciones suaves, tal como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65 °C o menos.

Una composición puede comprender ingrediente(s) activo(s) encapsulado(s) en gel. Dichos materiales encapsulados en gel pueden prepararse mezclando un agente formador de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de *Chromobacterium* vivo o inactivado, o un filtrado libre de células o fracción celular de un cultivo o suspensión de *Chromobacterium*, o un cultivo, célula, o fracción celular secado por pulverización o liofilizado o en una solución de compuestos pesticidas usados en el método de la invención; e inducir la formación de gel del agente.

La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo para usarlo con el fin de emulsificación, dispersión, humectantes, propagación, integración, control de la disgregación, estabilización de principios activos y mejora de la fluidez o inhibición del óxido. En una realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico no fitotóxico que preferentemente pertenece a la Lista 4B de la EPA. En otra realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensioactivos puede variar entre 0,1-35% de la formulación total, el intervalo preferente es 5-25%. La elección de agentes dispersantes y emulgentes, tales como dispersantes y agentes emulgentes no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos, y la cantidad empleada están determinadas por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de las composiciones de la presente invención.

La composición establecida anteriormente puede combinarse con otro microorganismo y/o pesticida (por ejemplo,

nematicida, fungicida, insecticida). El microorganismo puede incluir, pero sin limitación, un agente procedente de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus sp., Lecanicillium* sp., *no-Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternativamente, el agente puede ser un aceite natural o un producto oleoso que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de hierba de limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos, aceite de romero, piretro). Además, el plaguicida puede ser un agente antifúngico de un solo sitio que puede incluir, pero sin limitación, bencimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilinopirimidina, fosforotiolato, inhibidor fuera de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilinopirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina), un inhibidor de la desmetilación seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanilo, una diamida antranílica (por ejemplo, clorantraniliprol) y un inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxiestrobina, kresoxima-metoilo o trofloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifeno (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente antifúngico también puede derivar de un extracto de *Reynoutria*.

El fungicida también puede ser un fungicida químico de sitio múltiple no inorgánico, seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridinamina, ciano-acetamida oxima.

La composición puede, como se indicó anteriormente, comprender además un insecticida. El insecticida puede incluir, pero sin limitación, avermectina, Bt (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis var. Kurstaki),* aceite de neem, espinosads, *Burkholderdia* sp. como se expone en el documento WO2011/106491, hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* e insecticidas químicos, incluyendo, pero sin limitación, compuestos de organocloro, compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides, piretrinas y neonicotinoides.

Como se indicó anteriormente, la composición puede comprender además un nematicida. Este nematicida puede incluir, pero sin limitarse a, avermectina, productos microbianos tales como Biome *(Bacillus firmus), Pasteuria* spp y productos orgánicos como saponinas.

Las composiciones pueden aplicarse usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones pueden aplicarse a plantas o partes de plantas. Debe entenderse que plantas significa en el presente contexto todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas silvestres o plantas de cultivo deseadas y no deseadas (incluidas las plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas, que puede obtenerse mediante métodos convencionales de mejoramiento y optimización de plantas o mediante métodos de ingeniería genética y biotecnológica o mediante combinaciones de estos métodos, incluidas plantas transgénicas y las variedades de cultivo de plantas protegibles o no protegibles por los derechos de los productores. Debe entenderse que partes de las plantas significa todas las partes y órganos de las plantas que se encuentran encima y debajo del suelo, tales como el brote, hoja, la flor y la raíz, los ejemplos que se pueden mencionar son hojas, espículas, tallos, vástagos, flores, cuerpos fructíferos, frutas, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen material cosechado y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas.

El tratamiento de las plantas y partes de plantas con las composiciones expuestas anteriormente puede realizarse directamente o permitiendo que las composiciones actúen sobre su entorno, hábitat o espacio de almacenamiento mediante, por ejemplo, inmersión, pulverización, evaporación, nebulizando, dispersión, pintando, inyección. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición puede aplicarse a la semilla como una o más capas antes de plantar la semilla usando una o más capas usando métodos conocidos en la técnica.

Usos

Las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos pesticidas expuestos anteriormente pueden usarse como pesticidas. En particular, las composiciones, cultivos, sobrenadantes, los metabolitos y compuestos pesticidas como se expone anteriormente pueden usarse como insecticidas y nematicidas, solos o en combinación con una o más sustancias pesticidas establecidas anteriormente.

Específicamente, los nematodos que pueden controlarse usando el método expuesto anteriormente incluyen, pero sin limitación, nematodos parásitos tales como nudo de la raíz, quiste, y nematodos de lesión, incluyendo, sin limitación, *Meloidogyne* sp. *Tylenchorhynchus* sp, *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera,* sp., *Trichodorus* sp. *Paratrichodorus* sp., *Xiphinema* sp., y *Criconema* sp.; en particular, *Meloidogyne incognita* (nematodos agalladores), así como *Globodera rostochiensis* y *Globodera pailida* (nematodos del quiste de la patata); *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); y *Heterodera avenae* (nematodo del quiste de los cereales).

Los insectos fitopatógenos controlados mediante el método expuesto anteriormente incluyen, pero sin limitación, larvas

de insectos *no-Culicidae* del orden *Lepidoptera*, por ejemplo, *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., Crocidolomia 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, Operophtera 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 ejemplo, *Agriotes spp., Anthonomus spp., Atomaria linearis, Chaetocnema tibialis, Cosmopolites spp., Curculio spp., Dermestes spp., Diabrotica spp., Epilachna spp., Eremnus spp., Leptinotarsa dece mlineata, Lissorhoptrus spp., Melolontha spp., Orycaephilus spp., Otiorhynchus spp., Phlyctinus spp., Popillia spp., Psylliodes spp., Rhizopertha spp., Scarabeidae, Sitophilus spp., Sitotroga spp., Tenebrio spp., Tribolium spp. y Trogoderma spp.; (c) Orthoptera, por ejemplo, Blatta spp., Blattella spp., Gryllotalpa spp., Leucophaea maderae, Locust spp., Periplaneta spp. y Schistocerca spp.; (d) Isoptera, por ejemplo, Reticulitermes spp.; (e) Psocoptera, por ejemplo, Liposcelis spp.; (f) Anoplura, por ejemplo, Haematopinus spp., Linognathus spp., Pediculus spp., Pemphigus spp. y Phylloxera spp.; (g) Mallophaga, por ejemplo, Damalinea spp. y Trichodectes spp.; (h) Thysanoptera, por ejemplo, Frankliniella spp., Hercinotnrips spp., Taeniothrips spp., Thrips palmi, Thrips tabaci y Scirtothrips aurantii; (i) Heteroptera, por ejemplo, Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocorisa spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp. y Tniatoma spp.; (j) Homoptera, por ejemplo, Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspldiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lecanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Nephotettix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp., Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psylla spp., Pulvinaria aethiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza erytreae y Unaspis citri; (k) Hymenoptera, por ejemplo, Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. y Vespa spp.; (l) Diptera, por ejemplo, Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis 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 spp., Tannia spp. y Tipula spp.; (m) Siphonaptera, por ejemplo, Ceratophyllus spp. y Xenopsylla cheopis* y (n) del orden *Thysanura*, por ejemplo, *Lepisma saccharina.* Los ingredientes activos de acuerdo con la invención pueden usarse además para controlar escarabajos de pulgas crucíferas (*Phyllotreta* spp.), gusanos de raíz (*Delia* spp.), gorgojo de la semilla de col *(Ceutorhynchus* spp.) y pulgones en cultivos de semillas oleaginosas tales como canola (colza), semillas de mostaza y sus híbridos, y también arroz y maíz. En una realización particular, el insecto puede ser miembro de *Spodoptera,* más particularmente, *Spodoptera exigua, Myzus persicae, Plutella xylostella* o *Euschistus* sp.

