



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

03-55758

54. TÍTULO

COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTIPARACITARIAS

que comprenden un agente quinolítico ó un agente inductor de la actividad quinolítica y un sulfuro o agente productor de sulfuros. (folio 62)

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A01N 63/00

71. SOLICITANTE

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

DOMICILIO

Ciudad de La Habana, Cuba

74. APODERADO

Emilio Ferrero

Código No. 1092

22. BOGOTÁ, D. C.



PETITORIO



03 055758 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 93055758 00000000

Fecha (AMB): 2003-07-02 17:00:35

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 52 ón

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:		
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.		
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA sociedad constituida y existente bajo las leyes de Cuba Dirección: Ave. 31 entre 158 y 180, Cubanacan, Playa, Ciudad de La Habana 106000, Cuba Domicilio: Ciudad de La Habana, Cuba	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax:: 217 92 11 E-mail: clientes@camvp.com . Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: <u>438.019</u> T.P. <u>31.929</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	1- Jesús MENA CAMPOS Avenida Principal No. 17, Reparto Lenin, Camaguey 70500, Cuba 3- Armando Tomas HERNÁNDEZ GARCÍA Edificio 16, Apto. 16 Reparto Puerto Príncipe, Camaguey 70800, Cuba 5- Marieta MARIN BRUZOS Joaquín Agüero No. 203, Entre Julio Sanguily y Gonzalo de Quesada, La Vigla, Camaguey 70200, Cuba 7- Marilyn DOMINGO PUENTE Calle: 3ra, No. 30, entre: A y B, Comunidad Científica Camaguey 70800, Cuba 9- Merardo PUJOL FERRERO Calle: 186, entre: 31 y 33, No. 3115, Apto. 6C, Playa, Ciudad de La Habana 12100, Cuba 11- Carlos BORROTO NORDELO Ave: 31, entre 182 y 184, No. 18207 Apto. 2, Playa Ciudad de La Habana 12100, Cuba	
	2- Eulogio PIMENTEL VAZQUEZ Jaime Noguera No. 233, entre: Fernando de Zayas y Gonzalo de Quesada La Vigla, Camaguey 70200, Cuba 4- Lluven VELOZ GONZALEZ Las Palmas No. 4, entre: Ave. Ignacio Agramonte y Motreal, La zambрана, Camaguey 70300, Cuba 6- Oscar COMPTE ALBERTO Calle: 3ra, No. 30, entre A y B, Comunidad Científica, Camaguey 70800, Cuba 8- Licette LEON BARRERAS Calle: 2da, No. 5, entre: B y C, Comunidad Científica, Camaguey 70800, Cuba 10- Juan Diego MENCHO PONCE Calle: 4ta, No 12, entre A y 1ra, Reparto José Martí, Camaguey 7600, Cuba	

5

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/CU01/00014

Publicación Internacional No. WO 02/052934 A3

Fecha: 17 de diciembre de 2001

Fecha :11 de julio de 2002

6

Título (54) COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTIPARASITARIAS

7

Clasificación Internacional (51) A01N 63/00, 59/02

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

CU

(32) Fecha

3 de enero de 2001

(31) Número de Solicitud

20010004

9

Comprobante de pago No.: _____ Fecha: _____

10

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por\$ 400.000

☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒ Poderes, si fuere el caso.

☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐ Declaraciones.

☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

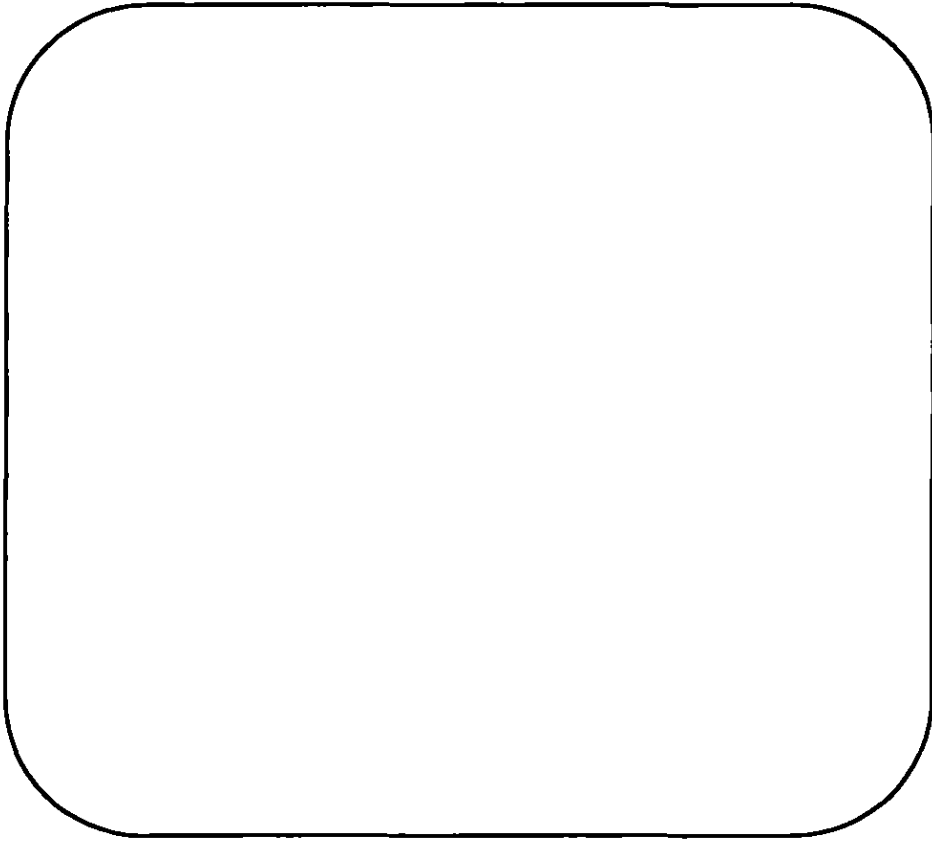
☐ Arte final 12x12

☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

MRE/mrm-ld-



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION JURIDICA

José D. Peraza Chapeau, Jo Julio P. Alvarez Dur:
Jo Orlando F. Acea's Paz, Jo Maria Silvia Ferna:
des Villar, Jo Alda de Furo Peltraza, Jo Manue
Capez Ruiz, Jo Julia Fernández Pano. Funcione
rios autorizados para certificar Autenticaciones
de firmar en Documentos expedidos para surti
dicos en el extranjero.

CERTIFICO: QUE AL PARECER ES AUTENTICA DEL
FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO,
LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR LA SEMEJANZA QUE
GUARDA CON LA QUE OYEA REGISTRADA EN ESTE
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A
USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA

26 NOV 1987

COMO NOTARIO LLEVO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA. HAY CONSTANCIA QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
POR HABERSE TIRADO A LA VISTA

02 JUL 2003

PAOLO L. R. RARAJAS
AC. (12)

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, S. COLOMBIA

8412
5917

Para patentes, modelos de utilidad y diseños industriales, marcas de fábrica y de servicio, nombres comerciales, enseñas y lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

La que suscribe, CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,

sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Cuba,

domiciliada en 31 Street 1/150 & 190, Cubanacan, Playa, Habana, Cuba, designa a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de nuestra propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio; renuncia voluntaria, y registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Firmado en la ciudad de La Habana

el 19 de noviembre de 1997

Dr. Manuel de Jesús Limonta Vidal

CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-10 (MINUTA N° 12.1.1.1.4.1)



LIC. Carmen Alicia Pérez Díaz
Notario de la Notaría Regional a cargo
de la Dirección de Registro y Notarías
del Ministerio de Justicia de la República
de Cuba.

Doy fe. Que la(s) firma(s) que
anteriormente se mencionan por la
presente se encuentran en todas sus
actos.

La Habana, a los 19 días del mes
de noviembre de 1997

Para los países que no son parte del Protocolo Interamericano de 1940 sobre Uniformidad del Régimen Legal de los Poderes, el Cónsul Colombiano debe certificar como sigue*:

Fecha:

Nº _____

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

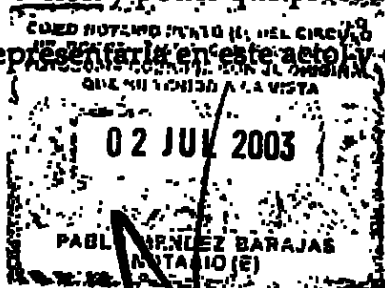
CERTIFICA:

1ª Que el señor
quien autentica el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones de

y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

2ª Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
que actualmente ejerce su objeto social y; existe legalmente, y

3ª Que el señor
quien firmó la representación y poder que preceden en su carácter de
de la Compañía
está autorizado para representarla en este acto y otorgar el poder.



Cónsul de Colombia

* Son parte del Protocolo: Colombia, El Salvador, México, Venezuela y los Estados Unidos. En los demás países el Señor Cónsul de Colombia debe otorgar el certificado según el modelo de esta página.

FECHA

No.

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

C E R T I F I C A :

- 1o. Que el señor
quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente
en la fecha allí indicada, las funciones de
y que la firma
y sello que en el documento aparecen como suyos son los que
usa y acostumbra en sus actos oficiales.
- 2o.) Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,
domiciliada en 31 Street 1/156 & 190, ~~Cubangem, Playa~~
Habana, Cuba,
existe legalmente y que actualmente ejerce su objeto social
de acuerdo con las leyes del respectivo país.
- 3o.) Que el señor , quien
firmó el poder que precede en su carácter de
está autorizado para
representarla en este acto y otorgar el poder.

DERECHOS USS

CONSUL



Consulado General de Colombia
LA HABANA, CUBA

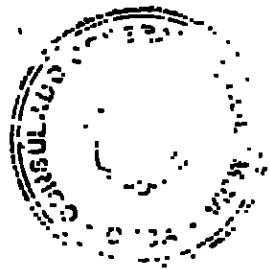
No. 68/97

La Habana, Diciembre 26 de 1997

La suscrita Cónsul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que el Señor Jesús Fernández Ponce, quien como funcionario de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; Que el CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA es una unidad presupuestada constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; Que el Señor Manuel de Jesús Limonta Vidal, quien en su carácter de Director de la citada unidad presupuestada confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Cónsul General de Colombia no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

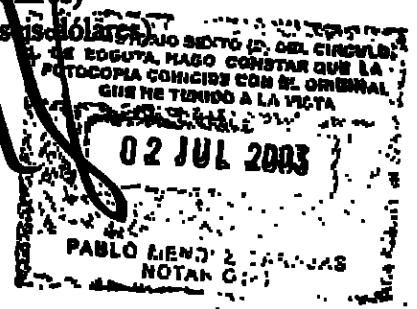


Martha Niño de Stand

Martha Niño de Stand.
Consul General

PAGADOS
IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

US\$ 6.00 (seis dólares)
US\$ 100.00 (cien dólares)
US\$ 106.00 (cienos y seis dólares)



CENTRO DE INVESTIGACIONES Y BÚSQUEDA
DE PERSONAS DESAPARECIDAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD POR EL TEXTO

1998 ENF 13/P/12 12

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

202497

ESTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENADO
FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEPTO DE DEL CINCUENTA
DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CUANDO CON LA VARIANTE
QUE ME TRUENO A LA VISTA
02 JUL 2003
PABLO MENDEZ
NOTARIO

CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX 57(11) 2358850

CABLES CAVELEYES

TELEX 45479

EDIFICIO SISKI

CARRERA 41, No 72-35

BOGOTA 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL.CAVE

TELEFONO 57(11) 2120100

Señor Jefe de la

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E.