Se proporciona la aplicación de una cantidad eficaz de control pesticida de un sobrenadante, filtrado o extracto que contiene un metabolito pesticidamente activo, o un compuesto aislado producido por *Chromobacterium* sp. o la aplicación de combinaciones de lo anterior. La cepa o sobrenadante o filtrado o extracto, metabolitos y/o compuestos se aplican, solos o en combinación con otra sustancia pesticida, en una cantidad eficaz de control de plaga o pesticida. Una cantidad eficaz se define como las cantidades de células de microorganismos, sobrenadante, filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto solos o en combinación con otra sustancia pesticida que es suficiente para modular la infestación de plagas. La tasa eficaz puede verse afectada por las especies de plagas presentes, etapa de crecimiento de plagas, densidad de población de plagas y factores ambientales tales como temperatura, velocidad del viento, lluvia, hora del día y estacionalidad. La cantidad que estará dentro de un intervalo eficaz en un caso particular puede determinarse mediante pruebas de laboratorio o de campo.

Ejemplos

La composición y los métodos expuestos anteriormente se ilustrarán adicionalmente en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE *CHROMOBACTERIUM SUBSTUGAE*

El siguiente procedimiento se usa para la purificación de compuestos extraídos del cultivo de *Chromobacterium substugae:*
El caldo de cultivo derivado de la fermentación de 10 l de *C. substugae* en caldo L se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar *et al*., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogen por filtración a través de estopilla y se lavan con agua DI para retirar las sales. La resina, la masa celular y la gasa se empapan durante 2 h en acetona/metanol (50/50) después de lo cual la acetona/metanol se filtra y se seca al vacío usando un evaporador rotatorio para dar el extracto crudo. Después, se

fracciona el extracto en bruto usando cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH 20 (CH_2Cl_2/CH_3OH; 50/50) para dar 7 fracciones (FIG. 1). Después, se concentraron estas fracciones a sequedad usando un evaporador rotatorio y se evalúa en los residuos secos resultantes su actividad biológica usando un ensayo de alimentación con oruga de la col *(Trichoplusia ni)* o gusano soldado de remolacha *(Spodoptera exigua).* Después, se sometió a las fracciones activas a HPLC en fase reversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific)) para proporcionar compuestos puros, que después se evaluaron en los bioensayos anteriormente mencionados para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales, tales como CL/EM y RMN.

La cromamida A (1) y el compuesto B se aislaron de las fracciones 1 y 2 respectivamente, mientras que se aislaron violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) de la fracción 5, todo lo cual se obtuvo de cromatografía Sephadex LH 20. Las estructuras de estos compuestos se exponen en la FIG. 7.

Purificación de compuestos

La purificación de cromamida A (1) se realizó utilizando una columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 10), un sistema disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min, 80-75 % de CH_3CN acuoso; 10-45 min, 75-60 % de CH_3CN acuoso; 45-55 min, 60-50 % de CH_3CN acuoso; 55-65 min, 50-100 % de CH_3CN acuoso; 65-70 min, 100% de CH_3CN; 55-70 min, 0-80% de CH_3CN acuoso) a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm. El compuesto activo cromamida A (1) tiene un tiempo de retención de 23,19 min.

La purificación del compuesto B de la invención se realizó usando una columna de HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10 u C18 (2) 100 A, 250 x 10), un sistema disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min, 80-75 % de CH_3CN acuoso; 10-45 min, 75-60 % de CH_3CN acuoso; 45-55 min, 60 - 50% de CH_3CN acuoso; 55-65 min, 50 - 100 % de CH_3CN acuoso; 65-70 min, 100% de CH_3CN; 55-70 min, 0-80% de CH_3CN acuoso) a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm, el compuesto activo B, tiempo de retención 26,39 min (véase la FIG. 6).

La purificación de violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) se realizó usando una columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 10), un sistema disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min, 70-60 % de CH_3CN acuoso; 10-40 min, 60 - 20 % de CH_3CN acuoso; 40-60 min, 20 - 0 % de CH_3CN acuoso; 60-65 min, 100% de CH_3CN; 65-75 min, 0-70 % de CH_3CN acuoso) a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm, los compuestos activos violaceína (2), tuvieron un tiempo de retención de 7,86 min y desoxiviolaceína (3) un tiempo de retención de 12,45 min.

Análisis de los compuestos por espectroscopía de masas

El análisis por espectrometría de masas de los picos activos se realiza en un instrumento de electronebulización (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización tanto positivo como negativo en un modo de escaneo completo (m/z 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento térmico (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, autosampler plus, bomba MS y una columna Luna C18 5 µ 100A de 4,6 mm x 100 mm (Phenomenex). El sistema disolvente consiste en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La fase móvil comienza con 10% de disolvente B y se aumenta linealmente hasta 100% de disolvente B durante 20 minutos y luego se mantiene durante 4 minutos, y finalmente se devuelve a 10% de disolvente B durante 3 minutos y se mantiene durante 3 minutos. El caudal es de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en una muestra automática. Los compuestos se analizaron mediante CL-EM utilizando la LC y cromatografía de fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza en las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para el caudal del gas de impulsión y del aux/de barrido, respectivamente. La ionización por electropulverización se realizó con un voltaje de pulverización ajustado a 5000 V y un voltaje de capilar a 35,0 V. La temperatura de capilar se ajustó a 400 °C. Los datos se analizaron en el software Xcalibur. La cromamida A (1) tiene una masa molecular de 860 en modo de ionización positiva (véase la FIG. 2). El cromatograma CL-EM para otro compuesto B activo sugiere una masa molecular de 874 en modo positivo de ionización. Violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) tenían las masas moleculares de 313 y 327 respectivamente en modo de ionización positiva.

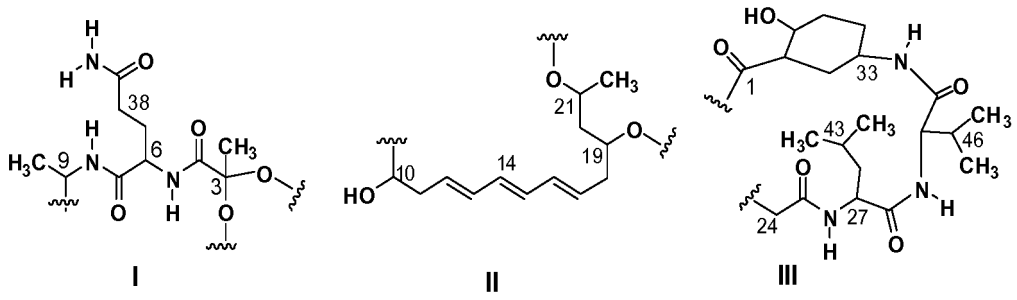
Análisis de los compuestos por espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN-RMN se midieron en un espectrómetro de campo en gradiente Bruker a 600 MHz. La referencia se establece en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm). Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo en un analizador de aminoácidos Hitachi 8800.

Para la elucidación de la estructura, la cromamida A purificada con peso molecular 860 se analiza adicionalmente usando un instrumento de RMN de 600 MHz, y tiene valores de RMN ^1H δ a 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 (véase la FIG. 4) y tiene valores de RMN ^{13}C de 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 (véase la FIG. 5). La cromamida A se aisló en forma de un sólido de color blanco, el cual se analizó para la fórmula molecular $C_{43}H_{68}N_6O_{12}$ (13 grados de insaturación), por espectrometría de masas de alta resolución ESI (obs. M+ *m/z* 861,5376, calc. M+ *m/z* 861,5343) (FIG. 3). Los datos espectrales de la RMN ^{1}H de la cromamida A en DMSO-d_6 exhibieron 68 señales de protones, en las que nueve protones [δ_H: 8,89, 8,44, 8,23, 8,22, 7,96, 7,64, 6,65, 5,10, 4,13], se asignaron como NH u OH debido a la falta de correlación de carbono en un análisis de RMN de correlación heteronuclear (HMQC). El espectro de RMN ^{13}C, mostró siete señales de carbonilo [δ_C: 173,62, 172,92, 172,25, 172,17, 171,66, 171,28, 170,45] y en el espectro de RMN ^{1}H, se observaron seis señales características de protones α-amino [δ_H: 4,07, 4,06, 3,96, 3,95, 3,88, 3,72] que demuestran la cromamida A es un péptido.

La interpretación de los datos de la RMN 2D RMN condujo a la asignación de tres unidades de aminoácidos de los seis, una leucina (Leu), una valina (Val) y una glutamina (Gln). La presencia de estos aminoácidos se confirmó mediante los resultados de análisis de aminoácidos, que también mostraron la presencia de los anteriores tres aminoácidos. Otros análisis de DEPT y datos espectrales de la RMN 2D (COSY, HSQC y HMBC) establecieron la presencia de tres subestructuras I, II y III tal como se muestra a continuación.



Las conexiones de las tres subestructuras en 1 se lograron mediante análisis de RMN de HMBC de rutina utilizando correlaciones entre el protón α-amino y/o el protón de amida secundaria y las resonancias de carbono carbonílico y la consideración de desplazamiento químico. El enlace de C-9 de la subestructura I con C-10 de la subestructura II se estableció mediante correlaciones HMBC de CH_3-40 [δ_H: 1,00] y el protón α-amino de alanina [δ_H: 3,42] con el carbono C-10 [δ_C: 70,11]. Esto se volvió a confirmar mediante correlación HMBC de hidroxilo en [δ_H: 5,10] con C-9 en [δ_C: 49,78]. El metileno en [δ_H: 3,50] de la subestructura III mostró una correlación HMBC de tres enlaces a C-19 [δ_C: 68,31] que conectó las subestructuras I y II. El carbono cuaternario en C-3 [δ_C: 98,09] se conectó con C-21 [δ_C: 64,40] a través de una correlación débil de H-21 [δ_H: 3,95] junto con sus valores de cambio químico para formar un sistema de anillo. Finalmente, el enlace de cierre del anillo se aseguró mediante una correlación HMBC de tres enlaces de H_3-36 [δ_H: 1,43] a C-1 [δ_C: 172,17], que permitió asignar la estructura plana de la cromamida A (1).

El compuesto B con un peso molecular de 874 mostró datos similares de RMN y UV que sugieren que este compuesto B también pertenece a la clase de los péptidos.

La estructura de violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) se asignó mediante la comparación de los datos de estos compuestos con los publicados en la bibliografía. Las estructuras de la cromamida A, violaceína y desoxiviolaceína se muestran en la FIG. 7.

Ejemplo 2: Análisis de aminoácidos de la cromamida A

La cromamida A (0,05 mg) se hidrolizó usando hidrólisis en fase líquida (HCl 6 N, 1% de fenol, 110 °C, 24 h., al vacío). Después del enfriamiento, la mezcla de reacción se secó y el producto hidrolizado se disolvió en tampón de dilución Norleu a un volumen de 1,0 ml. Se cargaron 50 µl de la muestra en la columna de intercambio iónico para análisis.

Para los patrones y la calibración, se usó la solución patrón de aminoácidos para hidrolizado de proteínas en el dispositivo Hitachi 8800 a base de Na (Sigma, A-9906) para determinar los factores de respuesta y de este modo calibrar el analizador Hitachi 8800 para todos los aminoácidos. Cada inyección contiene norleucina como patrón interno para permitir la corrección de los resultados respecto de variaciones en el volumen de la muestra y las variables de la cromatografía. El sistema utiliza tampones de Na de Pickerin, HCl de grado secuencial de Pierce (hidrólisis), una columna de intercambio iónico de Transgenomic y un método optimizado desarrollado por Molecular Structure Facility (MSF), UC Davis y se comunican los aminoácidos individuales presentes en la muestra. Se observó que los aminoácidos presentes en la muestra (cromamida A) eran Glx (glutamina/ácido glutámico), leu (leucina) y Val (valina).

Ejemplo 3: Confirmación de toxicidad en oruga de la col *(Trichoplusia ni)*

La toxicidad del compuesto de interés en la fracción 1 (F1) se confirmó en un ensayo *in vitro* utilizando larvas de oruga de la col de 1º estadio como objeto de ensayo.

Se distribuyeron doscientos microlitros de dieta comercial de oruga de la col en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Después de que la dieta se solidificara, se pipetearon 100 ul de solución que contiene 50 ul de extracto (correspondiente a cuatro picos individuales encontrados en la fracción 1; H1-H4), 350 ul de EtOH y 600 ul de agua DI estéril en cada pocillo, después de lo cual la placa se secó con un ventilador de mano. La cantidad de extracto en cada pocillo fue de 10 microgramos. Cada tratamiento se repitió ocho veces y se usó una mezcla de etanol puro y agua como control negativo.

Se colocó un insecto de ensayo (larvas de oruga de la col de 1º estadio) en cada pocillo, y la placa se cubrió con un sello adhesivo. El sello se perforó para aireación, y la placa sellada se incubó a 26 °C durante cuatro días.

Los resultados presentados en la Tabla 1 a continuación muestran una buena actividad (> 60 % de mortalidad) con un compuesto en el pico H1. Este pico particular corresponde a la cromamida A (1) (Figura 1).

Tabla 1: Mortalidad de oruga de la col (%) a 10 ug/pocillo

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

Ejemplo 4 - Determinación de LCso para violaceína para oruga de la col *(Trichoplusia ni)*

El sistema de ensayo de placa de 96 pocillos descrito en el ejemplo anterior se usó para determinar la concentración de violaceína pura necesaria para eliminar el 50% de las larvas de oruga de la col de 1º estadio. Los valores de mortalidad registrados después de 4 días de incubación a 26 °C se presentan en la Tabla 2 a continuación. Basándose en los datos, la violaceína es un potente insecticida con un valor de CL_{50} estimado de $7 * 10^{-6}$ microgramos por pocillo para las larvas de oruga de la col en un ensayo de superposición de dieta *in vitro*.