S.

D.

Poderdante: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Poder conferido el: 19-11-97

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

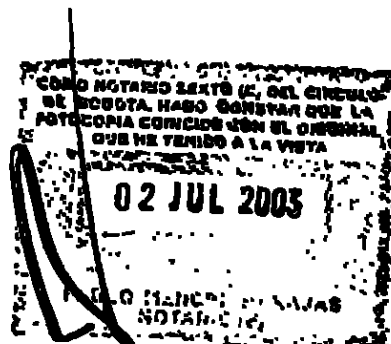
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. No 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



2e-780-2

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

LIBRO DE PRESENTACION PERSONAL

Fogote D. C. 13 ENE 1998

JOSE MANUEL ROFFO MEDINA

CONSEJO DEL CIRCULO DE BOGOTA

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

(Firma) personal

COMO NOTARIO ESTABA EN EL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TRAYO EL NOTARIO

02 JUL 2003

PABLO

Ben Carh

Enili Fuenno



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

A 1
A 2
A 3

(43) Fecha de publicación internacional
11 de Julio de 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/052934 (A3)

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A01N 63/00, 59/02

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU(01/XXX)14

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de Diciembre de 2001 (17.12.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
200100004 3 de Enero de 2001 (03.01.2001) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacan, Playa, Ciudad de La Habana 106000 (CU).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MENA CAMPOS, Jesus [CU/CU]; Avenida Principal No. 17, Reparto Lenin, Camaguey 70500 (CU). PIMENTEL VAZQUEZ, Eulogio [CU/CU]; Jaime Noguera No. 233, entre: Fernando de Zayas y Gonzalo de Quesada, La Vigia, Camaguey 70200 (CU). HERNANDEZ GARCIA, Armando, Tomas [CU/CU]; Edificio 16, Apto. 16, Reparto Puerto Principe, Camaguey 70800 (CU). VELOZ GONZALES, Lluven [CU/CU]; Las Palmas No. 4, entre: Ave. Ignacio Agramonte y Motreal, La Zambraña, Camaguey 70300 (CU). MARIN BRUZOS, Marieta [CU/CU]; Joaquín Aguero No. 203, entre: Julio Sanguily y Gonzalo de Quesada, La Vigia, Camaguey 70200 (CU). COMPTE ALBERTO, Oscar [CU/CU]; Calle: 3ra. No. 30, entre:

A y B, Comunidad Científica, Camaguey 70800 (CU). DOMINGO PUENTE, Marilyn [CU/CU]; Calle: 3ra. No. 30, entre: A y B, Comunidad Científica, Camaguey 70800 (CU). LEON BARRERAS, Licette [CU/CU]; Calle: 2da. No. 5, entre: B y C, Comunidad Científica, Camaguey 70800 (CU). PUJOL FERRERO, Merardo [CU/CU]; Calle: 186, entre: 31 y 33, No. 3115, Apto. 6C, Playa, Ciudad Habana 12100 (CU). MENCHE PONCE, Juan, Diego [CU/CU]; Calle: 4ta. No. 12, entre: A y 1ra, Reparto Jose Martí, Camaguey 70600 (CU). BORROTO NORDELO, Carlos [CU/CU]; Ave: 31, entre: 182 y 184, No. 18207, Apto. 2, Playa, Ciudad Habana 12100 (CU).

(74) Mandatario: LOPEZ OCEJO, Omar; Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacan, Playa, Ciudad de La Habana 106000 (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UK, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europeo (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

con informe de búsqueda internacional

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PESTICIDAL AND ANTIPARASITIC COMPOSITIONS

(54) Título: COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTI-PARASITARIAS

(57) Abstract: The invention relates to pesticidal and antiparasitic compositions for the control of pests, diseases and parasites attacking plants and animals. Said compositions include at least one chitinolytic agent or a chitinolytic activity inducing agent and sulfur or a sulfur producing agent obtained from microorganisms or chemical compounds, wherein the chitinolytic agent or the chitinolytic activity inducing agent and sulfur or the sulfur producing agent obtained from microorganisms or chemical compounds are concurrently applied at a range significantly lower than any of the above-mentioned compounds when they are applied individually to attain effective control.

(57) Resumen: Composiciones pesticidas y antiparasitarias para el control de plagas, enfermedades y parásitos que atacan a las plantas y los animales. Las composiciones incluyen al menos un agente quitinolítico o un agente inductor de la actividad quitinolítica, y sulfuro o un agente productor de sulfuro obtenido de microorganismos o compuestos químicos, en los cuales el agente quitinolítico o el agente inductor de la actividad quitinolítica y el sulfuro o un agente productor de sulfuro que se obtiene de microorganismos o compuestos químicos, se aplican de manera concurrente a un rango significativamente menor que cualquiera de los compuestos señalados anteriormente, cuando se aplican individualmente para lograr un control efectivo.

WO 02/052934 A3

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional: 19 de Septiembre de 2012

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN ver la notificación de transmisión del informe de búsqueda internacional (Formulario PCT/ISA/220) y, en su caso, el punto 5 de esta hoja.	
Solicitud internacional n° PCT/CU 01/00014	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 17 diciembre 2001 (17/12/01)	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 3 enero 2001 (03/01/01)
Solicitante CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, J. MENA CAMPOS y otros		

El presente informe de búsqueda internacional, elaborado por esta Administración encargada de la Búsqueda Internacional, se transmite al solicitante, conforme al artículo 18. Se remite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende un total de 4 hojas.

☒ Se adjunta una copia de cada uno de los documentos citados en el informe relativos al estado de la técnica.

1. Consideraciones sobre el informe

a. En lo que se refiere al idioma, la búsqueda internacional se ha realizado sobre la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada en este apartado.

☐ la búsqueda internacional se ha realizado sobre una traducción de la solicitud internacional facilitada a esta Administración (Regla 23.1 b)).

b. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional (en su caso), la búsqueda internacional se ha basado en la lista de secuencias:

☐ contenida en la solicitud internacional en formato escrito.

☐ presentada conjuntamente con la solicitud internacional en soporte legible por ordenador.

☐ facilitada posteriormente a esta Administración por escrito.

☐ facilitada posteriormente a esta Administración en soporte legible por ordenador.

☐ se ha entregado la declaración, según la cual la lista de secuencias presentada por escrito posteriormente no va más allá de la divulgación hecha en la solicitud internacional tal y como fue presentada.

☐ se ha entregado la declaración, según la cual la información grabada en el soporte legible por ordenador es idéntica a la lista de secuencias presentada por escrito.

2. ☐ Se estima que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (ver recuadro I).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver recuadro II).

4. Con respecto al título,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto ha sido establecido por esta Administración con la siguiente redacción:

5. Con respecto al resumen,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto (reproducido en el recuadro III) ha sido establecido por esta Administración de conformidad con la regla 38.2b). El solicitante puede presentar observaciones a esta Administración en el plazo de un mes a contar desde la fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional.

6. La figura de los dibujos a publicar junto con el resumen es la siguiente:

☐ propuesta por el solicitante.

☒ No debe publicarse ninguna figura.

☐ por no haber propuesto el solicitante ninguna figura.

☐ por caracterizar mejor, esta figura, la invención.

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN
CIP 7 A01N63/00 A01N59/02

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP 7 A01N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	EP 0 401 560 A (TODA BIOSYSTEM LAB) 12 Diciembre 1990 (1990-12-12) reivindicaciones 1-8 ---	1,3,5, 12,14,16
X	WO 94 13784 A (CORNELL RES FOUNDATION INC) 23 Junio 1994 (1994-06-23) reivindicación 3 ---	1,2,18
A	HERRERA ESTRELLA, A. ET AL.: "Chitinases in biological control" EXS, vol. 87 (Chitin and Chitinases), 1999, páginas 171-184, XP002194751 ISSN: 1023-294X --- -/--	1-22

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que pueda plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento está combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional
1 Abril 2002

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
13.03.02

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 spo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado
MAQUEDANO, A

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	RODRIGUEZ-KABANA, R.: "Control biologico de nematodos parasitos de plantas" NEMATROPICA, vol. 21, num. 1, 1991, páginas 111-122, XP002194752 ---	
A	TÓPP, E. ET AL.: "Effects of marigold (Tagetes sp.) roots on soil microorganisms" BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS, vol. 27, num. 2, 1998, páginas 149-154, XP002194753 Berlin (Germany) ISSN: 0178-2762 -----	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 01/00014

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
EP 0401560	A	12-12-1990	JP	2304008 A		17-12-1990
			JP	2829325 B2		25-11-1998
			CA	2016790 A1		16-11-1990
			DE	69006639 D1		24-03-1994
			DE	69006639 T2		23-06-1994
			EP	0401560 A1		12-12-1990
			US	5208159 A		04-05-1993

WO 9413784	A	23-06-1994	US	5326561 A		05-07-1994
			EP	0684988 A1		06-12-1995
			US	5474926 A		12-12-1995
			WO	9413784 A1		23-06-1994
			US	5433947 A		18-07-1995

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference xxx	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CU01/00014	International filing date (day/month/year) 17/12/2001	Priority date (day/month/year) 03/01/2001
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01N83/00		
Applicant CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTEC... et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16/07/2002	Date of completion of this report 09.12.2002
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Boletti-Cremers, K Telephone No. +49 89 2399 8541 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/CU01/00014

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):
Description, pages:

1-26 as originally filed

Claims, No.:

1-22 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CU01/00014

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

POINT V.

Since none of the documents quoted in the ISR mentions a composition which encompasses both the ingredients which are at the basis of the claimed invention , namely the chitinolytic or chitinolytic activity -inducing agent and the sulfide or sulfide producing agent , the claimed matter on file can be regarded as novel .

Moreover , the inventiveness of the compositions on file can also be acknowledged on the basis of their synergism which was not predictable from the prior art quoted in the ISR.

Formal Point.

When the application will enter the regional proceedings , the contents of 2 documents . namely (1)- "Chitin and chitinases", vol.87 , 1999, pp. 171-184 and (2) - "Biology and fertility of soils , vol. 27, no.2, 1998 , pp. 149-154, should be mentioned and briefly discussed in the description .

PATENT COOPERATION TREATY

15

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

LOPEZ OCEJO, Omar
Ave. 31 entre 158 y 190
Cubanacan, Playa
Ciudad de La Habana 106000
Cuba

Date of mailing (day/month/year)

09 December 2002 (09.12.02)

Applicant's or agent's file reference

2001-0004

IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/CU01/00014

International filing date (day/month/year)

17 December 2001 (17.12.01)

Priority date (day/month/year)

03 January 2001 (03.01.01)

Applicant

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR

National : AU, BG, CA, CN, DE, GB, IL, JP, KP, KR, MN, NO, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE,

ES, FI, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,

MK, MW, MX, MZ, NZ, PH, PT, SD, SE, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

ALI SOLEIMAN

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PETITORIO PCT

2001-0004

Original (para PRESENTACION) - Impreso el 14.12.2001 04:43:01 PM

0	Para uso de la Oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No.	PCT/CUDI/00014
0-2	Fecha de presentación internacional	17 DE DICIEMBRE DE 2001 (17.12.2001)
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	OCEPI/PCT/RO/CU
0-4	Formulario - PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT-EASY Version 2.92 (actualizado el 01.03.2001)
0-5	Petición	
	El abajo firmante sujeta que la presente solicitud internacional sea procesada de acuerdo con el Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Cubana de la Propiedad Industrial (RO/CU)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandataria	2001-0004
I	Título de la invención	COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTI-PARASITARIAS.
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América
II-4	Nombre	CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA.
II-5	Dirección	Ave. 31 entre 158 y 190 Cubanacan, Playa 106000 Ciudad de La Habana Cuba
II-6	Estado de nacionalidad	CU
II-7	Estado de domicilio	CU
II-8	No. de teléfono	53 7 2718008
II-9	No. de telefax/móvil	53 7 2713364
II-10	Correo electrónico	paten@cigb.edu.cu

PETITORIO PCT

2001-0004

Original (para PRESENTACION) - Impreso el 14.12.2001 04:43:01 PM

III-1	Solicitante e/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-1-2	Solicitante para:	Estados Unidos de América únicamente
III-1-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	MENA CAMPOS, Jesus
III-1-5	Dirección:	Avenida Principal No. 17 Reperto Lenin 70500 Camaguey Cuba
III-1-6	Estado de nacionalidad	CU
III-1-7	Estado de domicilio	CU
III-2	Solicitante e/o inventor	
III-2-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-2-2	Solicitante para:	Estados Unidos de América únicamente
III-2-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	PIMENTEL VAZQUEZ, Eulogio
III-2-5	Dirección:	Jaime Noguera No. 233, entre: Fernando de Zayas y Gonzalo de Quezada La Vigia 70200 Camaguey Cuba
III-2-6	Estado de nacionalidad	CU
III-2-7	Estado de domicilio	CU
III-3	Solicitante e/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-3-2	Solicitante para:	Estados Unidos de América únicamente
III-3-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	HERNANDEZ GARCIA, Armando, Tomas
III-3-5	Dirección:	Edificio 16, Apto. 16 Reperto Puerto Principe 70800 Camaguey Cuba
III-3-6	Estado de nacionalidad	CU
III-3-7	Estado de domicilio	CU
III-4	Solicitante e/o inventor	
III-4-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-4-2	Solicitante para:	Estados Unidos de América únicamente
III-4-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	VELOZ GONZALES, Liuven
III-4-5	Dirección:	Las Palmas No. 4, entre: Ave. Ignacio Agramonte y Motreal La Zambrana 70300 Camaguey Cuba
III-4-6	Estado de nacionalidad	CU
III-4-7	Estado de domicilio	CU

PETITORIO PCT

2001-0004

Original (para PRESENTACION) - impreso el 14.12.2001 04:43 01 PM

III-5	Solicitante o inventor	
III-5-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-5-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-5-4	Nombre (APELLIDOS y Nombre)	MARIN BRUZOS, Marieta
III-5-5	Dirección:	Joaquin Aguero No. 203, entre: Julio Sanguily y Gonzalo de Quesada La Vigia 70200 Camaguey Cuba
III-5-6	Estado de nacionalidad	CU
III-5-7	Estado de domicilio	CU
III-6	Solicitante o inventor	
III-6-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-6-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-6-4	Nombre (APELLIDOS y Nombre)	COMPTÉ ALBERTO, Oscar
III-6-5	Dirección:	Calle: 3ra, No. 30, entre: A y B Comunidad Científica 70800 Camaguey Cuba
III-6-6	Estado de nacionalidad	CU
III-6-7	Estado de domicilio	CU
III-7	Solicitante o inventor	
III-7-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-7-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-7-4	Nombre (APELLIDOS y Nombre)	DOMINGO PUENTE, Marilyn
III-7-5	Dirección:	Calle: 3ra, No. 30, entre: A y B Comunidad Científica 70800 Camaguey Cuba
III-7-6	Estado de nacionalidad	CU
III-7-7	Estado de domicilio	CU
III-8	Solicitante o inventor	
III-8-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-8-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-8-4	Nombre (APELLIDOS y Nombre)	LEON BARRERAS, Licette
III-8-5	Dirección:	Calle: 2da, No. 5, entre: B y C Comunidad Científica 70800 Camaguey Cuba
III-8-6	Estado de nacionalidad	CU
III-8-7	Estado de domicilio	CU

PETITORIO PCT

2001-0004

Original (para PRESENTACION) - Impreso el 14.12.2001 04:43:01 PM

III-9	Solicitante e/o inventor	
III-9-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-9-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-9-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	PUJOL FERRERO, Merardo
III-9-5	Dirección:	Calle: 186, entre: 31 y 33, No. 3115, Apto. 6C Playa 12100 Ciudad Habana Cuba
III-9-6	Estado de nacionalidad	CU
III-9-7	Estado de domicilio	CU
III-10	Solicitante e/o inventor	
III-10-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-10-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-10-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	MENCHO PONCE, Juan, Diego
III-10-5	Dirección:	Calle: 4ta, No. 12, entre: A y 1ra Reperto Jose Marti 70600 Camaguey Cuba
III-10-6	Estado de nacionalidad	CU
III-10-7	Estado de domicilio	CU
III-11	Solicitante e/o inventor	
III-11-1	Esta persona es	solicitante e inventor
III-11-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-11-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	BORROTO NORDELO, Carlos
III-11-5	Dirección:	Ave: 31, entre: 182 y 184, No. 18207, Apto. 2 Playa 12100 Ciudad Habana Cuba
III-11-6	Estado de nacionalidad	CU
III-11-7	Estado de domicilio	CU
IV-1	Mandatario o representante común: o dirección para la correspondencia La persona identificada a continuación se designa para actuar en nombre del/los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:	mandatario
IV-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	LOPEZ OCEJO, Omar
IV-1-2	Dirección:	Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacan, Playa, 106000 Ciudad de La Habana Cuba
IV-1-3	No. de teléfono:	53 7 2718008
IV-1-4	No. de telefax:	53 7 2713364
IV-1-5	Correo electrónico:	paten@cigb.edu.cu

V	Designación de Estados	
V-1	Patente regional (otros tipos de protección o de tramitación, si es probable hacerlo, están indicados entre corchetes a continuación de la(s) designación(es) correspondiente(s))	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW y cualquier otro Estado contratante del Protocolo de Harare y del PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM y cualquier otro Estado contratante del Convenio sobre la Patente Euroasiática y del PCT EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR y cualquier otro Estado contratante del Convenio sobre la Patente Europea y del PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG y cualquier otro Estado que sea Estado miembro de la OAPI y que sea un Estado contratante del PCT
V-2	Patente nacional (otros tipos de protección o de tramitación, si es probable hacerlo, están indicados entre corchetes a continuación de la(s) designación(es) correspondiente(s))	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-5	Declaración de designación precautoria Además de las designaciones efectuadas en los puntos V-1, V-2 y V-3, el solicitante efectúa también, en virtud de la Regla 4.9.b), todas las designaciones que estén permitidas con arreglo al PCT, salvo la(s) designación(es) del(de los) Estado(s) incluido(s) en el punto V-6 a continuación. El solicitante declara que esas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación que no se confirme antes de que expiren los 15 meses a partir de la fecha prioritaria se considerará retirada por el solicitante al expirar dicho plazo.	
V-6	Exclusión de las designaciones precautorias	NINGUNA
VI-1	Reivindicación de prioridad de una solicitud nacional anterior	
VI-1-1	Fecha de depósito	03 Enero 2001 (03.01.2001)
VI-1-2	Número	20010004
VI-1-3	País	CU
VI-2	Petición de documento de prioridad	
	Se ruega a la Oficina receptora que prepare y envíe a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) identificada(s) como prioritaria(s)	VI-1

PET/0001/0001.1

25

8/7

PETITORIO PCT

2001-0004

Original (para PRESENTACION) - Impreso el 14.12.2001 04:43:01 PM

VII-1	Administración encargada de la búsqueda internacional elegida	Oficina Europea de Patentes (OEP) (ISA/EP)	
VIII	Declaraciones	Número de declaraciones	
VIII-1	Declaración sobre la identidad del inventor	-	
VIII-2	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para obtener y que le sea concedida una patente	-	
VIII-3	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior	-	
VIII-4	Declaración sobre la calidad de inventor (sólo para la designación de los Estados Unidos de América)	-	
VIII-5	Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad	-	
IX	Lista de verificación	número de hojas	archivo(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-1	Petitorio (incluidas las hojas de declaración)	7	-
IX-2	Descripción	26	-
IX-3	Reivindicaciones	2	-
IX-4	Resumen	1	EZABST00.TXT
IX-5	Dibujos	0	-
IX-7	TOTAL	36	
	Elementos de acompañamiento	documento(s) en papel adjunto(s)	archivo(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-8	Hoja de cálculo de costos	✓	-
IX-17	Disquete PCT-EAS	-	Disquete
IX-19	Figura de los dibujos que debe acompañar al resumen		
IX-20	Idioma de presentación de la solicitud internacional	español	
X-1	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-1-1	Nombre (APELLIDOS y Nombre)	LOPEZ OCHOA, Omar	

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA UNICAMENTE

10-1	Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	17 DE DICIEMBRE DE 2001 (17.12.2001)
10-2	Dibujos:	
10-2-1	Recibido	
10-2-2	No recibido	
10-3	Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional	

PETITORIO PCT

2001-0004

Original (para PRESENTACION) - impreso el 14.12.2001 04:43:01 PM

10-4	Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones solicitadas según el Artículo 11(2) del PCT	
10-5	Administración encargada de la búsqueda internacional	ISA/EP
10-6	Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda	

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL UNICAMENTE

11-1	Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional	
------	---	--

RESUMEN

COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTIPARASITARIAS.

5 Composiciones pesticidas y antiparasitarias para el control de plagas,
 enfermedades y parásitos que atacan a las plantas y los animales. Las
 composiciones incluyen al menos un agente quitinolítico o un agente inductor
 de la actividad quitinolítica, y sulfuro o un agente productor de sulfuro
10 obtenido de microorganismos o compuestos químicos, en los cuales el agente
 quitinolítico o el agente inductor de la actividad quitinolítica y el sulfuro o un
 agente productor de sulfuro que se obtiene de microorganismos o
 compuestos químicos, se aplican de manera concurrente a un rango
 significativamente menor que cualquiera de los compuestos señalados
15 anteriormente, cuando se aplican individualmente para lograr un control
 efectivo.

20

25

30

MEMORIA DESCRIPTIVA

COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTIPARASITARIAS.