Tabla 2. Efecto de violaceína en la mortalidad de oruga de la col

Violaceína ug/pocillo	% de mortalidad Día 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

Ejemplo 5 - Actividad nematicida del caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) en nematodos juveniles de nudo de raíz

Para evaluar el efecto de *C. substugae* esterilizada por filtro en la motilidad (y la recuperación posterior) de nematodos de nudo de raíz juveniles (J2) *(Meloidogyne incognita* VW6), se realizó el siguiente ensayo en placas de cultivo celular de plástico de 24 pocillos: Se añadió una alícuota de 300 ul de cada solución de ensayo (caldo esterilizado por filtración 1x o 0,1x) en los pocillos apropiados después de lo cual, se agregaron quince nematodos dispensados en 10 ul de agua DI en cada pocillo, la placa se cerró con una tapa y se incubó a 25 °C durante 24 horas. Se usaron agua y Avid (avermectina) a una dilución de 20.000x como controles negativos y positivos, respectivamente. El efecto de cada compuesto en la movilidad de los nematodos se verificó después de 24 horas sondeando cada nematodo con una aguja, y la proporción de nematodos inmóviles en cada tratamiento se registró en un cuaderno usando una escala de %. Para evaluar la recuperación de movilidad en cada tratamiento, se eliminó un volumen de 200 ul de cada pocillo, y la solución restante en cada pocillo se diluyó agregando 2 ml de agua DI. Las placas se incubaron nuevamente durante 24 horas como se describió anteriormente, después de lo cual se realizó la segunda evaluación de movilidad (48 horas).

Los resultados presentados en las Figs. 8 y 9 muestran que el caldo esterilizado por filtración sin diluir puede inmovilizar los nematodos de nudo de raíz juveniles de vida libre. Este efecto dura al menos 48 horas, lo que sugiere que el caldo *C. substugae* tiene actividad nematicida.

Ejemplo 6: Efecto de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) sobre agalla de raíces de pepino

MBI-203 se ensayó para su actividad intrínseca contra el nematodo de nudo de raíz *Meloidogyne sp.* en dos ensayos de minidrenaje.

Materiales y métodos

Específicamente, MBI-203 se ensayó en un ensayo de invernadero realizado en macetas de 45 ml. Se sembraron semillas de pepino cv. directamente en macetas llenas de suelo franco arenoso. Diez días después, las macetas se trataron cada una con 5 ml de una suspensión. A continuación, las macetas se inocularon con 3000 huevos de *M. incognita.* Se prepararon cuatro duplicados para cada tratamiento y tasa. El ensayo se cosechó catorce días después de la aplicación del ensayo y la inoculación. La agalla de la raíz se evaluó de acuerdo con el índice de agalla de Zeck (Zeck, 1971). Las condiciones específicas se exponen a continuación en la Tabla 3.

La fitotoxicidad se midió como una reducción del crecimiento de las plántulas de pepino emergidas en comparación con el control.

Tabla 3

	MBI-203 Fostiazato (estándar, EC 150)
Especies de ensayo	*Meloidogyne sp.* aplicado a 3000 huevos por maceta de minidrenaje (en 2 ml)
Planta de ensayo	*Cucumis sativus* (pepino cv. Toschka)
Formulación de ensayo	MBI-203 = 96% de formulación líquida
Concentraciones de ensayo para MBI-203	Ensayo de minidrenaje n.º 1: 100, 50 ml/l Ensayo de minidrenaje n.º 2: 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/l
Aplicación de ensayo	Aplicación de drenaje

Resultados

Ensayo de minidrenaje n.º 1

La actividad de los tratamientos fue muy alta y se observó una reducción de casi el 100% cuando se aplicó a una concentración de 50 ml/l (MBI-203). Se observó fitotoxicidad menor para MBI-203. Fostiazato realizado como de costumbre (100% de control a 20 ppm).

Ensayo de minidrenaje n.º 2

MBI-203 mostró fitotoxicidad a las concentraciones más altas de 50 y 25 ml/l y las evaluaciones no pudieron realizarse a estas tasas.

A una concentración de 12,5 ml/l, el control de nematodos fue superior al 95%, que disminuyó al 33% a 3 ml/l. A una velocidad de 1,5 ml/l no se registró actividad.

Fostiazato realizado como de costumbre (100% de control a 20 ppm).

Ejemplo 8: Estudios sinérgicos con caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203)

Las pruebas de sinergia se realizaron tratando la dieta artificial en placas de 96 pocillos y alimentando la dieta tratada a larvas de recién nacidos. Se pipetearon 100 µl de tratamiento en múltiples pocillos de cada placa. Se ensayaron MBI-203 (caldo de células enteras concentrado a 7,6% de peso de células secas) solo, el insecticida comercial solo y la combinación de los 2 usando concentraciones predeterminadas de LC_{50} o fracciones de las mismas. La dieta se secó con ventilador para eliminar el exceso de humedad. Se transfirieron gusanos soldado de remolacha, *Spodoptera exigua,* u orugas de la col, *Trichoplusia ni,* neonatos a cada pocillo de la placa multipocillos. Las placas infestadas se cubrieron con sellador de placas adhesivas y se hizo un pequeño agujero en el sellador sobre cada pocillo para permitir la aireación. Las placas se almacenaron en una incubadora a 26 °C, 16 h de luz/8 h de ciclo oscuro durante 3 días. En el tercer y cuarto día después de infestar, se puntuó la mortalidad.

La determinación de una interacción sinérgica, antagonista o aditiva se determinó utilizando los métodos de (Colby 1967). Debido a la variación en los bioensayos, se determinó que las relaciones entre 0 y 0,9 se considerarían antagónicas, las relaciones 0,9-1,1 serían aditivas, y las relaciones superiores a 1,1 se considerarían relaciones sinérgicas.

Se ensayó la sinergia de MBI-203 con insecticidas contra oruga de la col. Clorantraniliprol (comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Espinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Espirotetramet (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) y Piretro/piretrinas (comercializado como Pyganic®, Arbico Organics) se ensayaron con MBI-203. Como se indicó anteriormente, excepto donde se indique, se usaron concentraciones CL_{50} de MBI-203 e insecticidas. Los resultados

se muestran en la Tabla 4. Todos, excepto Bt var. kurstaki y el caso 1 de concentración CL_{50} mostraron sinergia.

Tabla 4: MBI-203 + Insecticida: Efecto en orugas de la col

Producto	MBI-203 solo % de eliminación	Producto solo % de eliminación	Combinación calculada % de eliminación	Combinación real % de eliminación	Relación	Relación definida[a]
Clorantraniliprol	21	3	23,4	33,3	1,42	sin
Bt var. kurstaki	61,7	89,6	96	100	1,04	ad
Espinosad	41,5	54,3	72,99	100,00	1,37	sin
Espirotetramet	87,9	23,8	86,34	89,87	1,04	ad
Espirotetramet (0,5X CL_{50}); MBI-203 (0,3X CL_{50})	90,6	41,5	91,90	94,94	1,03	ad
Piretro	19,7	2,8	21,93	55,37	2,53	sin
[a] sin = sinérgico; ad = aditivo						

Se ensayó la sinergia de MBI-203 con insecticidas contra el gusano soldado de remolacha (BAW). Clorantraniliprol (comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Espinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Espirotetramet (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) y Piretro/piretrinas (comercializado como Pyganic®, Arbico Organics) se ensayaron con MBI-203. Como se indicó anteriormente, excepto donde se indique, se usaron concentraciones CL_{50} de MBI-203 e insecticidas. Los resultados se muestran en la Tabla 5. MBI-203 y Clorantraniliprol interactuaron aditivamente mientras que *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* y Espinosad mostraron control sinérgico de BAW con MBI-203. Las combinaciones de piretro con MBI-203 fueron antagónicas. Las combinaciones de Espirotetramet y MBI-203 fueron principalmente antagónicas contra gusanos soldado.