- 5 Esta invención abarca algunas composiciones sinérgicas, de tipo pesticidas y antiparasitarias, que son útiles para el control de los fitonematodos y zoonematodos parásitos, para el control de enfermedades (fungosas y bacterianas) y para el control de trematodos parásitos (*Fasciola hepatica*).
- 10 Los nematodos son los causantes de los mayores daños a la agricultura en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo (Nickle W. R. (Editor). 1991. Manual of Agricultural Nematology, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. Pub. 1035 pp). Solamente el plátano presenta alrededor del 20% de las pérdidas de la producción mundial ocasionadas por los nematodos, lo cual representa \$ 178 millones anualmente (Sasser J.N. and
- 15 Freckman D.W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. Vistas on nematology: a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists / edited by Joseph A. Veech and Donald W. Dickson. p. 7-14). *Radopholus similis* afecta significativamente las plantaciones de banano y plátano.
- 20 *Meloidogyne spp*, es el nematodo parásito de plantas más significativo; su actividad provoca pérdidas entre el 11% y el 25% de los cultivos en prácticamente todas las regiones tropicales (Sasser J. N. 1979. *Root-knot nematodes*. Ed. F. Lamberti & C.E. Taylor, Academic Press, London, p 359). Como consecuencia, existe una gran necesidad de controlar estos parásitos,
- 25 lo cual se ha intentado lograr por medio de la aplicación de los nematicidas químicos. Tales compuestos pueden ser altamente efectivos; sin embargo, muchos de ellos representan un riesgo al ambiente por su alta toxicidad, y en algunos casos las autoridades reguladoras han limitado la cantidad y/o la frecuencia de utilización de tales compuestos, por lo tanto se compromete su
- 30 efectividad nematicida.
- Como resultado, se han realizado esfuerzos para identificar los medios efectivos de eliminar el daño que ocasionan los nematodos, que buscan evitar o reducir la utilización de los pesticidas químicos. Uno de los enfoques es el

empleo, en lugar de los nematicidas químicos, de los nematicidas de origen biológico con modos específicos de acción y perfiles toxicológicos relativamente más seguros. Ejemplos de tales nematicidas alternativos incluyen al ABG-9008, un metabolito del hongo *Myrothecium verrucaria*, publicado en la patente US 5,051,255 (Abercrombie K. D. 1994. Synergistic pesticidal compositions. Patent US5346698. Mycogen Corporation. Sept. 13) y una combinación de avermectinas (o compuestos relacionados, tales como las milbecinas) con ácidos grasos (Abercrombie, patente US 5,346,698). También Warrior Prem y col., en la solicitud de patente No. WO9634529, Synergistic nematocidal compositions, publica un método que incluye la administración concurrente para eliminar los daños que ocasionan los nematodos a las plantas, al sitio, suelo o semillas que necesiten el tratamiento, de (a) un metabolito del hongo *Myrothecium verrucaria* y (b) un pesticida químico, así como las composiciones nematicidas sinérgicas útiles en este caso (Warrior P., Heiman D. F. and Rehberger Linda A. 1996. Synergistic nematocidal compositions. Abbott laboratories. WO9634529, 1996-11-07).

Otro enfoque consiste en combinar esporas de *Pasteuria penetrans*, un parásito bacteriano de los nematodos, con nematicidas organofosforados (Nordmeyer D. 1987. Synergistic nematocidal compositions of *Pasteuria penetrans* spores and an organophosphorus nematocide. 1987. CIBA-GEIGY AG Patent AU 06057386A1. 01/29/1987).

Los hongos quitinolíticos y las bacterias, que comparten el hábitat de los nematodos, pueden mantener un cierto equilibrio biológico y de alguna manera limitar la proliferación de los nematodos. Se han reivindicado dos cepas de bacterias quitinolíticas (Toda T. and Matsuda H. 1993. Antibacterial, anti-nematode and/or plant-cell activating composition, and chitinolytic microorganisms for producing the same. Toda Biosystem Laboratory, Japan. Patent US5208159, 05/04/1993), como antibacteriano, antinematodo, y/o composición activadora planta-célula.

Existen algunos ejemplos del efecto quitinolítico sobre los nematodos. Algunos de los más representativos son las cepas de nuevas bacterias descritas que se crean por la introducción de ADN que codifica para la

producción de quitinasa, una enzima que puede degradar la quitina presente en los hongos y los nematodos (Suslow T. and Jones D. G. 1994. Novel chitinase-producing bacteria and plants. DNA Plant Technology Corporation, US04940840, 07/10/1990). Las cepas son útiles en la producción de quitinasa con el objetivo de inhibir los patógenos de las plantas. También se describen las plantas novedales resistentes a los patógenos, que son el resultado de la introducción de ADN que codifica para la producción de quitinasa.

Se han reportado otros ejemplos de microorganismos que reducen la población de nematodos que parasitan las plantas en condiciones naturales.

Rodríguez-Kabana (Rodríguez-Kabana R., Jordan J. W., Hollis J. P. 1965. Nematodes: Biological control in rice fields- role of hydrogen sulfide. *Science*. 148: 524-26) y Hollis (Hollis, J. P., y R. Rodríguez-Kábana. 1966. Rapid kill of nematodes in flooded soil. *Phytopathology* 56, pp 1015-19) observaron correspondencia entre la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans*, la producción de sulfuro de hidrógeno y los nematodos que parasitan las plantas, cuya población disminuyó en las plantaciones de arroz de Luisiana. Los sulfuros son inhibidores de la cadena de transporte de electrones del proceso de respiración del organismo aeróbico, al igual que otros metabolitos producidos por algunas bacterias del suelo (Rodríguez-Kábana, R. 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *NEMATROPICA*, 21(1), pp 111-22).

PAECILTM, conocido también como BIOACT o Nemachek, es un nematicida biológico que contiene una cepa patentada del hongo *Paecilomyces lilacinus* en un concentrado de esporas seco y estable para los tratamientos del suelo y las semillas. Esta especie de hongo se halla comúnmente en todos los suelos del mundo. La cepa patentada que se utilizó como ingrediente activo de PAECILTM tiene una efectividad especial contra los nematodos que parasitan a las plantas. En la actualidad la Autoridad Nacional de Registro de Australia evalúa el producto como pesticida (Holland, R. PAECILTM 1998. <http://www.ticorp.com.au/article1.htm>).

Los ejemplos mencionados anteriormente no pueden resolver los problemas con los helmintos parásitos. Permanece, por lo tanto, la necesidad de poner

en práctica medios mejorados para el control de parásitos, con el propósito de sustituir los antiparasitarios y pesticidas químicos.

Un grupo importante de parásitos, que provoca afectaciones económicas considerables en la producción animal, y además incide en la salud humana, son los trematodos. Entre los trematodos de mayor importancia económica, la *Fasciola hepatica* que fue el primer trematodo parásito conocido, parasita al hombre, habitando en los conducto biliares (Saleha A. 1991. Liver fluke disease (fasciolosis) epidemiology, economic impact and public health significance. Southeast Asian J. Trop. Med. Public health 22 supp 1dic. P 361-4). Causa trastornos digestivos que consisten en aseptias gástricas, trastornos en la motilidad del colon, dolores a nivel del hígado y de la vesícula biliar, cólicos hepáticos y fiebres. Puede presentar localizaciones aberrantes como en el pulmón, vena hepática, ojos, cerebro y otros tejidos.

Los helmintos que parasitan a los animales son plagas significativas con relación a las ovejas y el ganado vacuno. La resistencia a los antielmínticos es amplia, particularmente en las poblaciones de nematodos parásitos de los pequeños rumiantes.

Se han desarrollado nuevas técnicas suplementarias, y otras están en investigación. El hongo *Duddingtonia flagrans*, depredador que forma redes, produce esporas inmóviles de paredes anchas, clamidoesporas, que pueden sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal de los vacunos, los equinos, ovejas y cerdos (Larsen M. 1999. Biological control of helminths. *Int J Parasitol.* Jan; 29(1): 139-46, and Larsen, M. 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 120, S120-S121).

Los trabajos con *D. flagrans* en las condiciones climáticas danesas; así como en Francia, Australia, EE.UU y México han confirmado el fuerte potencial para el control biológico que tiene este hongo.

En varios países se ha reportado resistencia de los parásitos a los productos antihelmínticos (Eddi, C., Caracostantogolo, J., Peya, M., Schapiro, J., Marangunich, L., Waller, P.J. & Hansen, J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Argentina. *Vet. Parasitol.*, 62: 189-197, van Wyk J.A., Bath G.F. and

Malan F.S. 2000. The need for alternative methods to control nematode parasites of ruminant livestock in South Africa. World Animal Review. <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frq/feedback/war/contents.htm>, Echevarria F.,

Borba M.F.S., Pinheiro A.C., Waller P.J. & Hansen J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.*, 62: 199-206, Maciel S., Gimenez A.M., Gaona, C., Waller P.J. & Hansen J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Paraguay. *Vet. Parasitol.*, 62: 207-212, Nari A., Salles J., Gil A., Waller P.J. & Hansen J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 62: 213-222) , como por ejemplo *Haemonchus contortus*.

Uno de los nematodos que mayores daños causa en la ganadería es el *Dictyocaulus viviparus*, un parásito que alcanza la madurez sexual y se localiza en estado adulto en el pulmón del ganado vacuno, sobre todo, en los animales jóvenes. La enfermedad que produce se denomina bronquitis verminosa o dictyocaulosis bovina y la infestación se produce por ingerir las larvas infestantes, presentes en los pastos. El tratamiento de esta parasitosis se lleva a cabo con el uso de antihelmínticos (Borgsteede F.H.M, de Leeuw W.A. & Burg W.P.J. 1988. A comparison of the efficacy of four different long-acting boluses to prevent infections with *Dictyocaulus viviparus* in calves. The Veterinary Quarterly, Vol 10, No. 3), pero los mismos presentan como principales inconvenientes, en primer lugar, la posibilidad de desarrollar cepas resistentes a dichos fármacos, que hacen difícil el tratamiento posterior de los animales infestados, el elevado costo de estos productos que lo hacen limitado para los países de mayores recursos y por último, la incidencia dañina desde el punto de vista ecológico que acarrearán estos preparados.

El problema internacional con relación a la resistencia a los antihelmínticos comprende el hecho de que, mientras continúa siendo la quimioterapia la piedra angular en el control parasitario (Soll, M.D. 1997. The future of anthelmintic therapy from an industry perspective. In J.A. van Wyk & P.C. van Schalkwyk, eds. *Managing anthelmintic resistance in endoparasites*, p. 1-5. Proceedings of the 16th International Conference of the World Association for

the Advancement of Veterinary Parasitology, Sun City, South Africa, 10-15 August 1997), parece haber una pequeña esperanza de que cualquier antihelmíntico nuevo y químicamente no relacionado aparecerá al menos en la próxima década.

5 En el caso del control de bacterias y hongos patógenos, existen numerosos reportes sobre productos biológicos cuya acción se basa esencialmente en el fenómeno del antagonismo, y un sinnúmero de ellos está comercialmente disponible. Entre ellos está el Conquer (*Pseudomonas fluorescens* que antagoniza a la *Pseudomonas tolaasii*), el Galltrol-A (*Agrobacterium radiobacter* Strain 84, que controla al *Agrobacterium tumefaciens*), el Nogall (*Agrobacterium radiobacter*, que controla al *Agrobacterium tumefaciens*), el Bio-Fungus (*Trichoderma* spp que controla a los siguientes hongos *Phytophthora*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium*, *Verticillium*), el Aspire (*Candida oleophila* I-182 que controla a *Botrytis* spp. y *Penicillium* spp), etcétera.

15 Dentro de los microorganismos biofungicidas de mayor espectro de acción está el hongo *Trichoderma* spp (Chet I, Inbar J. 1994 Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*;48(1):37-43), siendo ampliamente discutido el mecanismo de acción donde intervienen quitinasas que degradan la pared celular del hongo hospedero. Por otro lado, existen evidencias experimentales de la acción quitinolítica de hongos y bacterias empleados como biocontroladores de enfermedades fungosas (Herrera-Estrella A, Chet I. 1999. Chitinases in biological control. *EXS*;87:171-84).

25 Sin embargo no es éste el único modo de acción de las bacterias sobre los hongos fitopatógenos, existen otras formas de control basados en la producción de metabolitos secundarios, como el cianuro de hidrógeno, que en el caso particular de la cepa CHA0 de *P. fluorescens* logra inhibir a los hongos patógenos de las raíces (Blumer C. and Haas D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol* Mar;173(3):170-7). Cuando se analizan los tipos de interacción bacteria-bacteria, tenemos que estas pueden ser de tres tipos fundamentales: antibiosis, competición por el substrato, y parasitismo (Ongena M. 1998. Conference on biological controls. Training program in the area of

biotechnology applied to agriculture and bioindustry. Gembloux, Belgium). En el caso de la antibiosis, es conocida la liberación de antibióticos por parte de algunas cepas bacterianas con el fin de inhibir la acción de otras bacterias circundantes, fenómeno que puede ser aprovechado para el control biológico de especies bacterianas patógenas. De manera análoga la competencia por el sustrato constituye también un mecanismo que puede ser utilizado en función de lograr un control biológico adecuado, al sintetizarse por parte del microorganismo biocontrolador sideróforos o agentes quelantes de microelementos, lo cual provoca un déficit del microelemento, fundamentalmente de hierro en el medio, inhibiendo el crecimiento del patógeno en cuestión.

Descripción detallada de la Invención

La invención se relaciona con una composición, que contiene al menos un agente quitinolítico o un agente inductor de la actividad quitinolítica, y sulfuro o un agente productor de sulfuro obtenido de microorganismos o compuestos químicos, en los cuales el agente quitinolítico o un agente inductor de la actividad quitinolítica, y el sulfuro o un agente productor de sulfuro obtenidos de microorganismos o compuestos químicos, se aplican de manera concurrente a un rango sustancialmente menor que cuando se usa cualesquiera de los componentes por separado para lograr un control efectivo sobre helmintos y agentes causales de enfermedades bacterianas y fungosas. La invención se relaciona también con el empleo de tales composiciones y/o la administración concurrente de los compuestos anteriormente mencionados a partir de fuentes diferentes, tales como productos biológicos y químicos para el control efectivo de un amplio rango de nematodos parásitos de las plantas (*Meloidogyne spp*, *Angina spp*, *Ditylenchus spp*, *Pratylenchus spp*, *Heterodera spp*, *Aphelenchus spp*, *Radopholus spp*, *Xiphinema spp*, *Rotylenchulus spp*), de nematodos y trematodos parásitos de los animales (*Haemonchus spp*, *Trichostrongylus spp*, *Dictyocaulus spp*. y *Fasciola hepatica*), de agentes bacterianos causantes de enfermedades (*Erwinia chrysanthemi*, *Burkholderia glumae*) y

agentes fúngicos causantes de enfermedades (*Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina*, *Sarocladium orizae*).

Los efectos sobre helmintos, bacterias y hongos de un agente quitinolítico o un agente inductor de la actividad quitinolítica y sulfuro o un agente productor de sulfuros, se han demostrado y/o reportado previamente. Sin embargo, en esta invención se demuestra por primera vez, un efecto sinérgico cuando ambos componentes se aplican de manera concurrente.

Cuando el agente quitinolítico o un agente inductor de la actividad quitinolítica y el sulfuro o un agente productor de sulfuros, se aplican individualmente, los efectos siempre son menores que cuando se administran simultáneamente ambos agentes.

Cuando se aplica como una composición de la presente invención, el agente quitinolítico o el agente inductor de la actividad quitinolítica y el sulfuro o el agente productor de sulfuros, se pueden mezclar en cualquier forma apropiada, tal como, una solución, suspensión, emulsión, polvo o mezcla granular, y se le aplica a la planta o al suelo como un fertilizante, suelo pre-empacado, dispositivo de cubierta de semilla, un polvo, un granulado, un nebulizador, una suspensión, un líquido, o cualquiera de las formas indicadas, en una forma encapsulada, para el control de helmintos parásitos, y enfermedades fungosas y bacterianas.

Los rangos óptimos de aplicación del agente quitinolítico o el agente inductor de la actividad quitinolítica y el sulfuro o un agente productor de sulfuros para el caso de un nematodo, trematodo, bacteria u hongo en particular, y para el caso de condiciones específicas, son determinados mediante estudios experimentales de rangos, realizados *in vitro*, en invernadero o en condiciones de campo.

Según los resultados descritos en la presente invención, se alcanza un control significativo de los helmintos, bacterias y hongos al utilizar una mezcla de 1) un microorganismo productor de quitinasa entre 10^7 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y 10^{12} UFC de un microorganismo dado por gramo de composición o quitina en un rango entre 1% y 50% de la composición; y 2) un microorganismo productor de sulfuro entre 10^7 UFC y 10^{12} UFC de un microorganismo dado por gramo de composición, o cualquier agente químico

que produzca sulfuro, donde el sulfuro varíe entre 0,1 mg/minuto y 1,0 mg/minuto por gramo de composición.

Cualquier composición que comprenda un microorganismo, entre 10^7 UFC y 10^{12} UFC por gramo de composición, que produzca agentes quitinolíticos y sulfuro concurrentemente, es apropiado para el control de helmintos, bacterias y hongos.

Las composiciones anteriores comprenden las combinaciones de los siguientes agentes en las proporciones antes mencionadas:

1. Quitinasa y Na_2S .
2. Quitinasa y FeS .
3. Quitinasa y el microorganismo *Desulfovibrio desulfuricans*.
4. Quitina y Na_2S .
5. Quitina y FeS .
6. Quitina y el microorganismo *Desulfovibrio desulfuricans*.
7. Microorganismo productor concurrente de actividad quitinolítica y H_2S .

Las composiciones anteriores son efectivas contra un amplio rango de nematodos parásitos de las plantas, incluyendo (no limitando) a especies de *Meloidogyne*, tal como *M. incógnita*; especies de *Angina*, tal como *A. tritici*; especies de *Ditylencus*, tal como *D. dipsaci*; especies de *Pratylenchus*, tal como *P. coffee*; especies de *Heterodera*, tal como *H. glycines*; especies de *Aphelenchus*, tal como *A. avenae*; especies de *Radopholus*, tal como *R. similis*; especies de *Xiphinema*, tal como *X. index*; especies de *Rotylenchulus*, tal como *R. reniformis*; y nematodos que parasitan animales tales como: *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp., *Nematodirus* spp., *Cooperia* spp., *Ascaris* spp., *Bunostomum* spp., *Oesophagostomum* spp., *Chabertia* spp., *Trichuris* spp., *Strongylus* spp., *Trichonema* spp., *Dictyocaulus* spp., *Capillaria* spp., *Heterakis* spp., *Toxocara* spp., *Ascaridia* spp., *Oxyuris* spp., *Ancylostoma* spp., *Uncinaria* spp., *Toxascaris* spp. y *Parascaris* spp; y trematodos que parasitan animales tales como la *Fasciola hepática*; y bacterias patógenas tales como *Erwinia chrysanthemi*, *Burkholderia glumae*, *Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina*, *Sarocladium orizae*, y hongos patógenos tales como *Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina*, *Sarocladium orizae*.

EJEMPLOS DE REALIZACION:

Ejemplo 1: Evaluación *in vitro* del efecto nematicida del Sulfuro de hidrógeno proveniente de fuentes químicas y una enzima quitinolítica.

Se utilizaron huevos de los zoonematodos, *Haemonchus sp.*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Dictyocaulus viviparus*; y larvas (juveniles 2) del fitonematodo parásito *Meloidogyne incognita*.

Se efectuaron colectas del nematodo *Haemonchus sp* y de *Trichostrongylus colubriformis* a partir del abomaso de un ovino (camero) y de un bovino (vacuno) respectivamente. Las hembras de los nematodos adultos fueron lavadas en solución fisiológica y tratadas con "Hibitane" (Acetato de Chlorhexidina) al 0,5% durante 1 minuto, este proceso se desarrolló a una temperatura de 37°C. Alrededor de 100 individuos previamente desinfectados, se colocaron en un elenmeyer conteniendo 50 ml de una solución del medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril, éstos se dejaron realizando las puestas durante toda la noche (8 a 10 horas).

Las colectas del nematodo *D. viviparus* se realizaron a partir de pulmones infestados de un bovino (vacuno), sacrificado previamente. Se procedió de igual forma que para *Haemonchus sp.* y *T. colubriformis*, sólo que en el caso de las hembras se dejaron realizando las puestas durante un período de 2 a 3 horas.

A partir de este momento toda la manipulación se realizó bajo condiciones asépticas dentro de un flujo laminar vertical y empleando placas de cultivo de tejidos de 24 huecos. El volumen total del medio conteniendo las hembras y los huevos, se filtró por un tamiz de una malla de 60 µm. Los huevos de los nematodos se quedaron retenidos sobre la malla de 30 µm de un segundo tamiz. Este se introdujo en una solución de Hibitane al 0,5 % durante 3 minutos y seguidamente se efectuaron 3 lavados con medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril.

Los huevos una vez desinfectados, se extrajeron del tamiz, resuspendiéndolos cuidadosamente con una solución del medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril. Se comprobó el resultado final de esta distribución realizando el conteo y el registro de los huevos en cada pocillo

con el empleo de un microscopio invertido OLYMPUS, también se realizaron observaciones sobre la uniformidad del estadio evolutivo de esta fase.

Los huevos de *Haemonchus sp.* y *T. colubriformis* eclosionan entre las 24 y 48 horas de incubados a 28°C, mientras que los de *D. viviparus* lo hacen antes de las 24 horas. Se considera como una buena preparación de las muestras cuando en los controles sin tratamiento alguno se logró más de un 60 % de eclosión de los huevos en los tiempos antes pronosticados para cada especie.

Se efectuó la extracción de masas de huevos del nematodo *Meloidogyne incognita* a partir de raíces de plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*), previamente infestadas y cultivadas en invernaderos. Para esta operación se necesitó la utilización de un microscopio estereoscopio y agujas con la punta debidamente modificada. Las masas se colocaron en agua destilada estéril en placas Petri a 28°C, en una cantidad de alrededor de 50 masas. Diariamente se realizaron observaciones para comprobar la eclosión de los huevos, alrededor de las 72 horas se dispuso de suficientes larvas para comenzar el proceso de colecta y desinfección.