Tabla 5: MBI-203 + Insecticida: Efecto sobre gusano soldado de remolacha

Producto	MBI-203 solo % de eliminación	Producto solo % de eliminación	Combinación calculada % de eliminación	Combinación real % de eliminación	Relación	Relación definida[a]
Clorantraniliprol	11,6	9,1	19,69	19,9	1,01	ad
Bt var. kurstaki	24,5	19,8	39,4	68,3	1,73	sin
Espinosad	23,8	68,7	83,33	100	1,2	sin
Espirotetramet	0	21,6	36,10	27,60	0,76	antag
Espirotetramet (0,53X CL_{50}); MBI-203 (0,7X CL_{50})	0	42,9	38,55	41,67	1,08	ad
Espirotetramet	21,4	53,3	60,57	53,70	0,89	antag
Espirotetramet (1,4X CL_{50}); MBI-203 (1,2X CL_{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; ad = aditivo; antag = antagonista						

Referencias

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 activity." 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.

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. Nueva York, John Wiley & Sons. 3: 1104-1115.

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.

Durán, N. y 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 <italic>Anopheles gambiae</italic> Mosquitoes." PLoS ONE 5(8): e12081.

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.

Hummelbrunner, L. A. y 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.

Hungría, 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.

Krieg, A., A. M. Huger, *et al*. (1983). "Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber 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.

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" Patente de Estados Unidos n.º 7244607 B2.

Martin, P.A.W., Hirose, E., y 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.

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

McClean, 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.

Meunier, L., P. Carubel, *et al*. (1999). Insecticidal combinations including an insecticide from the family chloronicotinyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. Estados Unidos. Estados Unidos, Rhone-Poulene Agrochimie: 6.

Pederson, M. y H. S. Woldum. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, Patente US 2009/0111579, publicada el 30 de abril de 2009.

Puritch, G. y G. Salloum. Environmentally Safe Insecticide, Patente US 5047424, publicada el 10 de septiembre de 1991.

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

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.

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

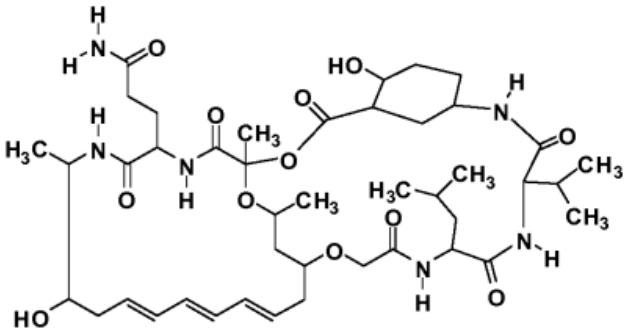
Wirth, M. C., J. A. Jiannino, *et al*. (2004). "Synergy between Toxins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis and Bacillus sphaericus." Journal of Medical Entomology 41: 935-941.

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto aislado que tiene la estructura:



Cromamida 1 (A)

y que tiene actividad insecticida.

2. Una composición que comprende el compuesto aislado de la reivindicación 1.

3. Un método para modular la infestación de insectos en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta la composición de la reivindicación 2 en una cantidad eficaz para modular dicha infestación de insectos.

4. Un método para modular la infestación de nematodos en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta la composición de la reivindicación 2, en una cantidad eficaz para modular dicha infestación de nematodos.

5. Una combinación pesticida sinérgica para inhibir gusano soldado de remolacha que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida, en donde dicha sustancia pesticida se selecciona entre espinosad y Bt var. Kurstaki o sinérgica para inhibir orugas de la col que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida, en donde dicha sustancia pesticida se selecciona de clorantraniliprol, espinosad y piretrinas.

6. La combinación pesticida de la reivindicación 5, en donde el compuesto aislado de la reivindicación 1 deriva de un caldo celular completo, sobrenadante, filtrado, o extracto de *Chromobacterium* sp. nov. (NRRL B-30655).

7. Un método para modular sinérgicamente la infestación de gusano soldado de remolacha en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta el compuesto aislado de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida en una cantidad eficaz para modular sinérgicamente dicha infestación, en donde la segunda sustancia se selecciona de espinosad y Bt var. Kurstaki o para modular sinérgicamente la infestación de orugas de la col en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta el compuesto aislado de la reivindicación 1 y una segunda sustancia pesticida en una cantidad eficaz para modular sinérgicamente dicha infestación, en donde la segunda sustancia se selecciona de clorantraniliprol, espinosad, y piretrinas.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el compuesto aislado de la reivindicación 1 deriva de un caldo celular completo, sobrenadante, filtrado, o extracto de *Chromobacterium* sp. nov. (NRRL B-30655).

FIG. 1

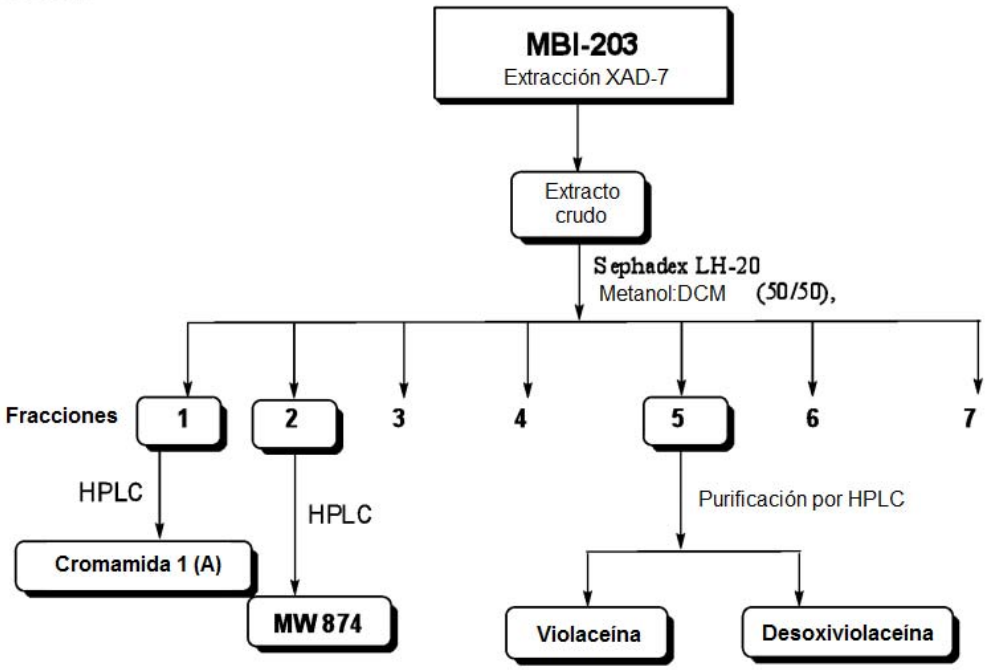

MBI-203
Extracción XAD-7
Extracto crudo
Sephadex LH-20
Metanol:DCM (50/50),
Fracciones
1
2
3
4
5
6
7
HPLC
HPLC
Purificación por HPLC
Cromamida 1 (A)
MW 874
Violaceína
Desoxiviolaceína

FIG. 2

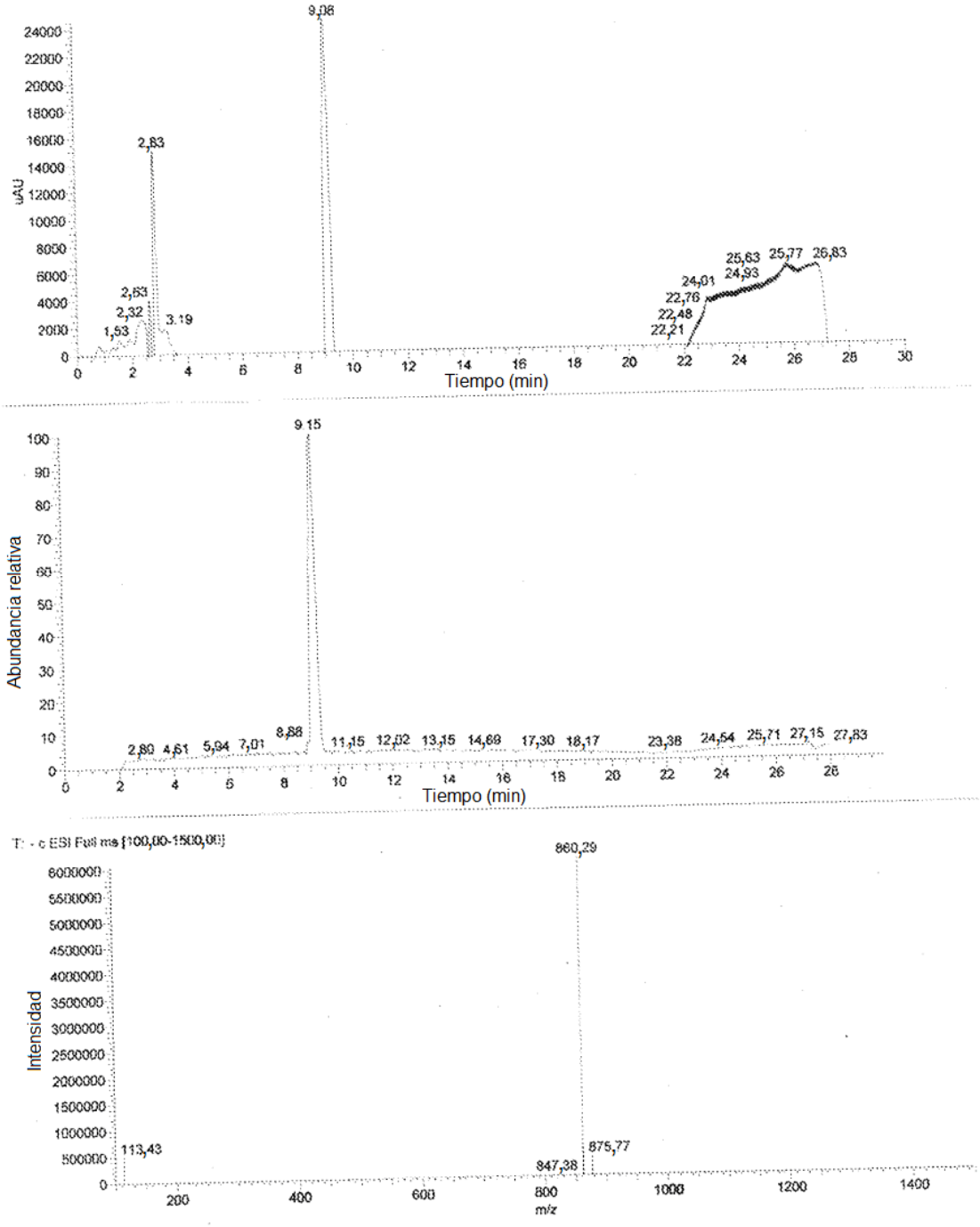

uAU
Tiempo (min)
Abundancia relativa
Tiempo (min)
Intensidad
m/z
860,29
875,77
847,38
113,43

FIG. 3

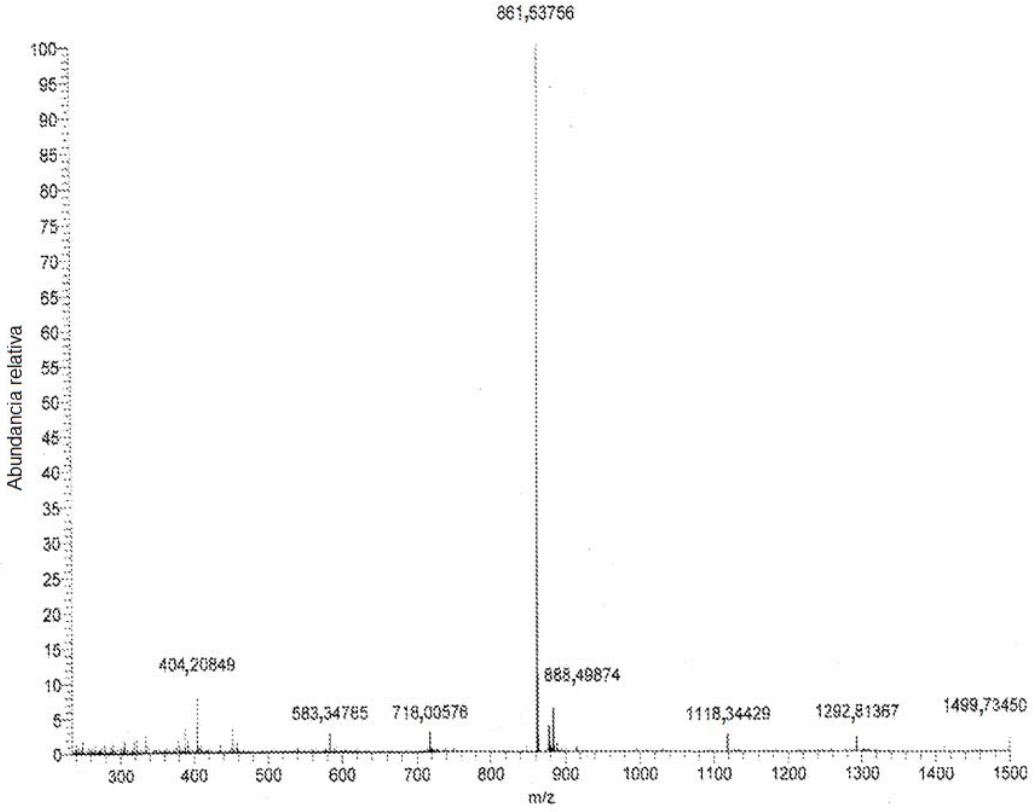

861,63756
404,20849
583,34765
718,00578
888,49874
1118,34429
1292,81367
1499,73450
Abundancia relativa
m/z

FIG. 4

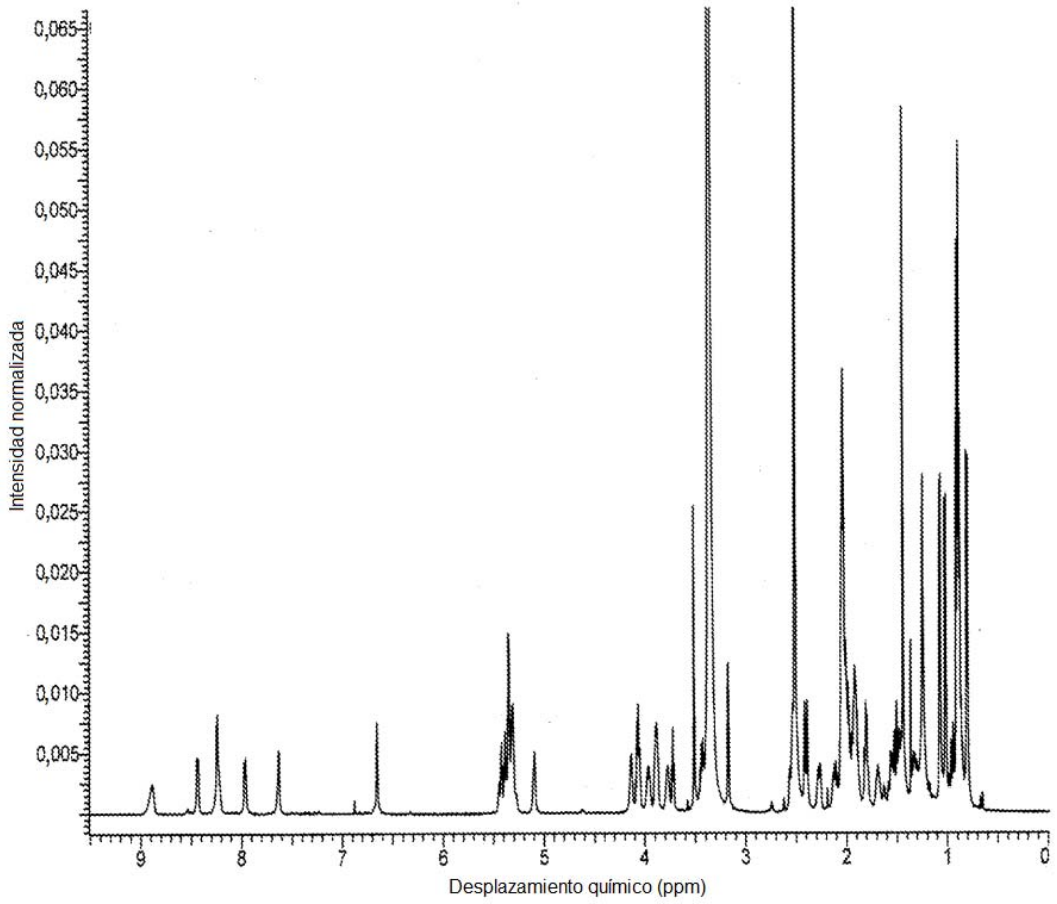

Intensidad normalizada
0,065
0,060
0,055
0,050
0,045
0,040
0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Desplazamiento químico (ppm)

FIG. 5

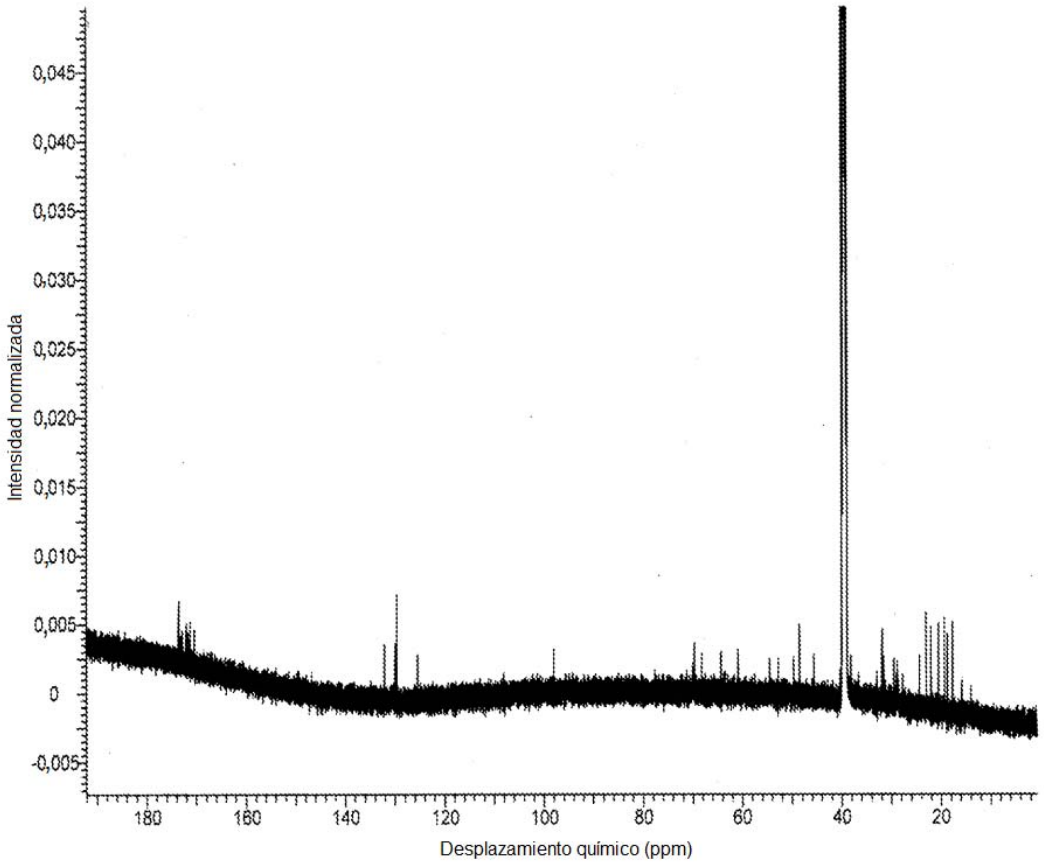

Intensidad normalizada
0,045
0,040
0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0
-0,005
180
160
140
120
100
80
60
40
20
Desplazamiento químico (ppm)

FIG. 6

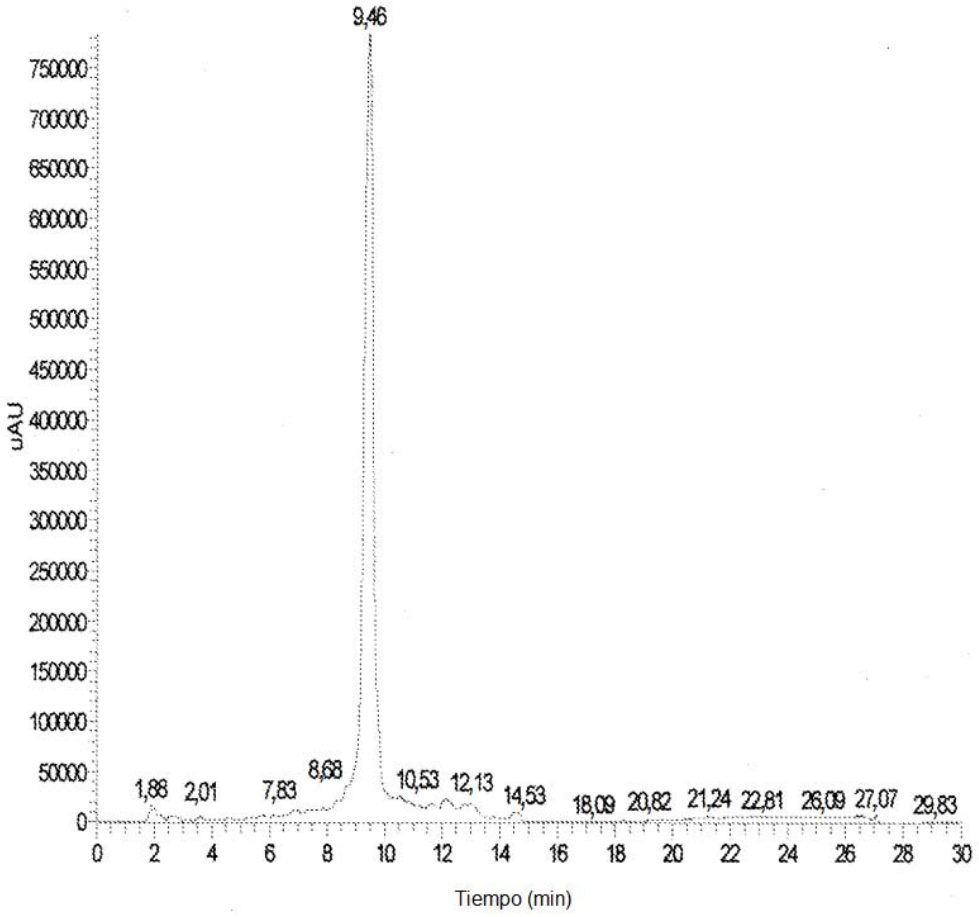
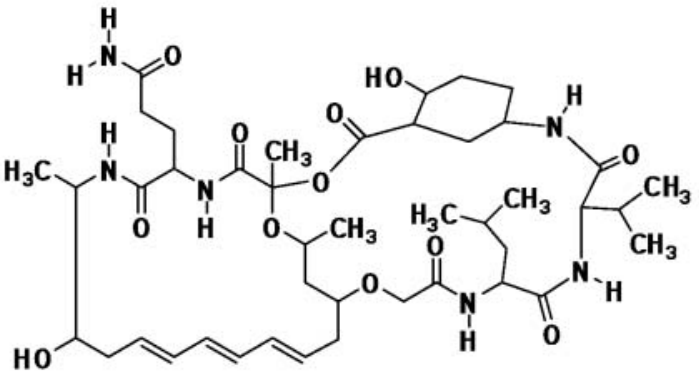
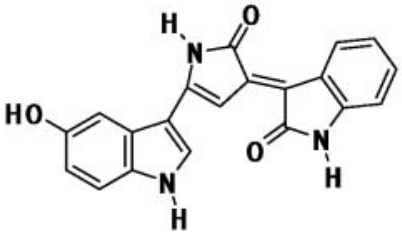

9,46
750000
700000
650000
600000
550000
500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
uAU
1,88
2,01
7,83
8,68
10,53
12,13
14,53
18,09
20,82
21,24
22,81
26,09
27,07
29,83
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
Tiempo (min)

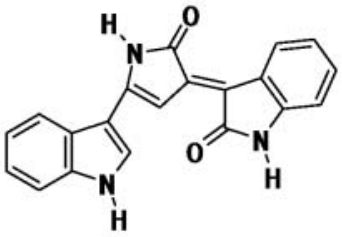
FIG. 7



Cromamida A (1)



Violaceína (2)



Desoxiviolaceína (3)

FIG. 8

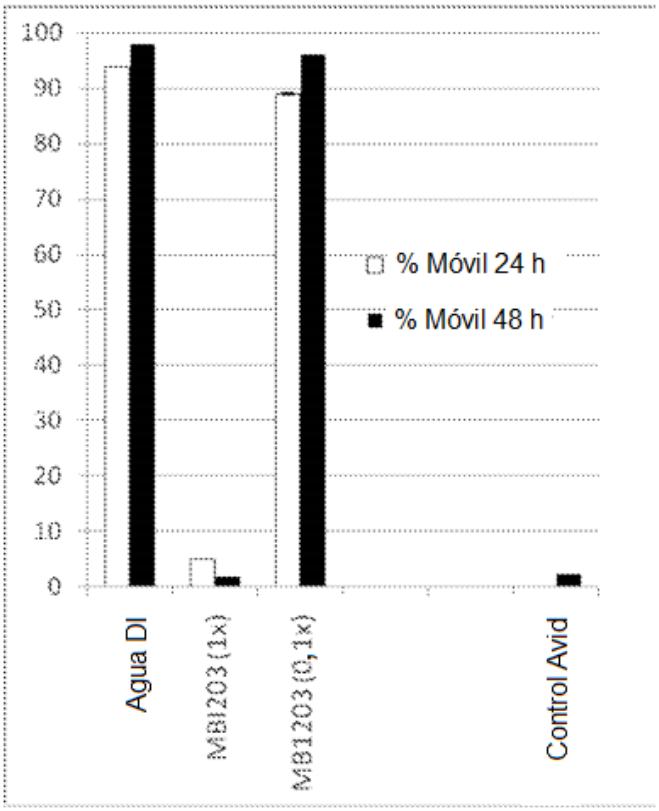
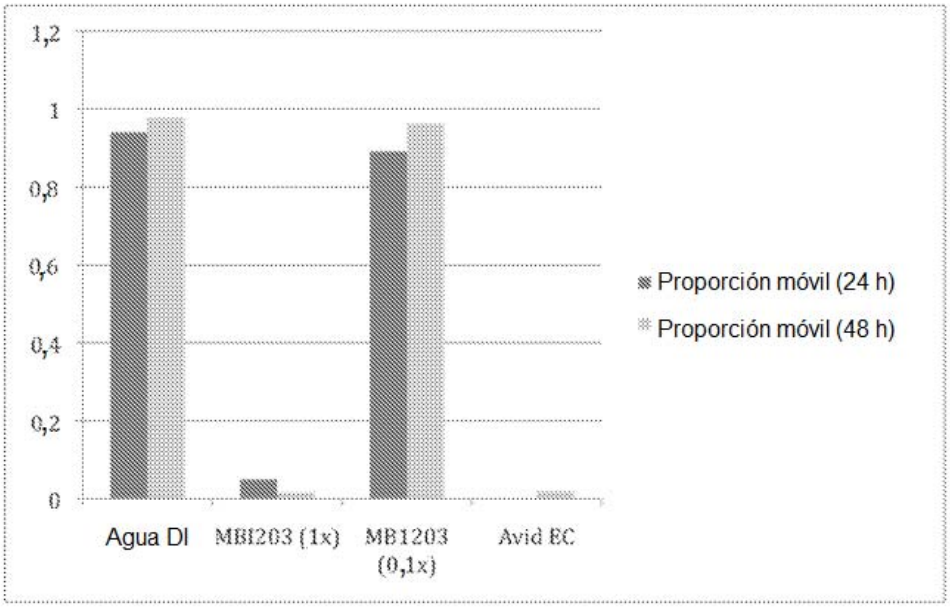

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Móvil 24 h
% Móvil 48 h
Agua DI
MB1203 (1x)
MB1203 (0,1x)
Control Avid

FIG. 9


1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Agua DI
MBI203 (1x)
MB1203 (0,1x)
Avid EC
Proporción móvil (24 h)
Proporción móvil (48 h)