El volumen total del agua conteniendo las masas de huevos y las larvas, se filtró por un tamiz de una malla de 60 µm. A partir de este momento toda la manipulación se realizó bajo condiciones asépticas dentro de un flujo laminar vertical y empleando placas de cultivo de tejidos de 24 huecos. Los huevos desprendidos de las masas que no llegaron a eclosionar, se quedaron retenidos sobre la malla de un tamiz de 30 µm, y las larvas son colectadas sobre un último tamiz de una malla de 5 µm éste se introdujo en una solución de Hibitane al 0,5 % durante 3 minutos y seguidamente se efectuaron 3 lavados con medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril.

Las larvas de *Meloidogyne incognita* una vez desinfectadas, se extrajeron del tamiz, resuspendiéndolas cuidadosamente con una solución del medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril. Se comprobó el resultado final de esta extracción y desinfección realizando el conteo y el registro de las larvas vivas con el empleo de un microscopio invertido OLYMPUS.

Los huevos y las larvas de los nematodos fueron colocados en cantidad de 100 individuos aproximadamente en 2 ml de medio LB diluido 10 veces. Este

volumen se introdujo en válvulas de seguridad que permiten el paso del aire a través del líquido y por consiguiente los gases entran en contacto con los huevos y larvas. Cada válvula constituyó una réplica en cada uno de los tratamientos.

5 El sulfuro de hidrógeno se obtuvo por reacción con ácido clorhídrico de dos sales de sulfuro (Na_2S y FeS) y a partir de la fermentación anaerobia de la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* subs. *desulfuricans* ATCC 27774 (aislada del rumen de un ovino). La enzima quitinolítica utilizada fue quitinasa SIGMA C1650 obtenida a partir de la bacteria *Serratia marcescens*.

10 Los huevos y larvas de los nematodos en estudio se sometieron durante 24 horas a los siguientes tratamientos:

1. Tratamiento Control: sin aplicar quitinasa y circulando aire a través de la válvula.

2. Tratamiento quitinasa: quitinasa a razón de 0,2 unidades por réplica.

15 3. Tratamiento sulfuro: sulfuro de hidrógeno a partir de Na_2S con un flujo de 0,2 a 0,3 mg/minuto.

4. Tratamiento sulfuro: sulfuro de hidrógeno a partir de FeS con un flujo de 0,2 a 0,3 mg/minuto.

20 5. Tratamiento sulfuro: sulfuro de hidrógeno a partir de *Desulfovibrio desulfuricans* con un flujo de 0,2 a 0,3 mg/minuto.

6. Tratamiento combinado: aplicación simultánea de los tratamientos 2 y 3.

7. Tratamiento combinado: aplicación simultánea de los tratamientos 2 y 4.

8. Tratamiento combinado: aplicación simultánea de los tratamientos 2 y 5.

Cada uno de los tratamientos anteriores constó de 4 réplicas.

25 A las 24 horas de iniciado el experimento se contaron las cantidades de larvas eclosionadas (*Haemonchus* sp., *T. colubriformis* y *D. viviparus*) y el número de larvas vivas (*Meloidogyne incognita*) en todos los tratamientos.

30 Los resultados de la efectividad (E) se muestran en la TABLA 1. Este valor es la media de las 4 réplicas de cada tratamiento. A los resultados obtenidos en cada especie de nematodo en estudio, por separado, se le aplicó análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de Duncan (Lerch G. 1977. La Experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. 1ª edición, p.p. 203 - 308, Editorial Científico-Técnica, La Habana), esto también se refleja en la

TABLA 1; las letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos.

TABLA 1 Efectividad de los tratamientos (E)*

	Efectividad de los tratamientos (E)*							
	1. Ec Control	2. Eq	3. Esn	4. Esf	5. Esd	6. Eqs _n (2+3)	7. Eqs _f (2+4)	8. Eqs _d (2+5)
<i>Haemonchus</i>	0.00 (a)	0.32 (b)	0.41 (c)	0.40 (c)	0.37 (b, c)	0.86 (d)	0.85 (d)	0.82 (d)
<i>Trichostrongilus</i>	0.00 (a ₁)	0.37 (b ₁)	0.40 (b ₁ , c ₁)	0.39 (b ₁ , c ₁)	0.38 (b ₁ , c ₁)	0.88 (d ₁)	0.88 (d ₁)	0.83 (d ₁)
<i>Dictyocaulus</i>	0.00 (a ₂)	0.35 (b ₂)	0.44 (c ₂)	0.42 (c ₂)	0.40 (b ₂ , c ₂)	0.91 (d ₂)	0.90 (d ₂)	0.86 (d ₂)
<i>Meloidogyne</i>	0.00 (a ₃)	0.39 (b ₃)	0.51 (c ₃)	0.52 (c ₃)	0.47 (c ₃)	0.95 (d ₃)	0.93 (d ₃)	0.90 (d ₃)

5 *La efectividad (E) es el resultado de sustraer a 1 el valor de la frecuencia relativa (Fr) de eclosión o de larvas vivas, según sea el caso. La Fr es el cociente entre el número de larvas eclosionadas o larvas vivas de cada tratamiento (Ntto) y el número de larvas eclosionadas o larvas vivas del tratamiento 1 (Nc):

10

$E = 1 - Fr$, donde $Fr = Ntto/Nc$, por lo que $E = 1 - Ntto/Nc$

Para determinar el efecto sinérgico en los tratamientos 6, 7 y 8, se asumió que los eventos (efecto nematocida) que en ellos ocurren, no son excluyentes.

15 Para este tipo de análisis la efectividad esperada (EE) debe ser igual a la suma de los efectos individuales (EI) que están dados por la efectividad atribuida a la acción de la quitinasa (Eq) y la efectividad atribuida a la acción del sulfuro de hidrógeno (Esn, Esf y Esd), menos el efecto intersección (ei) (Sigarroa, A. 1985. Biometría y diseño experimental. 1ra. Parte. Minist. Educación Sup. Ed. Pueblo y Educación. Cap. 3. pag 69-107).

20

$EE = Eq + Es - ei$, donde $ei = Eq \times Es$

Si la efectividad experimental (E) en los tratamientos donde se combinan dos agentes nematocidas (tratamientos 6, 7 y 8) es mayor que la efectividad esperada (EE) para esos tratamientos, puede asegurarse que existe sinergismo en cuanto a la actividad nematocida del agente quitinolítico (quitinasa) y el sulfuro de hidrógeno al aplicarse ambos de forma concurrente en el mismo tratamiento. En la TABLA 2 se resumen los valores obtenidos.

TABLA 2 Efectividad experimental (E) y esperada (EE)

	Efectividad experimental (E) y esperada (EE)					
	Tratamiento 6		Tratamiento 7		Tratamiento 8	
	E	EE	E	EE	E	EE
<i>Haemonchus</i>	0.86	0.60	0.85	0.59	0.82	0.57
<i>Trichostrongilus</i>	0.88	0.62	0.88	0.62	0.83	0.61
<i>Dictyocaulus</i>	0.91	0.64	0.90	0.62	0.86	0.61
<i>Meloidogyne</i>	0.95	0.70	0.93	0.71	0.90	0.68

En los tres tratamientos donde se combinan quitinasa y sulfuro de hidrógeno simultáneamente, fue mayor la efectividad experimental (E) que la efectividad esperada (EE) para los cuatro nematodos en estudio, con ello se demuestra estadísticamente la existencia de sinergismo entre ambos compuestos (cuando actúan de forma concurrente) en cuanto a su actividad nematocida. No se observaron diferencias significativas en cuanto al origen de los sulfuros y su efecto nematocida (TABLA 1).

Ejemplo 2: Evaluación en invernadero del efecto nematocida de un agente inductor de la actividad quitinolítica (quitina) y un microorganismo productor de sulfuro de hidrógeno (*Desulfovibrio desulfuricans* subps. *desulfuricans* ATCC 29577 aislado de suelo).

Se seleccionó un suelo pardo de pH neutro, se secó y se pasó por una malla de 0.5 cm para eliminar partículas indeseables; se esterilizó en autoclave vertical durante 1 hora 120°C y 1 atmósfera (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd.Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA); se dejó secar a

temperatura ambiente durante 3 o 4 días, para posteriormente efectuar las mezclas previstas en los tratamientos con arena de río, humus de lombriz y quitina (ICN número de catálogo 101334).

Se procedió a llenar 20 macetas (de 15 cm de diámetro x 13 cm de profundidad y 1 litro de capacidad) con las proporciones establecidas en los siguientes tratamientos:

1. Tratamiento Control: suelo 70%, arena de río 25% y humus 5%.
2. Tratamiento quitina: suelo 70%, arena de río 25%, humus 4% y quitina 1%.
3. Tratamiento Microorganismo: suelo 70%, arena de río 25%, humus 5% y *D. desulfuricans*, aplicado a una concentración de 10^{10} UFC/maceta.
4. Tratamiento combinado: suelo 70%, arena de río 25%, humus 4%, quitina 1% y *D. desulfuricans*, aplicado a una concentración de 10^{10} UFC/maceta.

Cada tratamiento se realizó con 5 réplicas (macetas).

En los tratamientos 2 y 4 se hizo una prmezcla del humus con quitina en proporción de 4:1, para posteriormente efectuar la mezcla final con el suelo y la arena. En los tratamientos 3 y 4, la aplicación de *D. desulfuricans* se realizó en 100 ml de agua desionizada por maceta, estos volúmenes fueron aplicados uniformemente en el primer riego que se realizó.

Para todos los tratamientos, cada maceta fue inoculada con 500 especímenes del nematodo *Radopholus similis*, previamente extraídos de raíces de banano provenientes de plantaciones infestadas de forma natural, ello se realizó mediante la técnica de Centrifugación-flotación (Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separation nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48: 692), diluyendo los especímenes en 5 ml de agua destilada y aplicados uniformemente a 5 cm por debajo de la superficie del suelo.

Las macetas se colocaron en invernaderos y permanecieron en reposo durante tres días después de efectuados los tratamientos e inoculados los nematodos. En esta etapa se mantuvieron riegos diarios para mantener buenas condiciones de humedad en las mismas.

Antes del cuarto día de efectuados los tratamientos, se procedió a sembrar en cada maceta una postura de banano var. Cavendish, obtenida por técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. A partir de este momento se continuó con un estricto

régimen de riego en el que se mantuvo permanentemente la humedad del suelo en su capacidad de campo.

La evaluación final se efectuó a los 3 meses de montado el experimento, para ello se extrajeron las raíces de las plantas, separándolas cuidadosamente del suelo. Seguidamente se registró la cantidad de especímenes (larvas y adultos) de nematodos vivos extraídos de cada planta, empleándose la técnica de Centrifugación-flotación (Jenkins, W. R.1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separation nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48: 692) y un microscopio invertido para los conteos. Los resultados de la efectividad de los distintos tratamientos se muestran en la TABLA 3. Este valor es la media de las 5 réplicas de cada tratamiento. A los resultados obtenidos se le aplicó análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de Duncan (Lerch G. 1977. La Experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. 1ª edición, p.p. 203 - 308, Editorial Científico-Técnica, La Habana), esto también se refleja en la TABLA 3; las letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

TABLA 3. Efectividad de los tratamientos (E)*

	Efectividad de los tratamientos (E)*			
	1. Ec	2. Eq	3. Esd	4. Eqsd
<i>Radopholus similis</i>	0.00(a)	0.21(b)	0.18 (b)	0.48(c)

*La efectividad (E) es el resultado de sustraer a 1 el valor de la frecuencia relativa (Fr) de especímenes vivos. La Fr es el cociente entre el número de especímenes vivos de cada tratamiento (Ntto) y el número de especímenes vivos del tratamiento 1 (Nc):

$$E = 1 - Fr, \text{ donde } Fr = Ntto/Nc, \text{ por lo que } E = 1 - Ntto/Nc$$

Para determinar el posible efecto sinérgico en el tratamiento 4, se asumió que los eventos (efecto nematicida) que ocurren, no son excluyentes.

De forma semejante al Ejemplo 1, la efectividad esperada (EE) debe ser igual a la suma de los efectos individuales (EI) que están dados por la efectividad

atribuida a la acción de la quitina (Eq) como inductor de la actividad quitinolítica de los microorganismos presentes en la mezcla del suelo con el humus, y la efectividad atribuida a la acción del sulfuro de hidrógeno (Esd) proveniente de la bacteria *D. desulfuricans*; menos el efecto intersección (ei) entre ambos tratamientos (Sigarroa, A. 1985. Biometría y diseño experimental. 1ra. Parte. Minist. Educación Sup. Ed. Pueblo y Educación. Cap. 3. pag 69-107).

$$EE = E_q + E_s - e_i, \text{ donde } e_i = E_q \times E_s$$

Si la efectividad experimental (E) en el tratamiento 4 donde se combinan dos agentes nematocidas es mayor que la efectividad esperada (EE), puede asegurarse que existe sinergismo entre el agente inductor de la actividad quitinolítica (quitina) y el sulfuro de hidrógeno (proveniente de *D. desulfuricans*), al aplicarse ambos de forma concurrente en el mismo tratamiento. En la TABLA 4 se muestran los valores obtenidos.

TABLA 4 Efectividad experimental (E) y esperada (EE)

	Efectividad experimental (E) y esperada (EE)	
	Tratamiento 4	
	E	EE
<i>Radopholus. similis</i>	0.48	0.35

En el tratamiento 4 se combinan un inductor de la actividad quitinolítica (quitina) y una fuente biológica de sulfuro de hidrógeno (*D. desulfuricans*). En este caso fue mayor la efectividad experimental (E) que la efectividad esperada (EE), con ello se demuestra el sinergismo (en cuanto a su actividad nematocida) de ambos compuestos al actuar de forma concurrente en el suelo.

Ejemplo 3: Demostración de la actividad quitinolítica y producción de sulfuros de las bacterias *Corynebacterium paurometabolum* C-924 y *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162.

Determinación de la producción de sulfuros:

En tubos colectores de gases de 100 mL, fueron tomadas las muestras de la corriente de gases procedentes de la fermentación en biorreactores de 5 L, de las cepas C-924 y DSM 20162. El tiempo total de cultivo fue de 24 h. Comenzándose a detectar la formación de sulfuro de hidrógeno a partir de las 16 h.

Las muestras se procesaron de manera análoga al patrón de H₂S generado. El análisis se realizó en cromatógrafo de gases "Varian" con las siguientes condiciones:

- Detector fotométrico de llama con filtro sensible a compuestos que contienen azufre.
- Patrón de Sulfuro de Hidrógeno: 43.2 ng/ml, por duplicado.
- Muestras: por duplicado para cada tiempo en que se realizaron los muestreos.
- Inyección: 1 ml ó µl de head Space
- Columna: DB-5 (15 m x 0.53 mm)
- Temperatura: 35 °C.
- Gas portador: Nitrógeno 1.5 ml/min.
- Detector: FPD-S.
- Gas de Purga: Nitrógeno 30 ml/min.

En la TABLA 5 se presenta un resumen del análisis de gases sulfurados emitidos por ambas cepas en diferentes tiempos.

TABLA 5 Analisis de gases sulfurados.

Cepas	Muestra	Flujo H ₂ S mg/min (flujo de sulfuros detectado)				
		16 horas	18 horas	20 horas	22 horas	24 horas
C-924	1	0.0673	0.2208	0.4779	0.3578	0.0672
	2	0.0659	0.2160	0.4755	0.3552	0.0680
DSM 20162	1	0.0231	0.0416	0.1014	0.1863	0.0009
	2	0.0240	0.0422	0.1040	0.1887	0.0097

Ambas cepas producen sulfuros pero C-924 logra flujos superiores a la cepa DSM 20162.

Determinación de la actividad quitinolítica:

Se emplearon las cepas *Corynebacterium paurometabolum* C-924, *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162, *Serratia marcescen* ATCC13880 y la cepa ATCC 25922 de *E.coli*.

Los cultivo bacterianos de las cepas en estudio se crecieron en medio LB a una temperatura de 28°C y 100 rpm de agitación durante 24 horas, transcurrido este tiempo se centrifugaron a 3500 rpm y los sobrenantes se filtraron a través de dos membranas de 0.2 µm. El producto del filtrado fue sometido a ensayos de actividad en placas preparadas a partir de una suspensión coloidal de quitina (0.5%), se adicionó además agarosa hasta un 0.8% para lograr la gelificación del medio y garantizar una porosidad que permitiera la mejor difusión de las proteínas. Una vez gelificado, se hicieron pocillos de 5mm de diámetro en los que se adicionaron 100 µl del sobrenadante filtrado de cada cepa bacteriana. Se colocaron tres replicas para cada placa y se incubaron a 28°C y en la oscuridad.

A partir de las 48 horas se comenzó a apreciar una disminución en la turbidez del medio en forma de halo que evidenciaba la hidrólisis de la quitina. En la siguiente tabla (TABLA 6) se muestran los resultados cualitativos de la aparición de un halo de hidrólisis a diferentes tiempos de incubación con el sobrenadante de cultivo de las diferentes cepas estudiadas.

TABLA 6 Aparición de un halo de hidrólisis

Cepas	24horas	48 horas	72 horas
<i>S. marcescen.</i>	Negativo	Positivo+	Positivo+++
<i>C. paurometabolum</i>	Negativo	Negativo	Positivo++
<i>T. paurometabola.</i>	Negativo	Negativo	Positivo+
<i>E. coli.</i>	Negativo	Negativo	Negativo

El signo +++ se refiere al mayor halo de hidrólisis observado, el signo ++ hace referencia un halo de hidrólisis intermedio y el signo + se refiere al menor halo de hidrólisis observado.

Ambas cepas (*C. paurometabolum* y *T. paurometabola*.) mostraron halo de hidrólisis de la quitina al igual que el control positivo utilizado (*S. marcescen*), mientras la cepa de *E. coli* (control negativo) no produjo halo de hidrólisis

5 **Ejemplo 4: Evaluación *in vitro* del efecto de sulfuros y quitinasas, producidos por las bacterias *Corynebacterium paurometabolum* C-924 y *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162, sobre el parásito *Fasciola hepatica* (trematodo).**

10 Se utilizaron huevos del parásito *Fasciola hepatica* (trematodo). Las colectas de los huevos se realizaron directamente de la bilis de un hígado infestado de un bovino (vacuno), sacrificado previamente. El contenido biliar se resuspendió en un volumen 3 veces superior de agua destilada estéril y se dejó en reposo de 2 a 3 horas a 28°C, con el objetivo de que los huevos precipiten. Posteriormente se extrajo cuidadosamente el mayor volumen posible del líquido sobrenadante. El precipitado se filtró por un tamiz de una malla de 71 µm, quedando los huevos retenidos dentro de este.

15 A partir de este momento toda la manipulación se realizó bajo condiciones asépticas dentro de un flujo laminar vertical y empleando placas de cultivo de tejidos de 24 huecos. El tamiz, conteniendo los huevos de *F. hepatica*, se introdujo en una solución de Hibitane al 0,5 % durante 3 minutos y seguidamente se efectuaron 3 lavados con medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril.

20 Los huevos una vez desinfectados, se extrajeron del tamiz, resuspendiéndolos cuidadosamente con una solución del medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril. Se comprobó el resultado final de esta operación, realizando el conteo y el registro de los huevos en cada pocillo con el empleo de un microscopio invertido OLYMPUS, también se realizaron observaciones sobre la uniformidad del estadio evolutivo de esta fase.

25 Los huevos de este trematodo parásito eclosionan bajo las condiciones previamente establecidas *in vitro* alrededor de los 15 días de incubados a 28°C, se consideró como una buena preparación de la muestra cuando se logró más de un 60 % de eclosión de los huevos al finalizar el período de incubación.

30

Para desarrollar el experimento, los huevos desinfectados fueron colocados en cantidad de 100 individuos aproximadamente en 1 ml de medio LB diluido 10 veces. Este volumen se introdujo uniformemente en 20 válvulas de seguridad que permiten el paso del aire a través del líquido y por consiguiente los gases entran en contacto con los huevos. Cada válvula constituyó una réplica (4 por tratamiento) en cada uno de los cinco tratamientos.

Los huevos de *F. hepatica* fueron expuestos a los siguientes tratamientos durante los últimos 4 días de su proceso de incubación:

1. Tratamiento Control: Se añadió 1 ml de medio LB diluido 10 veces a cada válvula, sin aplicar quitinasa y circulando aire a través de la misma.

2. Se añadió 1 ml a cada válvula de un sobrenadante quitinolítico sin células de la bacteria, obtenido de un cultivo de 10^{10} Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) de *Corynebacterium paurometabolum* C-924.

3. Se añadió 1 ml a cada válvula de un sobrenadante quitinolítico sin células de la bacteria, obtenido de un cultivo de 10^{10} UFC/ml de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162.

4. Se hizo pasar por las válvulas el flujo de gases procedente de un cultivo continuo de *Corynebacterium paurometabolum* C-924 a 10^{10} UFC/ml.

5. Se hizo pasar por las válvulas el flujo de gases procedente de un cultivo continuo de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162 a 10^{10} UFC/ml.

6. Tratamiento combinado: aplicación simultánea de los tratamientos 2 y 4.

7. Tratamiento combinado: aplicación simultánea de los tratamientos 3 y 5.

A los 4 días de iniciado el experimento se contaron los huevos eclosionados.

En el caso de *F. hepatica* no es posible contar las larvas (miracidios) que emergen debido a la gran movilidad que presentan, es por ello que las observaciones en el microscopio se centran sobre los huevos. Los resultados de la efectividad de los distintos tratamientos se muestran en la TABLA 7 .

Este valor es la media de las 4 réplicas de cada tratamiento. Las letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

TABLA 7 Efectividad de los tratamientos (E)*

	Efectividad de los tratamientos (E)*						
	1. E Control	2. Eq C-924	3. Eq DSM20162	4. Es C-924	5. Es DSM20162	6. E (2+4)	7. E (3+5)
<i>Fasciola hepatica</i>	0.00 (a)	0.18 (b)	0.11 (c)	0.29 (d)	0.16 (b,c)	0.52 (e)	0.28 (d)

5 *La efectividad (E) es el resultado de sustraer a 1 el valor de la frecuencia relativa (Fr) de eclosión de los huevos. La Fr es el cociente entre el número de huevos eclosionados de cada tratamiento (Ntto) y el número de huevos eclosionados del tratamiento 1 (Nc):

$$E = 1 - Fr, \text{ donde } Fr = Ntto/Nc, \text{ por lo que } \underline{E = 1 - Ntto/Nc}$$

10 Para determinar el posible efecto sinérgico en los tratamientos 6 y 7, se asumió que los eventos (efecto nematicida) que en ellos ocurren, no son excluyentes.

15 Para este tipo de análisis la efectividad esperada (EE) debe ser igual a la suma de los efectos individuales (EI) que están dados por la efectividad atribuida a la acción de la quitinasa (Eq) y la efectividad atribuida a la acción del sulfuro de hidrógeno (Esn, Esf y Esd) menos el efecto intersección (ei) (Sigarroa, 1985).

$$EE = Eq + Es - ei, \text{ donde } ei = Eq * Es$$

20 Si la efectividad experimental (E) en los tratamientos donde se combinan dos agentes nematicidas (tratamientos 6 y 7) es mayor que la efectividad esperada (EE) para esos tratamientos, puede asegurarse que existe sinergismo en cuanto a la actividad nematicida del agente quitinolítico

25 (quitinasa) y el sulfuro de hidrógeno al aplicarse ambos de forma concurrente en el mismo tratamiento. En la TABLA 8 se resumen los valores obtenidos.

TABLA 8 Efectividad experimental (E) y esperada (EE)

	Efectividad experimental (E) y esperada (EE)			
	Tratamiento 6		Tratamiento 7	
	E	EE	E	EE
<i>Fasciola hepatica</i>	0.52	0.31	0.28	0.25

En los tratamientos donde se combinan quitinasa y sulfuro de hidrógeno, fue mayor la efectividad experimental (E) que la efectividad esperada (EE), con ello se demuestra el sinergismo de ambos compuestos al actuar de forma concurrente en cuanto a su actividad nematocida.

Ejemplo 5: Evaluación *In vitro* del efecto de una cepa bacteriana (*Corynebacterium paurometabolum* C-924) productora de sulfuro de hidrógeno y con actividad quitinolítica, sobre diferentes bacterias y hongos.

Se emplearon las siguientes especies de hongos: *Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina*, *Sarocladium orizae*, *Pytium debaryanum*; y las siguientes especies de bacterias: *Erwinia chrysanthemi*, *Burkholderia glumae*, *Serratia marcescen* ATCC 13880, *Bacillus subtilis* F1695 y *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

A) Ensayo frente a hongos:

En este ensayo se estudió la interacción de *Corynebacterium paurometabolum* C-924, sobre los hongos: *Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina*, *Sarocladium orizae* y *Pytium debayianum*. La cepa de *Serratia marcescen* ATCC 13880 fue utilizada como control positivo de actividad funguicida y la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* fue utilizada como control negativo de actividad funguicida. Los cultivos bacterianos se crecieron con las condiciones de agitación y temperaturas habituales para cada especie durante 24 horas, se realizaron las diluciones necesarias, previa lectura de las absorbencias a λ 530 nm, para garantizar una concentración celular de 10^9 ufc/ml. Éstas fueron sembradas en placas petries que contenían medio PDA (agar-papa-dextrosa), realizando los inóculos en forma de una línea central

con ayuda del asa microbiológica. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C, tiempo después del cual se le inocularon discos de 8 mm de diámetro de las diferentes cepas de hongos previamente crecidas (en placas con medio PDA), colocándolas sobre la superficie de las placas en ambos polos respecto a la línea central de las bacterias inoculadas. Se colocaron tres réplicas para cada hongo a estudiar y se incubaron durante 10 días a 28°C. La lectura de los resultados se realizó a partir del quinto día de iniciado el experimento.

b) Ensayo frente a bacterias

En este ensayo se estudió la interacción de *Corynebacterium paurometabolum* C-924, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* F1695, sobre las siguientes bacterias: *Erwinia chrysanthem* y *Burkholderia glumae*. La cepa *Bacillus subtilis* F1695 se utilizó como control positivo de antagonismo con otras bacterias y para control negativo se utilizó la cepa ATCC 25922 de *E. coli*. Estas cepas bacterianas fueron crecidas en medio LB bajo condiciones de temperatura y agitación habituales durante 24 horas. Partiendo de estos cultivos se realizaron las diluciones necesarias, previa lectura de las absorbancias a λ 530 nm, para garantizar una concentración celular de 10^9 ufc/ml. Sobre placas con medio LB se sembró en tres sitios diferentes para el caso de C-924, en dos sitios diferentes para el control positivo y en dos sitios diferentes para el caso del control negativo, una gota de 5 μ l de cada cultivo respectivamente. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se sometieron a tratamientos durante 3 minutos con vapores de cloroformo (para lograr su inactivación y evitar su dispersión en pasos posteriores), luego las placas se dejaron en la cabina de flujo laminar semiabiertas para eliminar el exceso de gas y se realizó la inoculación de las cepas retadoras *Erwinia chrysanthemi* y *Burkholderia glumae*. Para realizar esta inoculación se partió de cultivos puros de cada microorganismo de los cuales se tomaron las cantidades necesarias para lograr una concentración celular de aproximadamente 10^9 ufc/ml una vez añadidos a 3 mililitros de medio LB semisólido (0,1% de agar técnico No 3). La mezcla se dispersó sobre las placas que contenían las cepas retadas, posteriormente se incubaron a 28°C durante 48 horas para realizar la

evaluación de los resultados. La TABLA 9 contiene la descripción de los resultados obtenidos en los ensayos de interacción anteriormente relatados.

TABLA 9 Resultados obtenidos en los ensayos de interacción

<u>Especie</u>	<u>Descripción</u>	Nivel de antagonismo de C-924
<i>Pestalotia palmarum</i>	Hongo, <i>Deuteromiceto</i> , fitopatógeno del Follaje en cítricos y frutales.	+++
<i>Alternaria tabacina</i>	Hongo, <i>Deuteromiceto</i> , fitopatógeno de las hojas en tabaco.	+++
<i>Sarocladium orizae</i>	Hongo, <i>Deuteromiceto</i> , fitopatógeno del arroz, interviene en el complejo ácaro-hongo, afectando semillas, vaina y cuello.	++
<i>Pytium debaryanum</i>	Hongo, <i>Oomiceto</i> , habita en el suelo e integra el complejo causal del "Damping-Off".	+
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Bacteria, aislamiento de tallos de Dalias con síntomas de pudrición blanda.	+++
<i>Burkholderia glumae</i>	Bacteria, aislamiento de plantas de arroz con síntomas de necrosis apical y marginal.	++
<i>Bacillus subtilis</i> cepa F1695	Bacteria, aislamiento de la rizosfera de papa en plantas libres de pudrición blanda en campo afectado. Biorregulador.	-

- 5
- +++ : se aprecia un fuerte antagonismo al detenerse el crecimiento y provocar la formación de un halo por el efecto de C-924. Para el caso de los hongos se inhibe el crecimiento radial típico de éstos.

++ : efecto antagonista medio de C-924 sobre el microorganismo.

+ : efecto antagonista ligero de C-924 sobre el microorganismo.

10

- : no se aprecia efecto antagonista de C-924 sobre el microorganismo.

15

Como se observa en la TABLA 9, existe un marcado efecto antagonista de la cepa *Corynebacterium paurometabolum* C-924 sobre los hongos *Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina* y *Sarocladium orizae*; los cuales se caracterizan por presentar un alto contenido de quitina en su estructura, mientras que para el hongo *Pythium devaryanum*, que no presenta quitina en su estructura, sólo se observó un ligero antagonismo causado por la acción del sulfuro de hidrógeno. Para el caso de la interacción con las bacterias

estudiadas, el antagonismo se observó con las dos cepas patógenas (*Erwinia chrysanthemi* y *Burkholderia glumae*), mientras que con el *Bacillus subtilis* no se observó por ser éste un aislado del suelo antagonistas con otros microorganismo y por ende más resistente a factores ambientales adversos.

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

COMPOSICIONES PESTICIDAS Y ANTIPARASITARIAS.

- 5 1. Una composición que comprende al menos un agente quitinolítico o un agente inductor de la actividad quitinolítica, y adicionalmente sulfuro o un agente productor de sulfuros, así como un portador apropiado.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho agente quitinolítico es una quitinasa.
- 10 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho agente quitinolítico es un microorganismo productor de quitinasas.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, que contiene entre 10^7 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y 10^{12} UFC de dicho microorganismo por gramo de la composición.
- 15 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho agente inductor de actividad quitinolítica es quitina.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, donde la quitina constituye entre el 1 y el 50% de dicha composición.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho agente productor de sulfuros es un microorganismo.
- 20 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, que contiene entre 10^7 UFC y 10^{12} UFC de dicho microorganismo por gramo de la composición.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho agente productor de sulfuros es un agente químico.
- 25 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde la producción de sulfuros está en el rango de 0.1 mg/minuto y 1.0 mg/minuto por gramo de composición.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente quitinolítico y el agente productor de sulfuros es un microorganismo.
- 30 12. Una composición de acuerdo a las reivindicaciones desde la 1 hasta la 11, para el control de zoonemátodos parásitos.

13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde los zoonemátodos parásitos son *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp* y *Dictiocalus spp.*
- 5 14. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones desde la 1 hasta la 11, para el control de fitonemátodos parásitos.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, donde los fitonemátodos parásitos son *Meloidogyne spp.* y *Radopholus similis*.
16. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones desde la 1 hasta la 11, para el control de bacterias patógenas a animales y plantas.
- 10 17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde las bacterias patógenas son: *Erwinia spp.* y *Burkholderia spp.*
18. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones desde la 1 hasta la 11, para el control de hongos patógenos para animales y plantas.
- 15 19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18, donde los hongos patógenos son *Pestalotia palmarum*, *Alternaria tabacina* y *Sarocladium orizae*.
20. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones desde la 1 hasta la 11, para el control de tremátodos parásitos.
- 20 21. Una composición de acuerdo con la reivindicación 20, donde el tremátodo parásito es *Fasciola hepática*.
- 25 22. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, donde dicho portador apropiado puede ser un fertilizante, un suelo pre-empacado, un cobertor de semillas, un polvo, un granulado, un nebulizador, una suspensión, un líquido, o cualesquiera de las formas indicadas, formuladas en cápsulas para el control de helmintos parásitos, bacterias y hongos patógenos.

52

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 03055750 00000000 Folios: 52
Fecha (MM): 2003-07-02 17:00:35
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NTT : 800176087-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 45,405
FECHA : JULIO 1 DE 2003

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8573195	01/07/2003	34,360,000.00

CONCEPTO

CANT. CONTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 08972-841-001-3

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		

Firma Responsable:

Andrea Posse

Fecha: