

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619383-8 A2**

(22) Data de Depósito: 03/08/2006
(43) Data da Publicação: 27/09/2011
(RPI 2125)



★ B R P I 0 6 1 9 3 8 3 A 2 ★

(51) Int.Cl.:

A01N 31/08
A01N 35/02
A01N 31/16
A01N 31/02
A01N 35/06
A01N 25/08
A01P 3/00
A01P 7/02
A01P 5/00

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS
COMPREENDENDO TERPENOS OU MISTURAS DE
TERPENOS SELECIONADAS DE TIMOL, EUGENOL,
GERANIOL, CITRAL, E L-CARVONA

(30) Prioridade Unionista: 30/11/2005 US 60/741.167

(73) Titular(es): Eden Research PLC.

(72) Inventor(es): Gary Harman, Gary Ostroff, Lanny Franklin

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT GB2006002881 de
03/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/063268 de
07/06/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS
COMPREENDENDO TERPENOS OU MISTURAS DE TERPENOS
SELECIONADAS DE TIMOL, EUGENOL, GERANIOL, CITRAL E L -
CARVONA A presente invenção se refere às composições
compreendendo terpenos que são especificamente apropriados para
tratamento de infecções em plantas, aos métodos para fabricação de
tais composições e aos métodos de emprego das mesmas. A presente
invenção também se refere às composições compreendendo terpenos
e partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular e aos
métodos para fabricação de tais composições; tais composições
aumentam a estabilidade e atividade do terpeno e fornecem um
veículo apropriado para os terpenos. A invenção também se refere aos
métodos de uso de tais composições nos campos médico, veterinário
e agrícola. Especificamente, os terpenos revelados são timol, eugenol,
geraniol, citral e L-carvona.

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS COMPREENDENDO TERPENOS OU MISTURAS DE
TERPENOS SELECIONADAS DE TIMOL, EUGENOL, GERANIOL, CITRAL E
L-CARVONA

A presente invenção se refere às composições
5 compreendendo terpenos que são especificamente apropriadas
para tratamento de infecções em plantas, aos métodos para
fabricação de tais composições e aos métodos para uso das
mesmas. A presente invenção também se refere às composições
compreendendo terpenos e partículas ocas de glicano ou
10 partículas de parede celular e métodos para preparação de
tais composições; tais composições aumentam a estabilidade
e atividade do terpeno e fornecem um veículo apropriado
para os terpenos. A invenção também se refere aos métodos
de uso de tais composições nos campos médico, veterinário e
15 agrícola.

Os terpenos são compostos químicos que são
difundidos na natureza, principalmente nas plantas como
constituintes de óleos essenciais. Seu bloco de construção
é o isopreno de hidrocarboneto $(C_5H_8)_n$. Exemplos de terpenos
20 incluem citral, pineno, nerol, b-ionona, geraniol,
carvacrol, eugenol, carvona, terpeniol, anetol, cânfora,
mentol, limoneno, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno
(vitamina A_1), esqualeno, timol, tocotrienol, álcool
perilílico, borneol, mirceno, simeno, careno, terpenona e
25 linalool.

Os terpenos são classificados como Reconhecidos de
Modo Geral como Seguros (GRAS) e vêm sendo usados por
muitos anos nas indústrias como saborizantes e
aromatizantes. O LD_{50} do citral em ratos é de
30 aproximadamente 5 g/kg, que é uma indicação adicional da

segurança relativa desses compostos. Adicionalmente, os terpenos possuem uma vida útil relativamente curta de aproximadamente 28 dias quando expostos ao oxigênio (por exemplo, ar). Os terpenos serão decompostos em CO₂ e água.

5 Essa decomposição ou rompimento dos terpenos demonstra a eficácia e não agressão ambiental das composições e métodos da invenção.

Foi verificado que os terpenos inibem o crescimento das células cancerígenas, diminuem o tamanho do tumor,

10 diminuem os níveis de colesterol e possuem um efeito biocida nos microorganismos *in vitro*. Owawunmi, (Letters in Applied Microbiology, 1993, 9(3):105-108), mostrou que o meio de crescimento com mais de 0,01% de citral reduziu a concentração de *E.coli*, e a 0,08% existe um efeito

15 bactericida. A Patente US número 5.673.468 descreve uma formulação de terpeno, com base em óleo de pinho, empregada como um desinfetante ou limpador anti-séptico. A Patente US número 5.849.956 ensina que um terpeno encontrado no arroz possui atividade antifungo. A Patente US número

20 5.939.050 descreve um produto antimicrobiano para higiene bucal com uma combinação de 2 ou 3 terpenos que mostraram um efeito sinérgico. Várias Patentes US (Patentes US números 5.547.677, 5.549.901, 5.618.840, 5.629.021, 5.662.957, 5.700.679, 5.730,989) ensinam que determinados

25 tipos de emulsões de óleo e água possuem propriedades antimicrobianas, adjuvantes e de distribuição.

Foi verificado que os terpenos são agentes antitumor em dieta não tóxica e eficaz, que atuam através de uma variedade de mecanismos de ação (Crowell e outros,

30 Crit. Rev. Oncog., 1994, 5(1):1-22; Crowell e outros, Adv.

Exp. Med. Biol., 1996, 401:131-136). Os terpenos geraniol, tocotrienol, álcool perílico, b-ionona e d-limoneno, suprimem a atividade da HMG-CoA redutase hepática, uma etapa de limitação de taxa na síntese do colesterol, e modestamente reduzem os níveis de colesterol nos animais (Elson e outros, J. Nutr., 1994, 124:607-614). D-limoneno e geraniol reduziram os tumores mamários (Elegbede e outros, Carcinogenesis, 1984, 5(5):661-664; Elegbede e outros, J. Natl. Cancer Inst., 1986, 76(2):323-325; Karlson e outros, Anticancer Drugs, 1996, 7(4):422-429) e suprimiram o crescimento dos tumores transplantados (Yu e outros, J. Agri. Food Cem., 1995, 43:2144-2147).

Foi verificado que os terpenos inibem o crescimento *in vitro* de bactérias e fungos (Chaumont e outros, Ann. Pharm. Fr., 1992, 50(3):156-166; Moleyar e outros, Int. J. Food Microbiol, 1992, 16(4):337-342; e Pattnaik e outros, Microbios, 1997, 89(358):39-46) e alguns parasitas internos e externos (Hooser e outros, J. Am. Vet. Med. Assoc, 1986, 189(8):905-908). Foi verificado que o geraniol inibe o crescimento das cepas *Candida albicans* e *Saccharomyces* por melhora da taxa de vazamento de potássio e ruptura da fluidez da membrana (Bard e outros, Lipids, 1998, 23(6):534-538). B-ionona possui atividade antifungo que foi determinada por inibição da germinação de esporo e inibição do crescimento em ágar (Mikhlin e outros, A. Prikl. Biokhim. Mikrobiol, 1983, 19:795-803; Salt e outros, Adam. Physiol. Molec. Plant Path, 1986, 28:287-297). A teprenona geranilgeranilacetona possui um efeito antibacteriano em *H. pylori* (Ishii Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993, 280(1-2):239-243). Rosanol, um produto

comercial com óleo de rosa a 1%, mostrou inibir o crescimento de várias bactérias (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli*, e *H. pylori*). O geraniol é o componente ativo (75%) do óleo de rosa. O óleo de rosa e o geraniol a uma concentração de 2 mg/L inibiram o crescimento do *H. pylori in vitro*. Alguns extratos de remédios de ervas mostraram ter um efeito inibidor no *H. pylori*, o mais eficaz sendo o angelato de decursinol, decursina, magnolol, berberina, ácido cinâmico, decursinol e ácido gálico (Bae e outros, Biol. Pharm. Bull., 1998, 21 (9) 990-992). Os extratos de caju, ácido anacardíco e (E)-2-hexenal mostraram efeito bactericida contra *H. pylori*.

Os diterpenos, isto é, tricarabdal A (de *R. Trichocarpa*), mostraram um efeito antibacteriano muito forte contra *H. pylori* (Kadota e outros, Zentralbl. Bakteriologie, 1997, 287(1):63-67).

Soluções de onze terpenos diferentes foram eficazes para inibir o crescimento das bactérias patogênicas em testes *in vitro*; níveis variando entre 100 ppm e 1.000 ppm foram eficazes. Os terpenos foram diluídos em água com polissorbato 20 a 1% (Kim e outros, J. Agric. Food Chem., 1995, 43:2839-2845).

Podem haver modos diferentes de ação dos terpenos contra microorganismos; eles poderiam (1) interferir com a bicamada fosfolipídica da membrana celular, (2) fornecer uma variedade de sistemas de enzima (HMG-redutase) e (3) destruir ou inativar o material genético. Acredita-se que devido aos modos de ação dos terpenos serem tão básicos, por exemplo, o bloqueio do colesterol, que agentes infecciosos não serão capazes de construir uma resistência

aos terpenos.

Existem, contudo, várias desvantagens ao uso dos terpenos. Elas incluem:

- Os terpenos são líquidos que podem tornar seu manuseio inapropriado para determinados fins.

- Os terpenos não são muito miscíveis em água e isso geralmente requer o uso de detergentes, agentes tensoativos ou outros emulsionadores para preparar as emulsões aquosas. Uma solução estável contudo, pode ser obtida por mistura dos terpenos sob cisalhamento alto.

- As formulações de terpeno em pó seco geralmente contêm, apenas, uma baixa porcentagem peso/peso de terpenos.

- Os terpenos são propensos à oxidação nos sistemas de emulsão aquosos, que tornam o armazenamento a longo prazo um problema.

Existem limitações às técnicas atuais de revestimento por aspersão, extrusão, coacervação, encapsulamento molecular e secagem por aspersão/resfriamento para prover sistemas de distribuição do ingrediente.

As paredes de célula da levedura de padeiro são derivadas das células de levedura de padeiro e são compostas de biopolímeros insolúveis β -1,3-glicano, β -1,6-glicano, manano e quitina. Eles são, tipicamente, microesferas de 2-4 micron de diâmetro com uma parede de revestimento que possui apenas 0,2-0,3 micron de espessura circundando uma cavidade aberta. Esse material possui capacidade considerável de reter o líquido, tipicamente absorvendo 5-25 vezes seu peso em líquido. O revestimento é

suficientemente poroso de modo que cargas de até 150.000 Dalton de tamanho podem passar através do revestimento externo e serem absorvidas na cavidade oca da partícula esférica. As paredes da célula de levedura de padeiro
5 possuem várias propriedades únicas incluindo estabilidade térmica (por exemplo, a 121°C), estabilidade em cisalhamento, estabilidade em pH (por exemplo, pH 2-12) e em concentrações altas elas não apresentam viscosidade significativa. Além de suas propriedades físicas, essa
10 composição contém fibras de dieta naturais e saudáveis que liberam benefícios a saúde cardiovascular e de imunopotencialização.

As paredes de célula de levedura são preparadas das células de levedura por extração e purificação da fração
15 particulada insolúvel dos componentes solúveis da célula de levedura. As paredes das células de fungos podem ser produzidas de subproduto insolúvel da fabricação de extrato de levedura. Adicionalmente, as células de levedura podem ser tratadas com uma solução aquosa de hidróxido, sem
20 ruptura das paredes da célula de levedura, que digere a proteína e porção intracelular da célula, deixando o componente da parede de célula de levedura isento de contaminação significativa por proteína e possuindo, substancialmente, a estrutura de parede de célula
25 inalterada dos glicanos ligados em $\beta(1-6)$ e $\beta(1-3)$. Uma descrição mais detalhada dessas partículas de glicano integrais e do processo para preparação das mesmas é descrito por Jamas e outros, na Patente U.S. número 4.810.646 e nos Pedidos de Patente US copendentes número
30 de série 166.929, número de série 297.752 e número de

série 297.982. A Patente US número 6.242,594, cedida à Novogen Research Pty Ltd., descreve um método para preparar partículas de glicano de levedura por extração com álcali, extração com ácido e então, extração com um solvente orgânico e finalmente secagem. A US 5.401.727, cedida à AS Biotech-Mackzymal, revela os métodos para obtenção de partículas de glicano de levedura e métodos de uso das mesmas para promover a resistência em animais aquáticos e como um adjuvante para vacinações. A US 5.607.677 cedida à Alpha-Beta Technology Inc., revela o emprego de partículas de glicano integral como um pacote de distribuição e adjuvante para a distribuição de vários agentes farmacêuticos. Os ensinamentos das patentes e pedidos mencionados anteriormente são incorporados aqui como referência.

Outros tipos de células de levedura e fungo possuem paredes de célula que não contêm glicano. As paredes das células de tais leveduras e fungos podem ser isoladas por técnicas semelhantes àsquelas mencionadas acima para obter partículas de parede celular.

Adicionalmente, as células de muitas plantas, algas, bactérias e outros microorganismos também compreendem uma parede de célula. A estrutura e composição da parede de célula varia entre os microorganismos, porém, em geral, é uma estrutura robusta e relativamente inerte. É possível se obter partículas da parede celular derivadas de tais células, através de técnicas convencionais, tais como aquelas mencionadas acima, em relação à levedura.

Os terpenos podem ser coletados e estavelmente encapsulados dentro de partículas ocas de glicano ou

partículas de parede celular. O encapsulamento dos terpenos em tais partículas pode ser obtido por incubação das partículas com o terpeno.

Foi verificado que determinadas misturas de mais de
5 um terpeno exibem eficácia superior em relação a outras. Especificamente, foram identificadas formulações que possuem uma eficácia alta no controle dos microorganismos, especialmente agentes patogênicos de plantas.

De acordo com a presente invenção é provida uma
10 composição compreendendo um componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de um terpeno selecionados do grupo consistindo em timol, eugenol, geraniol e citral. Tais formulações se mostraram especificamente potentes no extermínio dos microorganismos.
15 Especificamente, essas formulações se mostraram geralmente eficazes no tratamento e prevenção de infecções em plantas.

Em uma concretização da presente invenção a composição compreende um componente terpeno compreendendo uma combinação de timol e um ou mais dentre eugenol,
20 geraniol, citral. Tais composições mostraram ser especialmente eficazes no tratamento e prevenção de infecções em plantas. A presença de timol em tais composições tipicamente resulta em altos níveis de eficácia. Contudo, o timol propriamente, tipicamente não é
25 tão eficaz quando combinado com um ou mais dentre geraniol, eugenol e citral. Isso sugere que existe um efeito sinérgico ocorrendo entre os vários terpenos, em combinações da presente invenção.

Quando se obtém a aprovação reguladora para um novo
30 produto para uso médico ou agrícola, é geralmente mais

simples registrar uma composição possuindo menos ingredientes ativos. Consequentemente, é geralmente preferido que a composição da presente invenção compreenda um componente terpeno consistindo em quatro ou menos terpenos; preferivelmente três terpenos ou menos.

Em uma outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol e geraniol. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca de 10% e 90% de timol e entre cerca de 10% e 90% de geraniol; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca de 40% e 60% de timol e entre cerca de 40% e 60% de geraniol. O componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol e geraniol. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas, especialmente contra fungos/oomicetos.

Em outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol e citral. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca de 10% e 90% de timol e entre cerca de 10% e 90% de citral; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca de 40% e 60% de timol e entre cerca de 40% e 60% de citral. O componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol e citral. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas, especialmente contra

bactérias.

Em uma outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol e eugenol. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca
5 de 10% e 90% de timol e entre cerca de 10% e 90% eugenol; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca de 40% e 60% de timol e entre cerca de 40% e 60% eugenol. O componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos
10 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol e eugenol. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas.

Em outra concretização a composição compreende um
15 componente terpeno compreendendo timol, geraniol e citral. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca de 10% e 90% de timol, entre cerca de 10% e 90% de geraniol, e entre cerca de 10% e 90% de citral; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca
20 de 25% e 50% de timol e entre cerca de 25% e 50% de geraniol, e entre cerca de 25% e 50% de citral. O componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste
25 exclusivamente em timol, geraniol e citral. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas.

Em outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol, eugenol e citral.
30 Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca

de 10% e 90% de timol, entre cerca de 10% e 90% eugenol, e entre cerca de 10% e 90% de citral; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca de 25% e 50% de timol e entre cerca de 25% e 50% eugenol, e entre cerca de 25% e 50% de citral. O componente terpeno pode compreender, 5 opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol, eugenol e citral. Tal composição tem se mostrado altamente 10 eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas.

Em outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol, geraniol e eugenol. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca 15 de 10% e 90% de timol, entre cerca de 10% e 90% de geraniol, e entre cerca de 10% e 90% de eugenol; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca de 25% e 50% de timol e entre cerca de 25% e 50% de geraniol, e entre cerca de 25% e 50% de eugenol. O 20 componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol, geraniol e eugenol. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa 25 de agentes patogênicos de plantas.

Em outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol, eugenol e geraniol. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca de 10% e 90% de timol, entre cerca de 10% e 90% eugenol, e 30 entre cerca de 10% e 90% de geraniol, apropriadamente entre

cerca de 25% e 50% de timol e entre cerca de 25% e 50% eugenol, e entre cerca de 25% e 60% de geraniol. O componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol, eugenol e geraniol. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas.

Em outra concretização a composição compreende um componente terpeno compreendendo timol, geraniol, eugenol e citral. Opcionalmente o componente terpeno compreende entre cerca de 10% e 90% de timol, entre cerca de 10% e 90% de geraniol, entre cerca de 10% e 90% de eugenol, e entre cerca de 10 e 90% de citral; apropriadamente o componente terpeno compreende entre cerca de 15% e 50% de timol e entre cerca de 15% e 50% de geraniol, entre cerca de 15% e 50% de eugenol, e entre cerca de 15% e 50% de citral. O componente terpeno pode compreender, opcionalmente, menos de 10% de qualquer outro terpeno, apropriadamente menos de 5%. Em uma concretização o componente terpeno consiste exclusivamente em timol, geraniol, eugenol e citral. Tal composição tem se mostrado altamente eficaz através de uma ampla faixa de agentes patogênicos de plantas.

Foi verificado que as composições de terpeno compreendendo L-carvona são tipicamente menos eficazes no tratamento bacteriano e de fungos/oomiceto em infecções nas plantas. Consequentemente, onde as composições acima se destinam ao tratamento de tais infecções, é geralmente preferível que elas não contenham L-carvona.

As formulações mencionadas sozinhas demonstraram

ser especialmente eficazes no extermínio das bactérias e fungos/oomicetos de plantas. Contudo, é razoável prever que esses altos níveis de eficácia seriam observados com relação aos agentes patogênicos que causam infecções em
5 outros organismos. Consequentemente, as composições da presente invenção são apropriadas para exterminar agentes patogênicos de animais e seres humanos em geral.

Adicionalmente, os terpenos mostraram ser eficazes no extermínio de insetos e araquinídeos e pode ser
10 razoavelmente esperado que as composições de acordo com a presente invenção tenham alta eficácia na mortalidade de tais organismos.

Deve ser observado que os terpenos são também conhecidos pelos nomes do extrato ou óleo essencial que os
15 mesmos contêm, por exemplo, óleo de capim limão (contém citral).

Em um aspecto da presente invenção a composição compreende um componente terpeno conforme definido acima, em suspensão ou solução em um solvente. Apropriadamente o
20 solvente é água.

As soluções de terpeno em água podem ser obtidas por mistura dos terpenos e água em cisalhamento alto (vide, por exemplo WO03/020024).

As suspensões (ou emulsões) de terpenos em água, em
25 associação com um agente tensoativo, são bem conhecidas na arte (vide, por exemplo, WO03/020024 e WO2005/070213). O agente tensoativo pode ser não iônico, catiônico ou iônico. Exemplos de agentes tensoativos apropriados incluem lauril sulfato de sódio, polissorbato 20, polissorbato 80,
30 polissorbato 40, polissorbato 60, éster poliglicerílico,

monooleato de poliglicerila, monocaprilato de
decaglicerila, dicaprilato de propileno glicol,
monoestearato de triglicerol, polioxietileno sorbitano,
monooleato, Tween(R), Span(R)20, Span(R) 40, Span(R) 60,
5 Span(R) 80, Brig 30 ou misturas dos mesmos.

De acordo com um aspecto adicional da presente
invenção é provida uma composição compreendendo uma
partícula oca de glicano ou uma partícula de parede celular
encapsulando um componente terpeno conforme estabelecido
10 acima.

O termo "partícula oca de glicano" conforme
empregado aqui inclui aqui partícula oca compreendendo
glicano como um componente estrutural. Assim,
especificamente, o termo inclui paredes de célula de
15 levedura (nas formas purificada ou bruta) ou partículas
ocas e integrais de glicano. O termo "partícula de parede
celular" se refere a uma partícula compreendendo a parede
de uma célula (em uma forma purificada ou brita), onde o
glicano não é um componente estrutural. As partículas
20 apropriadas incluem as paredes celulares das plantas,
algas, fungos ou bactérias. Partículas de parede celular
geralmente mantêm a forma da célula da qual se derivam e,
assim, como uma partícula oca de glicano, fornecem uma
cavidade central oca apropriada ao encapsulamento do
25 componente terpeno.

É necessário que a partícula oca de glicano ou
partícula de parede celular da presente invenção seja capaz
de encapsular estavelmente o componente terpeno. Em geral
isso significa que a partícula oca de glicano ou partícula
30 de parede celular deve ser capaz de reter sua estrutura

durante incubação do componente terpeno (geralmente o componente terpeno está em uma concentração relativamente alta) e que o componente terpeno seja capaz de migrar para dentro da partícula. As partículas ocas de glicano e as
5 partículas de parede celular são geralmente formadas de materiais relativamente inertes e são porosas e assim, podem ser presumido que, em geral, as partículas ocas de glicano e as partículas de parede celular serão capazes de encapsular um componente terpeno.

10 As composições de acordo com a presente invenção são eficazes contra vários agentes infecciosos incluindo bactérias, vírus, micoplasmas, fungos e/ou nematóides.

O encapsulamento do componente terpeno dentro da partícula oca de glicano ou uma partícula de parede celular
15 pode prover as vantagens que se seguem:

- maximizar a carga de terpeno;
- minimizar a carga não encapsulada;
- controlar a estabilidade da carga;
- controlar a cinética de liberação da carga;
- 20 - criar uma forma sólida de um terpeno líquido para aumentar a massa e uniformidade;
- simplificar o manuseio e aplicação dos terpenos;
- e
- mascarar o cheiro e gosto do terpeno.

25 Partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular especificamente apropriadas são paredes de células de fungos, preferivelmente paredes de célula de levedura. As paredes de célula de levedura são preparações de células de levedura que mantêm a estrutura tridimensional da
30 célula de levedura da qual se derivam. Assim elas possuem

uma estrutura oca que permite que o componente terpeno seja encapsulado dentro das paredes de célula de levedura. As paredes da levedura podem ser derivadas, apropriadamente, das células da levedura de padeiros (disponível na Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). As partículas de parede celular de levedura com propriedades desejáveis podem também ser obtidas na Biorigin (São Paulo, Brasil) sob a marca registrada Nutricell MOS 55. Essas partículas Essas partículas são um extrato seco e disperso de *S. cerevisiae*.

Partículas alternativas são aquelas conhecidas pelas marcas registradas SAF-Mannan (SAF Agri, Minneapolis, MN) e Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, WI). Essas são partículas ocas de glicano que são a corrente residual insolúvel do processo de fabricação do extrato de levedura. Durante a produção dos extratos de levedura, os componentes solúveis de células de levedura parcialmente autolisados são removidos e o resíduo insolúvel é um material apropriado para carga de terpeno. Essas partículas ocas de glicano compreendem aproximadamente 25-35% de beta 1,3-glicano peso/peso. Um atributo chave desses materiais é que eles contêm mais de 10% peso/peso de lipídeo e são muito eficazes na absorção dos terpenos. Além disso, como um produto de corrente residual, eles são uma fonte relativamente barata de partículas ocas de glicano.

Partículas ocas de glicano alternativas que podem ter uma pureza mais alta são aquelas produzidas pela Nutricepts (Nutricepts Inc., Burnsville, MN) e pela ASA Biotech. Essas partículas foram extraídas do álcali, que remove os componentes intracelulares adicionais, bem como remove a camada de nanoproteína externa da parede celular,

rendendo uma partículas com 50-56% de glicano peso/peso.

Partículas ocas de glicano de alta pureza são partículas WGP da Biopolymer Engineering. Essas partículas são extraídas do ácido removendo os componentes de levedura
5 adicionais e rendendo um produto de 75-85% de glicano peso/peso.

Partículas ocas de glicano de pureza muito alta são Adjuvax™ da Alpha-beta Technology, Inc. (Worcester, MA) e glicano microparticulado da Novogen (Stamford, CT). Essas
10 partículas são extraídas de solvente orgânico que remove os lipídeos residuais e assim as partículas compreendem mais de 90% de glicano peso/peso.

Em algumas concretizações, uma partícula de glicano ou partícula de parede celular de alta pureza pode ser
15 necessária, por exemplo, onde o controle estrito sobre os possíveis contaminantes é necessário. Nesses momentos, as partículas pureza mais alta seriam preferidas em relação aos produtos menos puros. Para outras concretizações, as partículas menos puras seriam preferidas por razões
20 econômicas; foi verificado que aquelas partículas também são mais eficazes na absorção dos terpenos.

Preferivelmente a partícula oca de glicano ou partícula de parede celular possui um teor de lipídeos leve, tal como 1 ou 2% de lipídeo peso/peso. Um teor de
25 lipídeo leve pode aumentar a capacidade da partícula de encapsular o componente de terpeno. Preferivelmente, o teor de lipídeo da partícula oca de glicano ou partícula de parede celular é de 5% peso/peso ou maior, mais preferivelmente de 10% peso/peso ou maior.

30 Opcionalmente o componente terpeno a ser

encapsulado pode estar associado a um agente tensoativo. O agente tensoativo pode ser não iônico, catiônico ou aniônico. Exemplos de agentes tensoativos apropriados são listados acima. O agente tensoativo atua para manter o
5 componente terpeno em uma emulsão e também ajuda no encapsulamento do componente terpeno dentro da partícula oca de glicano ou partícula de parede celular. O agente tensoativo pode também atuar para modificar ou controlar as características de liberação do terpeno da partícula oca de
10 glicano ou partícula de parede celular.

O termo "terpeno" conforme empregado aqui se refere não apenas aos terpenos da fórmula $(C_5H_8)_n$, porém também engloba os derivados de terpeno, tais como, aldeídos de terpeno ou polímeros de terpeno. Terpenos naturais e
15 sintéticos estão incluídos, por exemplo, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos. Além disso, referência a um nome simples de um composto englobará os vários isômeros daquele composto. Por exemplo, o termo citral inclui o isômero cis citral-a (ou geranial)
20 e o isômero trans citral-b (ou neral).

Em uma concretização o componente terpeno inclui um ou mais terpenos que contêm oxigênio. Citral, por exemplo citral 95, é um terpeno $C_{10}H_{16}$ oxigenado, $C_{10}H_{16}O$ CAS número 5392-40-5 (3,7-dimetil-2,6-octadien-1- al). A suspensão
25 estável do citral pode ser formada até cerca de 2,500 ppm. O citral pode ser obtido em uma solução de até cerca de 500 ppm. Uma suspensão estável de partículas ocas de glicano incorporando citral de 25 ppt pode ser obtida.

A composição encapsulada de acordo com um aspecto
30 da presente invenção pode compreender de 1 a 99% de

terpenos em volume, 0 a 99% de agente tensoativo em volume e 1 a 99% de partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular. Mais especificamente a composição pode compreender cerca de 10% a cerca de 67% de terpenos
5 peso/peso, cerca de 0,1-10% de agente tensoativo e cerca de 40-90% de partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular.

Apropriadamente a composição da presente invenção compreende cerca de 500 a cerca de 10.000 ppm de partículas
10 ocas de glicano ou partículas de parede celular, onde as partículas contêm cerca de 1 a cerca de 67% do componente terpeno. Preferivelmente a composição compreende cerca de 1.000 a cerca de 2.000 ppm partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular, onde as partículas contêm
15 cerca de 10 a cerca de 50% de componente terpeno.

As concentrações de partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular encapsulando terpenos de 1 ,
5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 125, 130,
140, 150, 160, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350,
20 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650,
675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950,
975, 1.000, 1.1.00, 1.250, 1.375, 1.425, 1.500, 1.600,
1.750, ou 2.000 ppm podem ser usadas como concentrações eficazes nas composições e métodos da presente invenção.
25 Concentrações mesmo maiores (até 25 ppt, isto é, partes por mil) podem ser obtidas e podem ser úteis na presente invenção.

A composição da presente invenção pode compreender entre cerca de 1 ppm e cerca de 25 ppt (25.000 ppm) do
30 componente terpeno, preferivelmente 100 a 2.000 ppm do

componente terpeno, por exemplo, 250, 500, 1.000, 2.000 ppm do mesmo.

Os terpenos, agentes tensoativos e outros componentes da invenção podem ser prontamente obtidos ou sintetizados usando técnicas geralmente conhecidas na química sintética.

É altamente preferido que os terpenos usados na presente invenção, por questões de segurança e regulação, sejam pelo menos terpenos de classificação alimentícia (conforme definido pelo United States FDA ou órgão regulador nacional equivalente fora dos Estados Unidos da América.

Opcionalmente a composição pode compreender outros compostos ativos de classificação alimentícia, além do componente terpeno, por exemplo outros agentes antimicrobianos, enzimas ou semelhantes.

Opcionalmente a composição pode compreender, adicionalmente, um agente ativo além do componente terpeno, por exemplo um agente antimicrobiano, um agente antifungo, um agente inseticida, um agente antiinflamatório, um anestésico ou semelhante. Os agentes apropriados incluem:

- Antifungos: hidrolases de parede celular (presumindo que elas não degradem a partícula oca de glicano ou partícula de parede celular), inibidores de síntese da parede celular, antifungos padrão.

-Antibacterianos: anti-sépticos, hidrolases de parede celular, inibidores de síntese, antibióticos.

- Inseticidas: inseticidas naturais, quitinase.

A composição pode compreender um antioxidante para reduzir a oxidação do terpeno. Um exemplo de tal

antioxidante pode ser óleo de alecrim, vitamina C ou vitamina E.

A composição encapsulada da presente invenção pode estar na forma de um pó seco. A composição pode ser provida
5 em combinação com um veículo agrícola, veículo alimentício ou farmaceuticamente aceitável ou excipiente em uma forma semelhante a líquido, sólido ou gel.

Para composições sólidas, os veículos apropriados incluem classificações farmacêuticas de manitol, lactose,
10 amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glicose, sacarose, carbonato de magnésio e semelhantes. A formulação se encontra apropriadamente na forma de comprimido ou microesfera. Um veículo apropriado também seria um material alimentício humano ou animal.
15 Adicionalmente, os veículos agrícolas convencionais também seriam empregados.

Uma microesfera, comprimido ou outra forma sólida da composição pode também conter, preferivelmente, um agente de dispersão, que promove a dispersão da composição
20 quando colocada em um líquido, por exemplo, água. Agentes de dispersão apropriados incluem goma xantana, maltodextrina, alginatos ou semelhantes.

Composições líquidas podem ser preparadas, por exemplo, por dispersão da composição em água, salmoura,
25 dextrose aquosa, glicerol, etanol ou semelhantes, na forma de uma solução ou suspensão. Caso desejado, essas composições podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como, agentes de umectação ou emulsionantes, agentes de tamponamento de pH (por exemplo,
30 acetato de sódio, monolaurato de sorbitano, acetato de

trietanolamina sódio ou oleato de trietanolamina). Os métodos para preparação de tais composições líquidas são conhecidos ou ficarão claros aos versados na técnica, vide, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy; Lippincott, Williams & Wilkins; (15 de dezembro de 2000) - que é incorporado aqui como referência. Novamente, a composição líquida seria preparada por dispersão da composição em um material alimentício para humanos ou animais. Adicionalmente, um excipiente agrícola líquido apropriado seria utilizado.

Os comprimidos ou grânulos são geralmente preferidos para administração oral. Pós finos ou grânulos podem conter agentes de diluição, dispersão e/ou ativos em superfície e podem ser apresentados em água ou em um xarope. As cápsulas ou sachês podem conter, convenientemente, a composição em um estado seco. Soluções não aquosas ou suspensões da composição também são apropriadas e podem conter agentes de suspensão. Quando desejado ou necessário, agentes saborizantes, preservantes, de suspensão, espessantes ou emulsionantes podem ser incluídos. Naturalmente, seria apropriado empregar um material alimentício como um método de distribuição oral.

A administração parenteral é geralmente caracterizada por injeção. Para os injetáveis, será apreciado que, em geral, todos os materiais usados na composição e qualquer excipiente empregado devem ser de classificação farmacêutica. Os injetáveis podem ser preparados em formas convencionais, tanto como soluções líquidas, emulsões ou suspensões, formas sólidas apropriadas para dissolução, suspensão em líquido antes da

injeção ou como emulsões. Uma abordagem alternativa para administração parenteral envolve o uso de uma liberação lenta ou sistema de liberação prolongada, tal que, um nível constante de dosagem seja mantido. Vide, por exemplo, a
5 Patente US número 3.710.795, que é incorporada aqui como referência. As preparações para administração parenteral podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos apropriados. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais (tais
10 como, óleo de oliva), e ésteres orgânicos injetáveis (tais como, oleato de etila). Os veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões incluindo salmoura e meios tamponados. Outros veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose
15 de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, óleos de Ringer lactados ou fixados. Os veículos para uso intravenoso incluem reabastecedores de fluido e nutriente, reabastecedores de eletrólito (tais como aqueles com base na dextrose de Ringer) e semelhantes.

20 Preservantes e outros aditivos podem também estar presentes, tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelação, gases inertes e semelhantes.

 Para administração tópica podem ser usados
25 líquidos, suspensão, loções, cremes, géis, ungüentos, gotas, supositórios, aspersões e pós. Os veículos farmacêuticos convencionais, bases aquosas, em pó ou oleosas, espessantes e semelhantes podem também ser empregados conforme necessário ou desejável.

30 A presente invenção provê, adicionalmente, um

método para preparação da partícula oca de glicano ou partícula de parede celular encapsulando um componente terpeno, o dito método compreendendo as etapas de:

a) provisão de um componente terpeno;

5 b) provisão de uma partícula oca de glicano ou partícula de parede celular;

c) incubação do componente terpeno com a partícula de glicano ou partícula de parede celular sob condições apropriadas para encapsulamento do terpeno; e

10 d) recuperação da partícula oca de glicano ou partícula de parede celular encapsulando o componente terpeno.

 Opcionalmente, o método acima pode compreender, adicionalmente, a etapa de secagem como as partículas encapsulando o componente terpeno. A secagem podem ser
15 obtida de várias formas e pode ser feita menção à liofilização, secagem em leito fluidificado, secagem em tambor ou secagem por aspersão, todas sendo processos bem conhecidos.

20 Na etapa a) do método acima, o componente terpeno é provido apropriadamente como uma suspensão em um solvente aquoso e, opcionalmente, na presença de um agente tensoativo. Apropriadamente o solvente é água. Um agente tensoativo apropriado é o Tween-80 (monooleato de
25 polioxietilenosorbitano) e preferivelmente o agente tensoativo está presente em uma concentração de cerca de 0,1 a 10% em volume da mistura de reação total, mais preferivelmente cerca de 1%. Alternativamente, o componente terpeno pode ser provido como uma solução verdadeira em um
30 solvente, por exemplo, água. A solução verdadeira de

terpeno em água pode ser obtida por mistura do terpeno em água em cisalhamento alto, até uma solução verdadeira ser obtida. A publicação número WO 03/020024 provê adicionalmente detalhes da formação das soluções
5 verdadeiras de terpenos em água.

Na etapa b) do método acima, a partícula oca de glicano ou partícula de parede celular é provida apropriadamente, como uma suspensão em água ou outro líquido apropriado. Apropriadamente a suspensão compreende,
10 aproximadamente, 1 a 1.000 mg de partículas por mL, preferivelmente 200 a 400 mg/mL. Alternativamente, as partículas podem ser providas como um pó seco e adicionadas à suspensão do agente tensoativo-terpeno.

Alternativamente, as partículas são providas em
15 líquido suficiente para hidratar minimamente as mesmas, porém não em excesso significativo. O termo "volume hidrodinâmico" (HV) é empregado para descrever o volume do líquido necessário para hidratar minimamente as partículas. Assim, apropriadamente, as partículas são providas com um
20 volume variando do HV e um volume de uma vez e meia o HV (1,5 HV). Isto torna a etapa de secagem subsequente mais eficiente. Também, quando um volume baixo de líquido for empregado (isto é, ao redor de HV a 1,5 HV) é também possível extrusar o produto acabado na forma de
25 microesferas ou macarrão, que é conveniente para a secagem do leito fluidificado.

Foi verificado que o componente terpeno pode ser encapsulado por uma partícula oca de glicano ou partícula de parede celular a temperatura ambiente. A razão de
30 encapsulamento contudo, é aumentada para 37°C ou acima,

porém a temperatura seria mantida abaixo do ponto de ebulição ou temperatura de desnaturação de qualquer componente da composição. As condições apropriadas para a etapa c) do método acima são, portanto, pressão atmosférica a uma temperatura de 20 a 37°C (contudo, uma temperatura maior pode ser empregada). A otimização das condições para uma reação de encapsulamento específica serão uma matéria de experimentação de rotina.

A presente invenção provê, adicionalmente, um método para exterminar um microorganismo, o dito método compreendendo a etapa de;

a) contato do dito microorganismo com uma composição compreendendo um componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de um terpeno selecionado do grupo consistindo em timol, eugenol, geraniol e citral.

As composições apropriadas para uso nesse método são estabelecidas acima.

Em um aspecto a presente invenção provê um método para tratar ou prevenir infecção em uma planta, o dito método compreendendo a etapa de;

a) administração de uma dose terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo um componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de um terpeno selecionado do grupo consistindo em timol, eugenol, geraniol e citral adicionada à planta ou solo próximo à planta.

Em uma concretização a presente invenção provê um método para tratamento ou prevenção de infecção bacteriana nas plantas. As infecções bacterianas nas plantas incluem

Erwinia amylovora (crestamento da maçã), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (crestamento bacteriano aureolado do feijão) e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (crestamento bacteriano simples do feijão). A presente
5 invenção representa, conseqüentemente, um avanço significativo, uma vez que nenhuma composição ou método disponível trata satisfatoriamente ou previne tais infecções bacterianas nas plantas.

Em outra concretização a presente invenção provê um
10 método para tratamento ou prevenção de infecções por fungo/oomiceto nas plantas, especialmente aquelas afetando a superfície da planta. Tais infecções incluem míldio felpudo (*Plasmopara viticola*), míldio pulverulento (*Uniclinula necator*) ou apodrecimento da raiz por botrite
15 (*Botrytis cinerea*); essas infecções afetando especialmente os vinhedos.

As composições compreendendo um componente terpeno consistindo em uma mistura de mais de um terpeno selecionado do grupo consistindo em timol, eugenol,
20 geraniol e citral mostraram serem eficazes no tratamento das infecções em plantas. Especificamente, as composições compreendendo um componente terpeno consistindo em uma combinação de timol e um ou mais dentre eugenol, geraniol, citral mostraram ser especialmente eficazes n tratamento de
25 um amplo espectro das infecções em plantas.

As composições compreendendo os seguintes componentes terpeno mostraram ser especialmente eficazes no tratamento ou prevenção de infecções bacterianas em plantas:

30 - timol e citral;

- timol e geraniol; ou
- timol e eugenol.

As composições compreendendo os seguintes componentes terpeno mostraram ser especialmente eficazes no
5 tratamento ou prevenção infecções por fungos/oomicetos em plantas:

- timol e geraniol;
- timol e eugenol; ou
- timol, eugenol e citral.

10 Outras composições que mostraram ser altamente eficazes no tratamento e prevenção de infecções em plantas em geral incluem os seguintes componentes terpeno:

- timol, geraniol e citral;
- timol, geraniol e eugenol; ou
- 15 - geraniol, timol, eugenol e citral.

São de interesse específico no controle das doenças das plantas, as composições que podem prevenir ou tratar uma faixa ampla de doenças de plantas. Com relação a isso, as composições que se seguem mostraram ser especificamente
20 eficazes:

- timol e citral;
- timol e geraniol; ou
- timol e eugenol.

A presente invenção adicionalmente provê o emprego
25 de qualquer uma das composições acima no tratamento ou prevenção de infecção na planta.

Outra infecção na planta que pode ser tratada ou prevenida de acordo com a presente invenção pode ser causada por um ou mais dentre os que se seguem: *Aspergillus*
30 *fumigatus*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Rhizoctonia solani*,

Colletotrichum graminicola *Phytophthora infestans* ou *Penicillium sp.* Os terpenos sozinhos na suspensão ou solução, contudo, são algo instáveis e podem degradar rapidamente no ambiente do solo, assim perdendo sua
5 eficácia. A incorporação de um componente terpeno na partícula oca de glicano ou partícula de parede celular pode reduzir a taxa de liberação e degradação do terpeno, assim aumentando a duração da ação do terpeno no solo ou na planta. Consequentemente é preferido que o componente
10 terpeno seja encapsulado conforme detalhado acima.

Uma vantagem de um tratamento à base de terpeno das plantas é que ele pode ser aplicado pouco antes da colheita.

Muitos tratamentos convencionais requerem um
15 período longo antes de reentrarem na área tratada (geralmente 3 semanas). Isso significa que um surto de uma doença da planta pouco antes da colheita não poderá ser tratado com tratamentos convencionais, assim não sendo possível retirar a colheita no tempo desejado. As
20 composições da presente invenção podem ser aplicadas a qualquer tempo até a colheita, por exemplo, 21 dias antes da colheita, 14 dias antes da colheita, 7 dias antes da colheita ou mesmo 3 dias ou menos antes da colheita.

A prevenção das infecções nas plantas pode ser
25 obtida por tratamento das plantas com as composições da presente invenção, de modo regular, como uma medida profilática.

Apropriadamente a composição da presente invenção é aplicada por aspersão. Isso é especificamente apropriado
30 para tratamento de uma doença de planta que afeta a

superfície da planta. Para aspersão, uma preparação compreendendo 2 g/L de uma composição em água pode ser usada. Concentrações de 2 a 4 g/L são especialmente eficazes, e concentrações maiores de 4 g/L podem também ser
5 necessárias. Obviamente, é importante que a concentração da composição empregada seja suficiente para exterminar ou inibir o agente causador da doença, porém não tão alta para prejudicar a planta tratada.

Quando as plantas são aspergidas a uma taxa de 100
10 L/10000 m² ou mais, isso geralmente pode ser apropriado para revestir a planta. Tipicamente, uma taxa de 100 a 500 L/10000 m² pode ser suficiente para colheitas de plantas menores que não possuem folhagem extensiva; embora taxas maiores possam naturalmente ser também usadas conforme
15 necessário. Para plantas maiores com folhagem extensiva (por exemplo, plantas de colheita pereniais, tais como, uvas ou outras plantas de fruto) as taxas de 500 L/10000 m² ou maiores são geralmente apropriadas para revestimento das plantas. Preferivelmente, uma taxa de 900/10000 m² ou mais,
20 mais preferivelmente 1.200 L/10000 m² ou maior é empregada para garantir boa cobertura. Quando os vinhedos são tratados, uma taxa de 1.200 L/10000 m² provou ser apropriadamente eficaz.

A composição da presente invenção pode ser
25 alternativamente aplicada através de irrigação. Isso é especificamente apropriado para tratar os nematóides ou outros agentes patogênicos do solo ou parasitas.

A presente invenção adicionalmente provê um método para prevenir ou tratar uma infecção em um paciente, o
30 método compreendendo a etapa de:

a) administração ao paciente em uma dose terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo um componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de um terpeno selecionados do grupo consistindo em timol, eugenol, geraniol e citral à planta ou ao solo em proximidade com a planta.

Composições apropriadas são aquelas definidas em mais detalhes acima.

A infecção do paciente pode ser causada por qualquer agente infeccioso. Exemplos desses agentes infecciosos incluem, porém não estão restritos ao *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycoplasma iowae*, *Penicillium sp.*, e *Mycoplasma pneumoniae*.

Para administração interna, a composição pode ser administrada oral, vaginal, retalmente, por inalação ou por vias parenterais, por exemplo, por via intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intraretal, intra-arterial, intralinfática, intravenosa, intratecal e intra-traqueal. Formulações apropriadas da composição para essas vias são reveladas acima.

Para tratamento externo, a composição pode ser aplicada topicamente, por exemplo, como um creme ou ungüento ou como um pó seco para tratamento de uma ferida.

A quantidade de terpeno adicionada no método acima claramente seria suficiente para obter o resultado desejado, isto é, prevenção e/ou tratamento da infecção, porém não estaria em um nível que induza sérios efeitos tóxicos no paciente.

A quantidade de terpeno administrada naturalmente, dependerá do modo administração, do paciente sendo

tratado, isto é, seu peso, sua idade, condição, sexo e extensão da doença no indivíduo e do julgamento do médico que prescreve. A dose, programação das doses e vias de administração podem variar. Um versado na técnica
5 prontamente seria capaz de determinar uma quantidade antiinfecciosa para uma dada aplicação, com base no conhecimento geral da técnica e dos procedimentos nos Exemplos fornecidos abaixo. Seria observado que o termo "paciente" conforme usado aqui, se refere a qualquer
10 indivíduo, tanto ser humano quanto indivíduo, ao qual o tratamento se aplica. Assim, o paciente pode ser um animal domesticado (por exemplo, gato, cachorro, etc.), animal de criação (por exemplo, gado, cavalo, porco, carneiro, cabra, etc.), animais de laboratório (por exemplo, camundongo,
15 coelho, rato, porquinho da índia, etc.) aves e peixe. Apropriadamente, o indivíduo é um mamífero e especialmente um primata, por exemplo, um ser humano.

Em outra concretização a presente invenção provê um método para exterminar insetos ou araquinídeos, o dito
20 método compreendendo a etapa de:

a) administração ao dito inseto ou araquinídeo em uma dose eficaz de uma composição compreendendo componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de 1 terpeno selecionados do grupo consistindo em
25 timol, eugenol, geraniol e citral.

Insetos que podem ser exterminados de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, formiga, cupim, piolho, pulgão, pulga, gafanhoto e tripse. Araquinídeos que podem ser exterminados, de acordo com a presente invenção
30 incluem, por exemplo, ácaros, aranhas e carrapatos.

Em uma concretização adicional a presente invenção também provê uma composição compreendendo um componente terpeno conforme estabelecido acima na prevenção ou tratamento de uma infecção em um paciente ou uma planta.

5 Composições apropriadas são aquelas definidas em maiores detalhes acima.

Em uma concretização adicional a presente invenção provê o emprego de uma composição compreendendo um componente terpeno conforme estabelecido acima na
10 fabricação de um medicamento para o tratamento de infecção causada por um microorganismo. Composições apropriadas são aquelas definidas em maiores detalhes acima.

A presente invenção será descrita agora, adicionalmente, com referência aos exemplos que se seguem,
15 não limitantes e figuras onde:

A figura 1 representa uma micrografia de luz das paredes vazias de célula de levedura;

A figura 2 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando L-carvona;

20 A figura 3 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando citral;

A figura 4 representa uma micrografia de luz de emulsão de terpeno;

A figura 5 representa uma micrografia de luz das
25 paredes da célula de levedura em volume hidrodinâmico (HV) de água;

A figura 6 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em cinco vezes o volume hidrodinâmico (HV) de água;

30 A figura 7 representa uma micrografia de luz das

paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em HV de água;

A figura 8 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em HV
5 mais 5% de água;

A figura 9 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em HV mais 10% de água;

A figura 10 representa uma micrografia de luz das
10 paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em HV mais 20% de água;

A figura 11 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em HV mais 30% de água;

15 A figura 12 representa uma micrografia de luz das paredes da célula de levedura encapsulando terpeno em HV mais 40% de água.

A figura 13 representa uma micrografia de luz mostrando a dispersão de partículas ocas de glicano secas
20 encapsulando um componente terpeno sem goma xantana.

A figura 14 representa uma micrografia de luz como na figura 13 onde está incluído 0,07 g de goma xantana a 1%.

25 A figura 15 representa uma micrografia de luz como na figura 13 onde está incluído 0,14 g de goma xantana a 1%.

A figura 16 representa uma micrografia de luz como na figura 13 onde está incluído 0,28 g de goma xantana a 1%.

30 A figura 17 representa uma micrografia de luz como

na figura 13 onde está incluído 0,55 g de goma xantana a 1%.

A figura 18 representa uma micrografia de luz como na figura 13 onde estão incluídos 1,1 g de goma xantana a 1%.

A figura 19 representa uma micrografia de luz como na figura 13 onde estão incluídos 2,2 g de goma xantana a 1%.

A figura 20 representa uma micrografia de luz como na figura 13 onde estão incluídos 4,4 g de goma xantana a 1%.

A figura 21 mostra uma representação esquemática das áreas de tratamento nos sítios 18 e 20.

A figura 22 mostra uma representação esquemática das áreas de tratamento nos sítios 18 e 20.

A figura 23 mostra uma representação esquemática das áreas de tratamento no sítio 7.

A figura 24 mostra um gráfico mostrando uma comparação das formulações de terpeno encapsulado versus não encapsulado.

As figuras 26a-d mostram um gráfico representando as taxas da doença do ácaro em 4 replicações de tomateiro.

A figura 27 é uma fotografia mostrando uma comparação entre uma planta tratada com YP-4 e um controle.

Os exemplos que se seguem são providos para permitir, adicionalmente, que os versados na técnica comum realizem a presente invenção. Eles são puramente exemplares e não se destinam a limitar o escopo da invenção. A menos que indicado de outra forma, as partes são partes por volume ou partes em peso, conforme indicado, a temperatura

é em graus Celsius, (°C) ou é a temperatura ambiente e a pressão é ou está próxima à atmosférica. Existem inúmeras variações e combinações das composições e condições para fabricação e uso das mesmas, por exemplo, concentrações de
5 componente, solventes desejados, misturas de solventes, temperaturas, pressões e outras variações e condições que podem ser usadas para otimizar os resultados obtidos das composições e métodos descritos. Apenas experimentação razoável e de rotina será necessária para otimizar os
10 mesmos.

Exemplo 1 - Demonstração da Carga de Terpeno nas Partículas de Levedura de Padeiro e Partículas de Glicano de Levedura Purificadas

O protocolo que se segue foi realizado para
15 demonstrar que os terpenos seriam carregados dentro das paredes de célula de levedura e outras partículas ocas de glicano.

Emulsões de citral e L-carvona foram preparadas por mistura de 150 µL de terpeno com 100 µL de Tween-80 a 10%
20 em água e 250 µL de água.

Partículas de levedura de padeiro (YP) ou partículas de glicano de levedura Levacan™ (YGP), disponíveis na Savory Systems International, Inc., Branchburg, NJ, foram misturadas com água para formar uma
25 suspensão de 250 mg/mL.

500 µL de YP ou suspensão de YGP e 250 µL de emulsão de terpeno foram misturados em conjunto e incubados por toda noite sob agitação constante. 500 µL de YP ou suspensão de YGP e 500 µL de água foram usados como um
30 controle. As partículas foram então lavadas com água até

não apresentarem mais emulsão externa. As preparações de partícula foram então congeladas e liofilizadas até estarem secas.

As partículas foram então reidratadas e examinadas sob a luz do microscópio. Os resultados são mostrados nas figuras 1 a 4.

A figura 1 mostra estruturas esféricas com uma área escura no centro, essas sendo partículas vazias e ocas de glicano. As figuras 2 e 3 mostram estruturas esféricas com uma aparência intumescida com uma cor clara no interior, essas sendo partículas com terpeno encapsulado na cavidade central na figura 2 e L-carvona na figura 3. Nas figuras 2 e 3, pequenas bolhas de terpeno livre podem também ser vistas, por exemplo, na parte superior da figura 2, à esquerda do centro. A figura 4 mostra a emulsão de terpeno como pequenas bolhas de terpeno suspenso em água.

Exemplo 2 - Determinação dos Níveis máximos de Carga de Citral e L-carvona nas Partículas de Parede Celular de Levedura de Padeiro (YP)

O protocolo que se segue foi realizado para determinar as quantidades máximas de terpenos que poderiam ser carregadas dentro da YP.

- Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas por sonicação de 4,5 g de terpeno com 0,3 mL de água.

- solução de Tween-80 a 10% foi preparada por sonicação de 4,5 g de Tween-80 em 40,5 mL de água.

- Suspensão de YP foi preparada por mistura de YP com água para formar 20 mg/mL de suspensão.

- Reações de encapsulamento foram estabelecidas conforme descrito na Tabela 1.

Emulsão de citral ou L-carvona-água foi misturada com YP e agente tensoativo Tween-80 por toda a noite a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando na camada aquosa foi classificado. Os resultados são mostrados na coluna à direita rotulada terpeno livre da Tabela 1.

A expressão "terpeno livre" se refere à presença visível do terpeno na mistura de reação centrifugada. A ausência do terpeno livre indica absorção completa do terpeno pelas partículas. O volume de terpeno mais alto absorvido pelas partículas, conforme evidenciado pela ausência do terpeno livre, foi registrado como o volume máximo da emulsão de terpeno absorvido.

15 Tabela 1

Tubo	20 mg/mL YP	Emulsão de terpeno	Volume	Tween-80 a 10%	Terpeno Livre
	μL		μL	μL	
1	500	-	-	500	-
2	500	L-carvona	0,5	500	-
3	500	L-carvona	1,65	500	-
4	500	L-carvona	5	495	-
5	500	L-carvona	16,5	483,5	-
6	500	L-carvona	50	450	+
7	500	L-carvona	165	335	+
8	500	L-carvona	500	-	+
9	500	Citral	0,5	500	-
10	500	Citral	1,65	500	-
11	500	Citral	5	495	-
12	500	Citral	16,5	483,5	+/-

13	500	Citral	50	450	+
14	500	Citral	165	335	+
15	500	Citral	500	-	+

Conforme pode ser visto dos resultados, YP é capaz de absorver e encapsular pelo menos 16,5 µL de emulsão de terpeno L-carvona ou pelo menos 5 µL de emulsão citral por 10 mg de YP.

5 Exemplo 3 - Demonstração do Carregamento de Terpeno
Aperfeiçoado com Agente Tensoativo e Determinação da Razão
Ótima de Tween-80:Terpeno

O protocolo que se segue foi realizado para demonstrar que a presença de agente tensoativo aperfeiçoa
10 carga de terpeno e determina o nível mínimo de agente tensoativo Tween-80 necessário a reação de carga de terpeno na YP.

- Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas por sonicação de 4,5 g de terpeno com 0,3 mL de água.

15 - Solução de Tween-80 a 10% foi preparada por sonicação de 4,5 g de Tween-80 em 40,5 mL de água.

- Suspensão de YP de padeiro foi preparada por mistura da YP com água para formar 250 mg/mL de suspensão.

Reações de carregamento foram estabelecidas
20 conforme mostrado na Tabela 2 a seguir.

Emulsão de citral ou L-carvona-água foi misturada com YP com 0 - 10% volume/volume de agente tensoativo Tween-80 por toda a noite a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e
25 o aparecimento de terpeno livre flutuando na camada aquosa foi classificado. Os resultados são mostrados na coluna à direita rotulada como terpeno livre da Tabela 2.

A expressão "terpeno livre" se refere à presença visível do terpeno na mistura de reação centrifugada. A ausência do terpeno livre indica absorção completa e encapsulamento de terpeno pela YP. O volume de terpeno mais alto absorvido pela YP, conforme evidenciado pela ausência do terpeno livre, foi registrado como o volume máximo da emulsão de terpeno absorvido.

Tabela 2

Tubo	250 mg/mL YP	Emulsão de terpeno	Volume	Tween-80 a 10%	Água	Terpeno Livre
	ML		μL	μL	μL	
1	500	-	-	-	500	-
2	500	L-carvona	150	0	350	S1
3	500	L-carvona	150	5	345	S1
4	500	L-carvona	150	10	340	S1
5	500	L-carvona	150	33	317	S1
6	500	L-carvona	150	100	250	-
7	500	L-carvona	150	200	150	-
8	500	L-carvona	150	350	-	-
9	500	L-carvona	400	0	100	++
10	500	L-carvona	400	5	95	++
11	500	L-carvona	400	10	90	++
12	500	L-carvona	400	33	77	++
13	500	L-carvona	400	100	-	+
14	500	L-carvona	400	20 μL 100%	30	+
15	500	Citral	113	0	387	+
16	500	Citral	113	5	382	+
17	500	Citral	113	10	377	+

18	500	Citral	113	33	354	S1
19	500	Citral	113	100	287	S1
20	500	Citral	113	200	187	-
21	500	Citral	113	350	37	-
22	500	Citral	250	0	250	++
23	500	Citral	250	5	245	++
24	500	Citral	250	10	240	++
25	500	Citral	250	33	217	+
26	500	Citral	250	100	150	+
27	500	Citral	250	20 μ L 100%	230	+

S1 = leve

Conforme pode ser visto dos resultados, uma concentração de Tween-80 de 1% (isto é, 100 μ L de Tween-80 a 10% em 1.000 μ L da mistura de reação) é suficiente para permitir absorção completa de terpeno na reação acima. Um Tween-80 a 2% não melhora os resultados, considerando-se que uma concentração de 0,33% de terpeno livre foi observada. Isso indica que:

Os terpenos são absorvidos nas partículas de YP, na ausência de um agente tensoativo, porém, a presença de agente tensoativo aumenta significativamente a absorção do terpeno.

Uma concentração de Tween-80 de cerca de 1% é ótima para carga de YP, uma vez que assegura o carregamento apropriado, enquanto maximizando a carga de terpeno das partículas de YP.

Exemplo 4 - Determinação do Carregamento Máximo de Terpeno e Encapsulamento em Níveis Altos de Partículas de Parede Celular de Levedura (YP)

O protocolo que se segue foi realizado para determinar as quantidades máximas de terpenos que poderiam ser carregadas dentro das YP em níveis altos de YP.

- As emulsões de L-carvona e citral foram preparadas por sonicação de 4,5 g de terpeno com 3 mL de Tween a 1%.

- Solução de Tween-80 a 5% foi preparada por sonicação de 0,5 g de Tween-80 em 9,5 mL de água.

- A suspensão de YP foi preparada por mistura de YP com água para formar 250 mg/mL de suspensão.

- As reações de encapsulamento foram estabelecidas conforme mostrado na Tabela 3.

Emulsão de citral ou L-carvona-água foi misturada com YP e agente tensoativo Tween-80 por toda a noite a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando na camada aquosa foi classificado. Os resultados são mostrados na coluna à direita rotulada como terpeno livre da Tabela 3.

A expressão "terpeno livre" se refere à presença visível do terpeno na mistura de reação centrifugada. A ausência do terpeno livre indica absorção completa de terpeno pela YP. O volume de terpeno mais alto absorvido pela YP, conforme evidenciado pela ausência do terpeno livre, foi registrado como o volume máximo da emulsão de terpeno absorvido.

Tabela 3

Tubo	250 mg/mL YP	Emulsão de terpeno	Volume	Tween-80 a 1%	Terpeno Livre
	μL		μL	μL	

1	500	-	-	500	-
2	500	L-carvona	15	485	-
3	500	L-carvona	37,5	462,5	-
4	500	L-carvona	75	425	-
5	500	L-carvona	112,5	387,5	-
6	500	L-carvona	150	350	Sl+
7	500	L-carvona	225	275	+
8	500	L-carvona	450	50	+
9	500	Citral	15	485	-
10	500	Citral	37,5	462,5	-
11	500	Citral	75	425	-
12	500	Citral	112,5	387,5	Sl+
13	500	Citral	150	350	+
14	500	Citral	225	275	+
15	500	Citral	450	50	+

Conforme pode ser visto dos resultados na Tabela 3, YP é capaz de absorção e encapsulamento dos terpenos em concentração alta de YP. YP absorveu e encapsulou pelo menos 112,5 µL de emulsão de terpeno L-carvona ou pelo menos 75 µL de emulsão de citral por 125 mg de YP. Isso demonstra que a reação de encapsulamento de terpeno é independente da concentração de YP dentro das faixas testadas.

Exemplo 5 - Classificação das Partículas Disponíveis

10 Comercialmente para Absorção de Terpeno

O protocolo que se segue foi realizado para analisar as propriedades de carga dos diferentes tipos de partículas. As partículas estudadas eram partículas de parede celular de levedura de padeiro (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO), Nutrex™ Walls (Sensient

Technologies, Milwaukee, WI), SAF-Mannan™ (SAF Agri, Minneapolis, MN), Nutricept Walls(TM) (Nutricepts Inc., Burnsville, MN), Levacan™ (Savory Systems International, Inc., Branchburg, NJ) e WGP(TM) (Alpha-beta Technology, Inc. Worcester, MA).

As emulsões de L-carvona e citral foram preparadas por sonicação de 7 g de terpeno + 3 mL de Tween-80 a 3,3%.

A Tabela 4 a seguir compara a pureza com o número de partículas de levedura por mg e a razão peso/volume de sólidos embalados.

Tabela 4

Partícula de levedura	% de pureza de Beta 1,3-glicano	Número de partículas/mg	Mg/mL de partículas
Padeiro	11,2	4 x 10 ⁷	250
Nutrex	24,5	1,7 x 10 ⁸	58,8
SAF Mannan	33,4	2,4 x 10 ⁸	41,7
Nutricepts	55,7	5,2 x 10 ⁸	37
Levacan	74,6	1 x 10 ⁸	19,2
WGP	82,1	3,5 x 10 ⁸	10

A Tabela 4 apresenta conclusão de que o número de partículas por mg é inversamente proporcional à pureza. Assim, o número de partículas por mg de WGP é quase dez vezes maior que o da YP de padeiro.

As suspensões de YP foram preparadas como se segue:

- A suspensão de partícula da parede de célula de levedura (YP) de padeiro foi preparada por mistura de 250 mg de YP/mL de Tween-80 a 1%.

- A suspensão de Nutrex foi preparada por mistura de 163 mg de Nutrex YGP/mL de Tween-80 a 1%.

- A suspensão de SAF Mannan foi preparada por mistura de 234 mg de Biospringer YGP/mL de Tween-80 a 1%.

- A suspensão de Nutricepts foi preparada por mistura de 99 mg de Nutricepts YGP/mL de Tween-80 a 1%.

5 - A suspensão de Levacan foi preparada por mistura de 217 mg de Lev YGP/mL de Tween-80 a 1%.

- A suspensão de WGP foi preparada por mistura de 121 mg de WGP YGP/mL de Tween-80 a 1%.

O volume embalado das partículas acima é idêntico,
10 o que significa que os números de partículas iguais foram classificados.

As reações de carregamento foram estabelecidas conforme mostrado na Tabela 5 e deixadas incubar por toda a noite. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10
15 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando na camada aquosa, além da cor dos terpenos encapsulados na microesfera foram classificadas. Os resultados são mostrados nas duas colunas à direita da Tabela 5. O volume de terpeno mais alto absorvido pelas partículas conforme
20 evidenciado pela ausência do terpeno livre foi registrado como o volume da emulsão de terpeno absorvido.

Tabela 5

Tubo	Partícula	Conc. mg/mL	μL	Emulsão de terpeno	Volume μL	Tween-80 a 1% 80 μL	Terpeno livre	Cor
1	Padeiro	250	500	L-carvona	125	375	-	W
2	Nutrex	163	500	L-carvona	125	375	-	W
3	SAF Mannan	234	500	L-carvona	125	375	-	W
4	Nutricepts	99	500	L-carvona	125	375	+	W
5	Levacan	217	500	L-carvona	125	375	+	W

6	WGP	121	500	L-carvona	125	375	+	W
7	Padeiro	250	500	Citral	100	375	-	Y
8	Nutrex	163	500	Citral	100	375	-	Y
9	SAF Mannan	234	500	Citral	100	375	-	W
10	Nutricepts	99	500	Citral	100	375	+	Y
11	Levacan	217	500	Citral	100	375	+	int
12	WGP	121	500	Citral	100	375	+	int
13	-	-	-	L-carvona	125	875	+	-
14	-	-	-	Citral	100	900	+	Y

W = branco; Y = amarelo; SL = leve; int = intermediário

As conclusões que se seguem foram obtidas dos seguintes resultados:

5 1. As partículas purificadas com um teor de lipídeo baixo foram menos eficazes na absorção dos terpenos.

2. Partículas menos puras foram mais eficazes na absorção dos terpenos.

3. O produto de degradação amarelo do citral não
10 foi formado quando encapsulado no SAF-Mannan™.

4. Com base na carga qualitativa no nível de terpeno simples testada, SAF Mannan™ parece ser a melhor, Nutrex™ a segunda e levedura de padeiro a terceira.

Exemplo 6 - Cinéticas de Carregamento de Terpeno em Vários

15 Tipos de Partículas e Temperaturas de Incubação Diferentes

O protocolo que se segue foi adotado para comparar as cinéticas de carregamento dos vários tipos de partículas de levedura.

20 Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas por sonicação de 7 g terpeno com 3 mL de Tween-80 a 3,3%.

Solução de Tween-80 a 1% foi preparada por sonicação de 1 mL de Tween-80 a 10% em 10 mL de água.

- YP de padeiro foi preparada por mistura de 5 g de YP de padeiro em 20 mL de Tween-80 a 1%.

- A suspensão de Nutrex™ YGP foi preparada por mistura de 2 g de Nutrex(TM) YGP em 20 mL de Tween-80 a 1%.

5 - A suspensão de SAF Mannan™ foi preparada por mistura de 2 g de SAF Mannan™ em 20 mL de Tween-80 a 1%.

As reações de carregamento foram estabelecidas conforme mostrado na Tabela 6.

As reações foram incubadas por 1, 3, 6, 9 e 24
10 horas a temperatura ambiente ou a 37°C. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando na camada aquosa foi classificado. Os resultados são mostrados nas duas
15 colunas à direita da Tabela 6. O volume de terpeno mais alto absorvido pelas partículas conforme evidenciado pela ausência do terpeno livre foi registrado, como o volume da emulsão de terpeno absorvido. A cor da microesfera encapsulada foi classificada em 24 horas.

Tabela 6

Tu bo	Temp °C	Partícu la	Conc mg/mL	μL	Emulsão de terpeno	Volume μL	Tween -80 a 1%	Terpeno Livre (horas)					Cor
								1	3	6	9	24	
1	Rt	Padeiro	250	3.500	L-carvona	788	2712	+	-	-	-	-	W
2	37	Padeiro	250	3.500	L-carvona	788	2712	+	-	-	-	-	W
3	Rt	Nutrex	100	3.500	L-carvona	1050	2450	+	-	-	-	-	W
4	37	Nutrex	100	3.500	L-carvona	1050	2450	+	-	-	-	-	W
5	Rt	SAF	100	3.500	L-carvona	1050	2450	<+	-	-	-	-	W
6	37	SAF	100	3.500	L-carvona	1050	2450	<+	-	-	-	-	W

7	Rt	Padeiro	250	3.500	Citral	525	2975	+	-	-	-	-	Y
8	37	Padeiro	250	3.500	Citral	525	2975	+	-	-	-	-	VY
9	Rt	Nutrex	100	3.500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	Y
10	37	Nutrex	100	3.500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	VY
11	Rt	SAF	100	3.500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	W
12	37	SAF	100	3.500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	W

W = branco, Y = amarelo, VY = muito amarelo, RT = temperatura ambiente

As conclusões que se seguem derivaram dos resultados mostrados na Tabela 6 além de outras 5 observações:

- O carregamento de terpeno ocorre mais rápido a 37°C em comparação à temperatura ambiente.
- A reação de carregamento de terpeno SAF Mannan™ é realizada entre 1 e 3 horas.
- 10 - Parecem ser partículas preferidas por duas razões:
 - absorção mais rápida e completa de ambos terpenos.
 - o citral permanece estável quando carregado,
- 15 conforme evidenciado pela ausência da cor amarela, característica da degradação de citral, após 24 horas a 37°C.

Exemplo 7 - Classificação de uma Faixa de Terpenos Simples e Combinações de Terpeno para Carregamento de Partícula

20 O protocolo que se segue foi adotado para comparar a eficiência do carregamento da YP de padeiro versus SAF Mannan™.

As emulsões de terpeno foram preparadas como se segue:

- L-carvona - 4,5 g de L-carvona em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

- Citral - 4,5 g de citral em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

5 - Mistura de timol/L-carvona (T/L) - 2,25 g de timol e 2,25 g de L-carvona em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

- Eugenol - 4,5 g de eugenol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

10 - Geraniol - 4,5 g de geraniol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

- Mistura de citral/L-carvona/eugenol (C/LVE) - 1,5 g de citral, 1,5 g de L-carvona, 1,5 g de eugenol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

As emulsões compostas de razão de terpeno:água:agente tensoativo de 0,75:0,3:0,05 foram usadas para esses experimentos. Volumes crescentes de emulsão de terpeno foram misturados com 250 mg/mL de YP de padeiro ou 250 mg/mL de SAF Mannan™ por toda a noite a temperatura ambiente conforme mostrado nas Tabelas 7 e 8.

20 As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando na camada aquosa foi classificado. O volume mais alto da emulsão de terpeno absorvido pela YP de padeiro ou SAF Mannan™ conforme evidenciado pela ausência do terpeno livre foi registrado como o volume da emulsão de terpeno absorvido.

25 A cor dos terpenos encapsulados na microesfera foi registrada. Os resultados nas Tabelas 7 e 8 mostram que todas as combinações simples e de terpeno foram carregadas eficazmente em ambas YP de padeiro e partículas de SAF Mannan.

30

**Tabela 7 Avaliação do Carregamento de YP de padeiro de
Diferentes Terpenos e Misturas de Terpeno**

Tubo	Lev. Padeiro o (μL)	Emulsão de terpeno	Volume (μL)	Tween-80 a 1% (μL)	Terpeno Livre	Cor
1	500	-	-	500	-	W
2	500	L-carvona	15	485	-	W
3	500	L-carvona	37,5	462,5	-	W
4	500	L-carvona	7	425	+/-	W
5	500	L-carvona	112,5	387,5	+/-	W
6	500	L-carvona	150	350	+	W
7	500	L-carvona	225	275	+	W
8	500	L-carvona	450	50	++	W
9	500	Citral	15	485	-	Y
10	500	Citral	37,5	462,5	-	Y
11	500	Citral	75	425	-	Y
12	500	Citral	112,5	387,5	+I-	Y
13	500	Citral	150	350	+	Y
14	500	Citral	225	275	+	Y
15	500	Citral	450	50	+	Y
16	500	T/L	15	485	-	W
17	500	T/L	37,5	462,5	-	W
18	500	T/L	75	425	-	W
19	500	T/L	112,5	387,5	+/-	W
20	500	T/L	150	350	+	W
21	500	T/L	225	275	+	W
22	500	T/L	450	50	+	W
23	500	Eugenol	15	485	-	W
24	500	Eugenol	37,5	462,5	-	W

25	500	Eugenol	75	425	-	W
26	500	Eugenol	112,5	387,5	+/-	W
27	500	Eugenol	150	350	+	W
28	500	Eugenol	225	275	+	W
29	500	Eugenol	450	50	+	W
30	500	Geraniol	15	485	-	W
31	500	Geraniol	37,5	462,5	-	W
32	500	Geraniol	75	425	-	W
33	500	Geraniol	112,5	387,5	+	W
34	500	Geraniol	150	350	+	W
35	500	Geraniol	225	275	+	W
36	500	Geraniol	450	50	+	W
37	500	C/UE	15	485	-	Y
38	500	C/UE	37,5	462,5	-	Y
39	500	C/UE	75	425	-	Y
40	500	C/UE	112,5	387,5	+/-	Y
41	500	CUE	150	350	+	Y
42	500	C/UE	225	275	+	Y
43	500	C/UE	450	50	+	Y

Tabela 8 Avaliação do Carregamento de SAF Mannan de Diferentes Terpenos e Misturas de Terpenos

Tubo	ASF (μ L)	Emulsão de terpeno	Volume	Tween-80 a 1% (μ L)	Terpeno Livre	Cor
1	500	-	-	500	-	W
2	500	L-carvona	15	485	-	W
3	500	L-carvona	37,5	462,5	-	W
4	500	L-carvona	75	425	-	W
5	500	L-carvona	112,5	387,5	-	W

6	500	L-carvona	150	350	+/-	W
7	500	L-carvona	225	275	+/-	W
8	500	L-carvona	450	50	+	W
9	500	Citral	15	485	-	W
10	500	Citral	37,5	462,5	-	W
11	500	Citral	75 µL	425	-	W
12	500	Citral	112,5	387,5	-	W
13	500	Citral	150	350	+/- Invertida	W
14	500	Citral	225	275	+ Invertida	W
15	500	Citral	450	50	+ Invertida	W
16	500	T/L	15	485	-	W
17	500	T/L	37,5	462,5	-	W
18	500	T/L	75	425	-	W
19	500	T/L	112,5	387,5	-	W
20	500	T/L	150	350	+/-	W
21	500	T/L	225	275	+	W
22	500	T/L	450	50	+	W
23	500	Eugenol	15	485	-	W
24	500	Eugenol	37,5	462,5	-	W
25	500	Eugenol	75	425	-	W
26	500	Eugenol	112,5	387,5	+/-	W
27	500	Eugenol	150	350	+	W
28	500	Eugenol	225	275	+	W
29	500	Eugenol	450	50	+	W
30	500	Geraniol	15	485	-	W
31	500	Geraniol	37,5	462,5	-	W
32	500	Geraniol	75	425	-	W
33	500	Geraniol	112,5	387,5	-	W

34	500	Geraniol	150	350	-	W
35	500	Geraniol	225	275	- Invertida	W
36	500	Geraniol	450	50	+ Invertida	W
37	500	C/L/E	15	485	-	W
38	500	C/L/E	37,5	462,5	-	W
39	500	C/L/E	75	425	-	W
40	500	C/L/E	112,5	387,5	-	W
41	500	C/L/E	150	350	-	W
42	500	C/L/E	225	275	+/-	W
43	500	C/L/E	450	50	+	W

Invertida = fase invertida - flutuação dos sólidos na parte superior - sem óleo livre; W = branco; Y = amarelo

As observações que se seguem foram obtidas dos resultados:

5 - Todos os terpenos pareceram ser carregados na YP de padeiro e em SAF Mannan.

- SAF Mannan possui uma capacidade de carregamento de terpeno maior em relação à YP de padeiro.

10 - As duas ou três misturas de terpeno parecem também carregar eficazmente.

- O terpeno eugenol parece ter uma densidade mais alta em relação às partículas e água, uma vez que foi encontrado associado à microesfera.

15 - Para o SAF Mannan, os níveis de carga mais altos e partículas mais leves resultaram em partículas carregadas flutuando na superfície da camada aquosa para citral e geraniol.

O citral foi protegido da oxidação por SAF Mannan, porém não pela YP de padeiro.

20 O carregamento máximo aproximado para cada tipo de

partícula foi determinado conforme mostrado nas Tabelas 9 e 10 a seguir. A porcentagem carregada representa uma razão da quantidade de terpeno carregado para a quantidade de partículas presente (peso para peso).

5 **Tabela 9 - Carregamento máximo de terpeno na YP de padeiro.**

Terpeno	Vol. Carregado μL	Porcentagem carregada peso/peso
L-carvona	37,5	33,3
Citral	75	67%
Timol/L-carvona 1:1	75	67%
Eugenol	75	67%
Geraniol	75	67%
Citral/L-carvona/ Eugenol (1:1:1)	75	67%

Tabela 10 - Carregamento Máximo de terpeno em SAF Mannan

Terpeno	Vol. Carregado μL	Porcentagem carregada peso/peso
L-carvona	112,5	100%
Citral	150	133%
Timol/L-carvona 1:1	112,5	100%
Eugenol	112,5	100%
Geraniol	150	133%

Citral/L-carvona/ Eugenol (1:1:1)	150	133%
---	-----	------

Exemplo 8 - Avaliação da Estabilidade do Terpeno nas Emulsões Aquosas e Formulações de Terpeno Encapsulado

A estabilidade do terpeno foi avaliada por observação das formulações de citral para a formação de produto de oxidação amarelo. Conforme observado na coluna à direita, nas Tabelas 5-8 as emulsões de citral e YP de padeiro encapsulada com citral promoveram um aumento progressivo da cor amarela com o passar do tempo. Contudo, o encapsulamento do citral em SAF Mannan™ aumentou a estabilidade do citral, conforme evidenciado pela redução ou ausência de cor amarela com o tempo.

Exemplo 9 - Carregamento de Terpenos em Água Mínima

O protocolo que se segue foi realizado para avaliar a possibilidade de que o carregamento de terpeno e o encapsulamento na YP fossem realizados em um nível de sólidos de Partículas de Levedura (YP) muito alto, de modo a permitir a extrusão direta da formulação carregada dentro do secador de leito fluidificado. A quantidade mínima de água para hidratar completamente as partículas de SAF Mannan™ foi determinada como sendo de 3,54 g de água por g de sólidos. Isso define o volume hidrodinâmico (HV) ou capacidade de absorção de água das partículas. Nesse nível de água, as partículas hidratadas possuem uma consistência de uma massa rígida que é tixotrópica, isto é, espessa em cisalhamento como maionese. Adição de água até 40% acima do HV, resulta em pasta flutuável espessa. A reação padrão que foi usada nos exemplos acima foi realizada em 3 X HV de

água.

Uma série de reações de carregamento de terpeno (L-carvona) foram realizadas mantendo a razão de partícula:terpeno:Tween (1:0,44:0,04) constante e variando a quantidade de água no sistema de HV (3,53 g) para HV + 40% de água (4,92 g). Os controles foram o sistema de carregamento padrão que utiliza 3 X HV água, reações apenas de partículas e apenas de terpeno. Seguindo-se a incubação por toda a noite, as amostras das misturas foram avaliadas microscopicamente quanto ao terpeno livre e evidência de absorção de terpeno pelas partículas e quanto às características de fluxo de material por avaliação do fluxo nos tubos invertidos por 15 minutos. Além disso, a presença de óleo livre foi avaliada por hidratação da mistura de reação com 5 X HV, vortexação para obter uma dispersão completa de partículas e centrifugação para sedimentar o terpeno encapsulado na partícula. Os resultados são mostrados na Tabela 11 e figuras 7 a 12. As figuras 7 a 12 mostram os resultados de carregamento dos tubos que se seguem:

Figura 7 - Tubo 3

Figura 8 - Tubo 5

Figura 9 - Tubo 6

Figura 10 - Tubo 8

Figura 11 - Tubo 10

Figura 12 - Tubo 11

Tabela 11

Tubo	SAF g	Emulsão de terpeno	Peso (g)	Água (g)	Terpeno livre	Fluxo
1	-	L-carvona	4,64	4,5	+	+

2	1	-	-	8,0	-	+
3	1	L-carvona	4,64	4,5	-	+
4	1	L-carvona	4,64	-	-	-
5	1	L-carvona	4,64	0,17	-	-
6	1	L-carvona	4,64	0,35	-	-
7	1	L-carvona	4,64	0,52	-	Sl
8	1	L-carvona	4,64	0,7	-	Mod
9	1	L-carvona	4,64	0,87	-	Alto
10	1	L-carvona	4,64	1,05	-	Alto
11	1	L-carvona	4,64	1,39	-	Alto

Os resultados mostrados na Tabela 11 e figuras 7 a 12 demonstram que a carga de terpeno e encapsulamento nas partículas ocorreu em todas razões de água avaliadas. Surpreendentemente, carregamento equivalente ocorreu mesmo quando a reação de carregamento foi realizada em uma reação com a consistência de uma massa rígida usando a quantidade mínima de água para hidratar as partículas. A ausência de terpeno livre foi observada microscopicamente (figuras 7 a 12) e no baixo nível de terpeno nos sobrenadantes, conforme evidenciado pela redução marcada na turbidez do sobrenadante em comparação controle apenas de terpeno.

Esses resultados estendem nosso entendimento das condições para carregamento dos terpenos dentro das partículas ocas de glicano. A flexibilidade para usar um volume mínimo de água para hidratar as partículas durante o processo de carregamento permitirá a carga dos terpenos sob condições onde a mistura de reação possui consistência semelhante a massa maleável usando misturadores de massa de superfície, de movimento circular de classificação

alimentícia padrão. A consistência da mistura carregada com terpeno e alto teor de sólidos final é apropriada para extrusão direta, de modo a formar macarrões e microesferas para secagem em leito fluidificado.

5 Instalações apropriadas para produção em escala dessa maneira precisarão de:

- homogeneizador de Gaulin, ou equivalente para produzir emulsão de terpeno estável.

10 - tanque de mistura de massa de superfície de movimento circular

- extrusor

- secador de leito fluidificado.

Exemplo 10 - Avaliação de Um Agente Hidrocolóide Intersticial par Auxiliar na Dispersão em Partículas Ocas de Glicano Secas Encapsulando uma Dispersão de Componente de Terpeno quando Reidratadas

20 O protocolo que se segue foi adotado para avaliar o efeito de um hidrocolóide intersticial no aumento das formulações de terpeno encapsuladas em partículas de glicano oca seca que dispersam quando hidratadas.

- partículas de SAF Mannan™

- Tween 80 a 0,1%

- L-carvona

- Goma xantana - 1% peso/volume em Tween 80 a 0,1%

25 O efeito do aumento dos níveis da goma de xantana na dispersão de L-carvona encapsulado na partícula oca de glicano e seca em água foi avaliado por carregamento de L-carvona no SAF Mannan por incubação de 1,1 g de uma emulsão de L-carvona (razão de L-carvona: água: agente tensoativo
30 de 0,75:0,3:0,05) com 1 g de SAF Mannan e 4,4 g de Tween 80

a 0,1% contendo 0-1% de goma xantana, conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12

Tubo	SAF, g	Emulsão L- carvona (g)	Tween- 80 a 0,1% (g)	Xantana a 1% (g)	Observações visuais
1	1	1,1	4,4	0	Grumos não uniformes grandes
2	1	1,1	4,33	0,07	Suspensão uniforme
3	1	1,1	4,26	0,14	Suspensão uniforme
4	1	1,1	4,12	0,28	Suspensão uniforme
5	1	1,1	3,85	0,55	Suspensão uniforme
6	1	1,1	3,3	1,1	Suspensão uniforme mais fina
7	1	1,1	2,2	2,2	Suspensão uniforme mais fina
8	1	1,1	0	4,4	Suspensão uniforme mais fina

Os resultados na Tabela 12 e figuras 13 a 20 demonstram que a inclusão de hidrocolóide de peso molecular alto durante a secagem do terpeno encapsulado em partícula auxilia a hidratação e dispersão das micropartículas em uma suspensão uniforme. Outros exemplos de tais agentes hidrocolóides são maltodextrina, alginatos e semelhantes.

10 Pode ser importante incluir um revestimento da microesfera para aumentar a estabilidade dos terpenos carregados e prover uma liberação prolongada do terpeno.

Exemplo 11 - Avaliação da Concentração de Inibição Mínima (MIC) das Emulsões de Terpeno, Terpenos Encapsulados em YP

de Padeiro Fresca e em SAF Mannan além de Terpenos Encapsulados em YP de Padeiro Liofilizada e em SAF Mannan contra *S. aureus*

Os resultados de um protocolo realizado para comparar MIC de formulações de terpeno encapsuladas em partícula oca de glicano liofilizada versus fresca são mostrados na Tabela 13. A emulsão de terpeno simples também foi testada e os resultados são mostrados para comparação.

Tabela 13 - MIC de terpeno µg/mL

Terpeno	Emulsão	SAF Mannan			
		Padeiro Fresca	Liofilizada	Padeiro Fresca	Liofilizada
L-carvona	3,75	0,1	>0,04	0,01	>0,02
Citral	0,94	0,01	0,05	0,01	>0,03
L-carvona/Timol	0,23	0,01	0,03	0,01	0,05
Eugenol	0,12	0,03	0,05	0,01	0,05
Geraniol	0,47	0,03	0,06	0,02	>0,03
L-carvona/Citral/Eugenol	0,23	0,03	0,06	0,02	0,05

As conclusões dos resultados acima foram:

1. O carregamento de terpeno nas partículas ocas de glicano parece melhorar a MIC do terpeno. De modo geral, as emulsões de terpeno fresco são 4-375 vezes menos potentes que as formulações encapsuladas.

2. Os terpenos carregados em SAF Mannan™ têm desempenho ligeiramente melhor que a YP de padeiro.

3. As composições de terpeno carregadas recentemente têm desempenho ligeiramente melhor que as composições liofilizadas (pode haver alguma volatilização dos terpenos a partir das composições secas durante a

lioofilização).

4. Os terpenos nas emulsões aquosas são estáveis por pelo menos 3 semanas.

Exemplo 12 - Eficácia dos Terpenos Encapsulados em Escala de Planta Piloto Contra *S.aureus*

Ensaaios antimicrobianos foram realizados com terpenos encapsulados e misturas produzidas em escala de planta piloto contra *S. aureus*. Ambas as amostras de terpeno encapsuladas e liofilizadas contendo materiais demonstraram forte atividade antimicrobiana. Os resultados são resumidos na Tabela 14 a seguir.

Os terpenos foram encapsulados em SAF-Mannan™ em uma escala de 2,5 Kg. A mistura de três terpenos (Geraniol, 275 g; Eugenol, 385 g; e timol, 440 gramas foi dissolvida e homogeneizada com 100 g de Twenn-80 e 8 L de água. SAF-Mannan™ (2,5 kg) foi adicionado para formar uma suspensão homogênea. A suspensão foi passada através de um homogeneizador Gaulin para reduzir o tamanho da partícula e o homogenato foi incubado por toda a noite a temperatura ambiente. Uma amostra do terpeno encapsulado foi removida e armazenada a temperatura ambiente. O terpeno encapsulado remanescente foi então congelado em bandejas e liofilizado. O pó de terpeno encapsulado liofilizado foi moído e armazenado a temperatura ambiente.

Tabela 14

Material	MIC (ppm)
Ensaaios com <i>Staphylococcus aureus</i>	
Controle de revestimento vazio YGP	> 2,500
Planta piloto - fresco	100

Planta piloto - liofilizado	100
-----------------------------	-----

Na escala da planta piloto ambas as amostras frescas e liofilizadas foram igualmente potentes em uma base de terpeno peso/peso.

Com base nos resultados de preparação em grande
5 escala, a dose eficaz prevista da formulação liofilizada contra *S. aureus* é de 200 ppm (a formulação contém ~50% de terpeno peso/peso) ou 0,2 g/L de água.

Exemplo 13 - Eficácia dos Terpenos Encapsulados Contra *Mycobacterium*

10 As emulsões de terpeno foram preparadas como se segue:

1. Citral - 4,5 g de citral em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

2. L-carvona/eugenol - 2,25 g de L-carvona e 2,25 g
15 de eugenol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

3. Eugenol - 4,5 g de eugenol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

4. Geraniol - 4,5 g de geraniol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

20 5. Mistura de geraniol/timol - 2,25 g de geraniol e 2,25 g de timol em 1,5 mL de Tween-80 a 3,3%.

6. Emulsão de controle - 6 mL de Tween-80 a 1%.

SAF-Mannan™ (2,5 g) foi misturado com 3 mL de cada emulsão e 7 mL de Tween-80 a 1% e incubado por toda noite
25 para encapsular os terpenos e misturas de terpenos. As formulações de terpeno encapsuladas foram congeladas e liofilizadas e os pós moídos em um pó fino. As suspensões de terpenos encapsulados (25 mg/mL) e emulsões de terpeno não encapsuladas foram ensaiadas quanto à atividade

antibacteriana contra *Mycobacterium*. Os resultados são estabelecidos na Tabela 15.

Tabela 15

Material	MIC (ppm)
Ensaio <i>Mycobacterianos</i>	
YGP Citral FD	250
YGP L-Carvona/Eugenol FD	500
YGP Eugenol FD	500
YGP Geraniol FD	125
YGP Geraniol/Timol FD	62,5
Emulsão de controle	> 1.000
Emulsão de Citral	35
Emulsão de L-carvona/Eugenol	53
Emulsão de Eugenol	105
Emulsão de Geraniol	70
Emulsão de Geraniol/Timol	53

FD = (liofilizado)

5 Exemplo 14 - Atividade Nematocida dos Terpenos Encapsulados

As preparações das paredes da célula de levedura encapsulando citral foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos acima. As partículas ocas de glicano continham 17,5% de citral, e as partículas estavam presentes em preparações de teste a uma concentração de 1.000 ppm. Isso significa que os terpenos estiveram eficazmente presentes a uma concentração de 175 ppm.

Foi adicionado 1,0 mL das preparações de teste à 0,1 a 0,15 mL de água contendo nematóides de raiz. 1,0 mL de água foi adicionado aos nematóides como controle.

Conforme descrito anteriormente, foram feitas observações e a taxa de mortalidade avaliada (isto é,

porcentagem de morte) após 24 e 48 horas. Os resultados mostrados abaixo na Tabela 16 são uma média de dois conjuntos de resultados.

Tabela 16 - Atividade Nematicida de Solução de Terpeno Encapsulado (17,5% citral @ 1.000 ppm)

Tempo	Taxa de Mortalidade	
	Teste	Controle
24 horas	45	17
48 horas	56	21

Os resultados demonstram que as partículas ocas de glicano encapsulando terpenos são eficazes no extermínio dos nematóides de raiz a uma concentração de partícula de 1.000 ppm, o que corresponde à uma concentração de citral de apenas 175 ppm.

Assim, as partículas ocas de glicano encapsulando terpenos parecem ser tão eficazes quanto os terpenos em solução ou com agente tensoativo como nematicidas. A atividade nematicida é mantida, a despeito do terpeno ser encapsulado dentro da partícula. Pode ser esperado que concentrações mais altas de terpenos dentro das partículas ocas de glicano, ou concentrações maiores de partículas resultem em uma taxa de mortalidade mesmo maior, como no caso dos terpenos em solução ou com agente tensoativo.

Exemplo 15 - Propriedades Fungicidas dos Terpenos Encapsulados e Não Encapsulados

Os protocolos que se seguem foram realizados para avaliar as propriedades fungicidas das várias combinações do terpeno, e para comparar a eficácia das composições encapsuladas e não encapsuladas.

Avaliação das propriedades antifungo de formulação

diferente de terpeno

Uma placa de ensaio de microtitulação foi empregada para avaliar a concentração de inibição mínima (MIC) de uma faixa de compostos de terpeno contra diferentes organismos patogênicos. O ensaio empregado para cada organismo é descrito em detalhes a seguir, porém os aspectos gerais importantes são como se segue.

Os ensaios utilizam dois períodos de incubação para distinguir entre atividades estáticas (inibição do crescimento) e letal (extermínio). O primeiro período de incubação permite avaliação de inibição do crescimento, porém não pode distinguir entre mera prevenção do crescimento e extermínio das células. A finalidade do segundo período de incubação é permitir tempo e nutrientes suficientes para quaisquer células dormentes ou inibidas que sobrevivam a exposição ao terpeno se proliferarem. Quaisquer células que foram inibidas por efeitos fungistáticos responderiam e cresceriam durante o segundo período de incubação, considerando-se que as células que foram exterminadas por exposição aos terpenos não cresceram no meio fresco.

Experimentos de avaliação iniciais foram realizados usando um total de 31 formulações de terpeno diferentes (Tabela 17). Esses experimentos foram repetidos usando um subconjunto de formulações de terpeno fortemente ativas (Tabela 18).

Uma combinação de terpenos geraniol, eugenol e timol em uma razão de 2:1 :2 encapsulado nas partículas de glicano foi também testada; essa amostra sendo referida como YP-GET. Uma combinação de geraniol, eugenol e timol na

mesma razão foi também testada para comparação com a forma encapsulada.

Ensaio MIC empregando *Saccharomices cerevisiae*

S.cerevisiae (5×10^5 células/mL em meio de
5 crescimento YPD) foram adicionados a cada poço de uma placa
de microtitulação de 96 poços em alíquotas de 100 µL. Pelo
menos uma coluna por placa foi designada como um controle
apenas de célula e nenhum terpeno foi adicionado à esses
poços. Alíquotas (100 µL) de diferentes formulações de
10 terpeno foram adicionadas à primeira fileira das colunas
remanescentes e diluições em série duplas foram realizadas
por transferência de 100 µL de uma fileira para a próxima,
um total de 7 vezes. Finalmente, 100 µL foram descartados
da última fileira, de modo a garantir que todas as paredes
15 contivessem o mesmo volume. As placas de microtitulação
foram incubadas estaticamente por toda a noite a 30°C.

Seguindo-se a incubação, as placas foram
classificadas quanto a inibição do crescimento (evidenciado
por uma falta de turbidez). A inibição do crescimento ($\geq$
20 75%) foi confirmado visualmente por microscópio.

Uma vez que a MIC foi determinada para cada
formulação, as placas de microtitulação foram centrifugadas
e o meio gasto foi removido dos poços não turvos. As
células foram ressuspensas no meio fresco (100 µL) e as
25 placas foram reincubadas por toda a noite a 30°C. A
avaliação da inibição do crescimento foi realizada como
antes.

Ensaio MIC empregando um inócuo misto

As formulações diferentes de terpeno foram diluídas
30 em série em uma placa de microtitulação de 96 poços,

conforme descrito para *S. cerevisiae*. Ágar YPD fundido foi então adicionado aos poços, em conjunto com 5 µL de inócuo misto (preparado de folhas de uva mofadas a uma concentração de 5×10^4 células/mL). As placas foram incubadas estaticamente por 24 horas a temperatura ambiente e o crescimento do esporo foi avaliado visualmente pelo microscópio.

Devido ao uso de meio sólido, o segundo período de incubação nos meios frescos não poderia ser realizado.

10 Ensaio MIC empregando *Colletotrichum graminicola*

As formulações diferentes de terpeno foram diluídas em série em placa de microtitulação de 96 poços, conforme descrito para *S. cerevisiae*. *C. graminicola* (300 esporos/poço) foi adicionado aos terpenos diluídos e as placas foram incubadas estaticamente por 48 horas a temperatura ambiente. Germinação e crescimento do esporo foram avaliados visualmente por microscopia.

Uma vez que MIC tenha sido determinada para cada formulação, as placas de microtitulação foram centrifugadas e o meio gasto foi removido por poços que inibiram o crescimento. Os esporos foram ressuspensos em meio fresco (100 µL) e as placas foram reincubadas por toda a noite a temperatura ambiente. A avaliação de inibição do crescimento foi realizada conforme anteriormente.

25 **Tabela 17 - MIC e valores MIC fungicidas obtidos da classificação inicial de 31 formulações de terpeno.**

	Formulação	Saccharomyces	Micróbios	<i>Colletotrichum</i>
	de Terpenoa	<i>cerevisiae</i>	mistos	<i>Graminicola</i>

		MIC	MIC Letal	MIC	MIC Letal	MIC	MIC Letal
1	Geraniol (G)	500	500	250	NT	63	63
2	Eugenol (E)	500	500	125	NT	125	125
3	Timol (T)	250	250	63	NT	63	500
4	Citral (C)	250	250	63	NT	125	63
5	L-carvona (L)	250	500	63	NT	125	125
6	GE	1000	2000	125	NT	63	250
7	GT	500	500	250	NT	125	63
8	GC	500	500	125	NT	125	250
9	GL	500	500	125	NT	125	125
10	ET	500	500	125	NT	125	125
11	EC	250	1000	31	NT	125	125
12	EL	500	1000	125	NT	125	125
13	TC	500	500	16	NT	63	63
14	TL	500	1000	63	NT	63	63
15	CL	500	500	58	NT	63	63
16	GET	500	500	23	NT	94	94
17	GEC	250	500	94	NT	94	94
18	GEL	500	1000	188	NT	188	188
19	GTC	500	500	47	NT	188	188
20	GTL	500	1000	94	NT	94	94
21	GCL	250	500	94	NT	47	47
22	ETC	125	250	188	NT	94	94
23	ETL	500	1.000	≤12	NT	94	94
24	ECL	500	1.000	≤12	NT	188	188

25	TCL	500	1.000	23	NT	94	375
26	GETC	500	1.000	125	NT	250	500
27	ETCL	500	1.000	63	NT	125	125
28	GTCL	500	1.000	125	NT	250	250
29	GECL	500	1.000	≤16	NT	500	500
30	GETL	1000	1.000	125	NT	500	250
31	GETL	1000	1.000	78	NT	625	625
	GET (razão 2:1:2 Peso/peso/p eso)	NT	NT	98	NT	78	156
	YP-GET (razão G:E:T de 2:1:2, peso/peso) b	98	391	98	NT	20	20

NT, não testado; YP-GET, formulação de GET encapsulada em levedura.

^a As combinações de terpeno foram misturadas em uma razão de 1:1 (peso/peso) a menos que de outra forma
5 indicado.

^b MICs calculadas por teor de terpeno.

Tabela 18 - Repetição do Ensaio para Determinar MIC e Valores de MIC Fungicida

Formulação de terpeno (por número)	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	Micróbios mistos isolados folhas de uva mofadas b	<i>Colletotrichum graminicola</i>
--	-------------------------------------	--	---------------------------------------

	MIC	MIC Letal	MIC	MIC Letal	MIC	MIC Letal
T (3)	NT	NT	63	NT	NT	NT
L (5)	NT	NT	250	NT	NT	NT
GE (6)	NT	NT	NT	NT	125	500
EC (11)	125	250	NT	NT	NT	NT
TC (13)	NT	NT	250	NT	63	250
TL (14)	NT	NT	500	NT	250	500
CL (15)	NT	NT	500	NT	125	500
GET (16)	NT	NT	375	NT	188	375
GEC (17)	250	500	NT	NT	NT	NT
GCL (21)	250	500	NT	NT	375	750
ETC (22)	125	250	NT	NT	94	188
ETL (23)	NT	NT	375	NT	188	750
ECL (24)	NT	NT	750	NT	NT	NT
TCL (25)	NT	NT	750	NT	94	375
ETCL (27)	NT	NT	500	NT	63	500
GECL (29)	NT	NT	1000	NT	NT	NT
YP-GET (razão de G:E:T 2:1:2, peso/peso) c	98	195	NT	NT	39	156

NT, não testado; YP-GET, formulação de GET encapsulada em levedura.

Observação: As amostras foram ensaiadas em duplicata. Se valores diferentes forem obtidos entre as
5 amostras de duplicata, o valor mais alto seria apresentado.

Nenhuma amostra em duplicata diferiu em mais de uma diluição de duas vezes.

^a As combinações de terpeno foram misturadas em uma razão de 1:1 (peso/peso) a menos que de outra forma
5 indicado.

^b 1×10^4 células/mL de suspensão em estoque.

^c MICs calculadas por teor de terpeno.

Inócuo Misto

O uso de um inócuo misto apresenta vários
10 problemas. A variabilidade no teor de esporo entre as
preparações resulta em baixa reprodutibilidade interensaio,
e o crescimento de organismos de contaminação impede a
classificação da germinação do esporo. Espécies de levedura
unicelulares são especificamente problemáticas no
15 mascaramento do desenvolvimento do esporo. Embora dados
precisos não possam ser obtidos desse ensaio, um efeito
inibidor dos terpenos foi observado.

A identificação dos esporos foi mais fácil durante
a classificação do ensaio de repetição que durante o ensaio
20 de classificação inicial, uma vez que um número maior de
esporos foi empregado (aproximadamente 50/poço versus
aproximadamente 10/poço). Portanto, os dados obtidos
durante o ensaio de repetição podem prover uma estimativa
mais confiável da MIC.

25 *Colletotrichum araminicola*

Os valores de MIC geralmente maiores obtidos do
ensaio de repetição em comparação ao ensaio de
classificação inicial podem ser devidos a:

- uso de soluções de terpeno de 1 semana
- 30 - uso de esporos preparados recentemente, que

tinham uma viabilidade superpor a dos empregados no ensaio de classificação inicial e podendo, portanto, ser mais difíceis de serem exterminados.

5 Comparação das formulações de terpeno como emulsões livres com as mesmas formulações de terpeno quando encapsuladas em partículas ocas de glicano: ensaios de MIC de *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Meio de crescimento YPD (100 µL) foi adicionado a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços e alíquotas de formulações diferentes de terpeno foram adicionadas à primeira fileira, fornecendo um volume total de 200 µL nessa fileira. Uma coluna foi projetada como um controle apenas de célula e nenhum terpeno foi adicionado a esses poços. Diluições em série duplas foram realizadas por
15 transferência de 100 µL de uma fileira para a próxima, um total de 7 vezes. Finalmente, 100 µL foram descartados da última fileira, de modo a garantir que todas as paredes contivessem o mesmo volume. *S. cerevisiae* (5 x 10⁵ células/mL em meio de crescimento YPD) foram então
20 adicionados a cada poço em alíquotas de 100 µL e a absorvência a 620 nm (A₆₂₀) foi medida para cada poço usando uma leitora de placa de microtitulação. As placas de microtitulação foram incubadas estaticamente por toda a noite a 30°C.

25 Seguindo-se a incubação, a A₆₂₀ foi medida novamente e as placas foram classificadas para inibição do crescimento ($\leq$ 75%). A inibição do crescimento foi confirmada visualmente por microscópio. Para as emulsões de terpeno livre, uma vez que a MIC havia sido determinada
30 para cada emulsão, as placas de microtitulação foram

centrifugadas e o meio gasto foi removido dos poços inibidos de crescimento. As células foram ressuspensas em meio fresco (100 µL) e as placas foram reincubadas por toda a noite a 30°C. A avaliação da inibição do crescimento foi realizada como antes.

A MIC e resultados de MIC fungicida são resumidos na Tabela 19.

Resultados

Tabela 19 - MIC e valores de MIC fungicida obtidos da classificação de 31 formulações de terpeno contra *Saccharomyces cerevisiae*

Formulação de terpeno (número de referência)	Formulações encapsuladas		Emulsões de Terpeno em Livre	
	MIC	MIC Letal	MIC	MIC Letal
G (1)	111	NT	250	250
E (2)	131	NT	125	250
T (3)	115	NT	125	250
C (4)	118	NT	125	250
L (5)	254	NT	250	500
GE (6)	118	NT	250	500
GT (7)	108	NT	125	250
GC (8)	113	NT	125	250
GL (9)	117	NT	250	500
ET (10)	131	NT	125	250
EC (11)	126	NT	125	250
EL (12)	129	NT	125	250
TC (13)	59	NT	63	63

TL (14)	124	NT	63	125
CL (15)	124	NT	125	125
GET (16)	119	NT	63	125
GEC (17)	119	NT	125	250
GEL (18)	121	NT	125	125
GTC (19)	115	NT	125	125
GTL (20)	119	NT	125	125
GCL (21)	234	NT	125	125
ETC (22)	124	NT	125	125
ETL (23)	123	NT	125	125
ECL (24)	63	NT	63	125
TCL (25)	61	NT	125	500
GETC (26)	61	NT	63	250
ETCL (27)	120	NT	63	125
GTCL (28)	124	NT	125	125

NT, não testado; YP-GET, formulação de GET encapsulada em levedura; YP-ETC, formulação de ETC encapsulada em levedura.

^a As combinações de terpeno foram misturadas em uma
5 razão de 1:1 (peso/peso) a menos que de outra forma
indicado.

^b Formulações encapsuladas em levedura, a menos que
de outra forma indicado.

^c MICs calculadas por teor de terpeno.

10 ^d Formulação de emulsão não encapsulada.

Para ambas as emulsões de terpeno e terpenos encapsulados em levedura, as MICs foram tipicamente $\leq$ 125 ppm, com as formulações mais ativas inibindo o crescimento em ~60 ppm. Os valores MIC obtidos para as emulsões de

terpeno foram semelhantes aos obtidos para suas respectivas formulações encapsuladas em levedura. Quando valores diferentes foram obtidos, eles apenas diferiram em aproximadamente 2 vezes a diluição. Muitas das emulsões de terpeno livre eram fungicidas na MIC de inibição de crescimento, com a maior parte mostrando atividade fungicida em uma concentração duas vezes maior.

Esses resultados demonstram que os terpenos encapsulados nas partículas de glicano são pelo menos tão eficazes na mortalidade dos fungos quanto as formas não encapsuladas. Adicionalmente, as composições encapsuladas usadas podem ter tido potência reduzida devido ao fato de terem sido armazenadas por 45 dias a 4°C e possuindo um teor de terpeno subótimo de ~4% peso/peso.

O ensaio para determinar a atividade fungicida envolve uma etapa de centrifugação, que tenta separar as células microbianas de qualquer terpeno residual no meio de desenvolvimento, pela produção de uma microesfera de células na parte inferior do poço. Essa microesfera é então ressuspensa no meio fresco e incubada por uma segunda vez na ausência de terpeno. Contudo, a etapa de centrifugação não pode discriminar entre as células microbianas e partículas de levedura, portanto, quando os terpenos encapsulados nas leveduras são usados, a microesfera de célula também conterá partículas de levedura carregadas com terpeno. Como resultado, ambas as partículas de levedura e as células microbianas são então ressuspensas no meio fresco.

Essa questão da metodologia não é considerada como afetando os resultados obtidos nos experimentos descritos

acima pelas seguintes razões:

1. Nos experimentos anteriores, as emulsões de terpeno foram usadas ao invés das partículas de levedura carregadas com terpeno e a atividade fungicida foi
5 claramente mostrada.

2. Terpenos encapsulados são liberados por difusão e um equilíbrio entre a concentração de terpenos encapsulados e a concentração de terpenos liberados no meio circundante é rapidamente alcançada. Assim, seguindo-se a
10 centrifugação e ressuspensão no meio fresco, a concentração de terpeno liberado no meio de crescimento é provável de estar bem abaixo daquela necessária para atividade de inibição do crescimento.

3. Não há crescimento quando o conteúdo do poço de
15 MIC fungicida é colocado em placa no meio de crescimento de ágar sólida. Quando colocado no meio de crescimento sólido, a difusão de qualquer terpeno residual através de todo o volume grande da placa de ágar resulta em uma concentração de terpeno local que é muito baixa para causar inibição do
20 crescimento. A falta de crescimento do conteúdo do poço MIC fungicida deve portanto se dever à atividade fungicida inicial. Em contraste, quando é obtida uma MIC inferior aquela MIC fungicida e o conteúdo do poço de MIC é colocado no meio de crescimento de ágar sólido, o crescimento é
25 observado, indicando um efeito fungistático.

Exemplo 16 - Preparação de Composições de Terpenos Encapsulados para Experimentos de Campo

A finalidade do protocolo que se segue foi a de encapsular uma composição de terpenos nas partículas ocas
30 de glicano para experimentos de campo subsequentes.

Materiais:

Timol (fornecido pela Alpha-Gamma Corporation)

Eugenol (fornecido pela Alpha-Gamma Corporation)

Geraniol (fornecido pela Alpha-Gamma Corporation)

5 Tween-80 a 1% (fornecido pela Alpha-Gamma Corporation)

Partículas de parede celular de levedura

Goma xantana.

As partículas de parede celular de levedura foram
10 obtidas na Biorigin (São Paulo, Brasil) sob a marca registrada Nutricell MOS 55 e foram fabricadas pela Açucareira Quatá S.A, Usina Quatá, Quatá - São Paulo, Brasil, código postal 19780 000. As partículas são um extrato de parede de célula seco, aspergido de *S. cerevisiae* e são um pó de escoamento livre de cor bege a castanho.
15

Protocolo: O protocolo que se segue era apropriado para 1 kg de partículas, podem pode simplesmente ser escalonado para produção maior.

20 1. Prepare a mistura de terpeno - misture 375 gramas de Geraniol + 525 gramas de Eugenol + 600 gramas de Timol e agite em um frasco de vidro.

2. Prepare 6,2 L de Tween-80 a 1% por mistura de 62 gramas de Tween-80 em 6,2 L água em um balde branco de 7,57
25 litros. Misture para formar a solução.

3. Adicione 6,2 gramas de goma xantana à solução de Tween e agite para dissolver.

4. Prepare a emulsão de terpeno por mistura de 1,5 kg de mistura de terpeno + 6,2 L de Tween-80 a 1%/goma
30 xantana a 0,1% em um balde branco usando misturador

politron.

5. Adicione 1.000 gramas de partículas de parede celular de levedura - combine usando o misturador de tinta para formar uma suspensão uniforme.

5 6. Adicione a emulsão de terpeno da etapa 4 às partículas de parede celular de levedura, enquanto misturando para formar uma consistência semelhante a da maionese fina.

7. Derrame a mistura de terpeno em latas e incube
10 por toda a noite.

Resultados: Geraniol, eugenol e timol encapsulados em partículas ocas de glicano foram obtidos como uma pasta. A pasta foi facilmente convertida em um pó seco por técnicas de secagem em aspersão convencionais. A pasta é a
15 composição "líquida" referida nos protocolos que se seguem e o "pó" é a forma seca em aspersão.

Exemplo 17 - Experimentos de Campo de Composição de Terpeno Encapsulada no Míldio felpudo

Nas uvas, o míldio felpudo é causado pelo fungo
20 *Plasmopara viticola*, que infecta os vinhedos mundialmente e pode causar perdas de devastação aos cultivadores de uvas em termos de rendimento de colheita e qualidade do vinho. Os fungos atacam os frutos e todas as partes verdes da parreira fazendo com que as folhas murchem e as flores e
25 frutos apodreçam. A doença se manifesta como manchas irregulares de cor amarela pálida ou manchas verde-amareladas na superfície das folhas, com crescimento denso de fungos semelhante a algodão de cor cinza clara cobrindo a parte inferior das lesões da folha. As bagas podem também
30 ser cobertas com o crescimento do felpo e, dependendo da

época da infecção, podem ser tornar marrom e macias e podem não mais ficarem macias. O míldio felpudo se propaga através da dispersão dos esporos pelo vento e chuva e requer condições úmidas para infecção. É especialmente problemático nos ambientes com alta umidade. As medidas preventivas são recomendadas para controle da doença, com aplicações precoces de fungicidas seguidas por aplicação repetida em intervalos apropriados. A resistência a alguns tratamentos aumentou e embora o desenvolvimento da resistência possa ser minimizado por rotação com emprego de fungicidas diferentes, isso permanece sendo um problema.

A finalidade desse experimento foi de investigar a eficácia da formulação de terpeno encapsulada no Exemplo 16 (YGP-GET) fornecido como uma formulação líquido ou pó (aspersão seca) para prevenção do míldio felpudo nas uvas.

Quatro blocos adjacentes, cada um cobrindo 0,1 ha, foram identificados no sítio 20 no vinhedo de Kir-Yianni.

Kir-Yianni é um vinhedo de 35 hectares em uma elevação de 300 metros. Ele é limitado por uma floresta de carvalho mista ao norte e oeste e descortina orquídeas e vinhedos no sul e leste.

Todos os quatro blocos foram tratados com múltiplos produtos antes da aplicação da formulação de terpeno. Em 26 de junho de 2004, dois dos quatro blocos foram aspergidos com formulação em pó de terpeno em uma dose de 0,5 g/L ou 2 g/L (vide ilustração esquemática na figura 21). Um terceiro bloco foi tratado com calda bordalesa convencional mais enxofre umectável e o bloco restante foi deixado sem tratamento. As parreiras em cada bloco foram monitoradas quanto aos sinais de míldio felpudo na semana seguinte.

Quatro blocos adjacentes adicionais, cada um cobrindo 1000 m² foram identificados no sítio 18 no vinhedo de Kir-Yianni. Todos os quatro blocos haviam sido tratados com múltiplos produtos antes da aplicação da formulação de terpeno. No dia 26 de junho de 2004, dois dos quatro blocos foram aspergidos com a formulação de terpeno líquida em uma dose de 1 g/L ou 4 g/L (figura 21) (observação: 1 g de formulação líquida de terpeno possui um volume de 1 mL). Dos dois blocos restantes, um foi deixado sem tratamento e um foi aspergido com Mikal(R), um tratamento convencional para míldio felpudo, no dia 28 de junho de 2004. Os vinhedos em cada bloco foram monitorados quanto aos sinais do míldio felpudo por uma semana.

Para ambos os sítios, o produto de terpeno foi aplicado a uma razão de 1.200 L/10000 m².

Os seguintes estágios de crescimento das uvas foram registrados:

- rompimento do botão, 26 de março de 2004
- floração em 1º de junho de 2004
- desenvolvimento do fruto, 6 de agosto de 2004

As aplicações do estudo aconteceram pré-desenvolvimento do fruto.

A estação de crescimento de 2004 foi excepcionalmente tardia e foi úmida demais. A pressão da doença para míldio felpudo foi extremamente alta, os níveis de botrite foram elevados, e a pressão do míldio pulverulento foi moderada. Ambas as formulações de YGP-GET em pó e líquida foram armazenadas a temperatura ambiente. Nenhuma condição de armazenamento especial foi utilizada.

Detalhes dos Produtos de Comparação

Experimento com formulação em pó: calda bordalesa, fabricada pela Manica Spa, Itália, embalada na Moscholios Chemicals SA; enxofre umetável.

Experimento com formulação líquida: Mikal(R)
5 (fosetyl-al 50%, folpet 25%), fabricado pela Bayer CropScience, distribuído na Grécia pela Bayer Hellas SA. Os produtos de comparações foram aplicados como se segue: Uma aplicação antes do rompimento do broto em uma dosagem de 15 g/L seguido por duas ou mais aplicações por ano a uma
10 dosagem de 6,5 g/L. Uma razão de aspersão de 1.000 L/10000 m² foi usada para todas três aplicações.

Experimento com formulação em pó: calda bordalesa (2 g/L) e enxofre umectável (2,2 g/L) foram aplicados em 26 de junho de 2004.

15 Experimento com formulação líquida: Mikal (3,2 g/L) foi aplicado em 28 de junho de 2004.

Os vinhedos foram examinados visualmente quanto aos sintomas do míldio felpudo. O início da doença foi marcado por uma média de duas manchas oleosas por folha. Os
20 tratamentos que preveniram o aparecimento de manchas adicionais foram considerados para prover proteção eficaz contra míldio pulverulento.

Resultados

Formulação em pó de YGP-GET (aspersão seca)

25 O tratamento convencional da calda bordalesa forneceu boa proteção contra míldio felpudo. Os sintomas brandos do míldio felpudo foram observados nos vinhedos de controle. A concentração do produto de terpeno de 0,5 g/L não forneceu proteção, e a concentração do produto de
30 terpeno de 2 g/L forneceu proteção apenas ligeiramente

melhor que o controle. Observação: a pressão da doença nesse sítio foi muito baixa em razão do tratamento recente com pesticida.

Foram encontradas dificuldades na dissolução da
5 formulação em pó como ela era muito fina, resultando na dispersão ao ar. Isso afetou adversamente a eficácia do produto.

Formulação Líquida de YGP-GET

Quando administrado em uma dose de 4 g/L, o produto
10 de terpeno forneceu excelente proteção contra míldio felpudo na cobertura exposta. Nenhuma proteção foi provida com a dosagem de 1 g/L. Sintomas sérios de míldio felpudo foram observados no bloco de controle.

A formulação líquida foi fácil de usar e tinha odor
15 agradável.

Discussão

O míldio felpudo pode causar perdas por devastação aos cultivadores de uvas em razão de seus efeitos no rendimento da colheita e qualidade das uvas. O
20 gerenciamento da doença focaliza a prevenção, porque, uma vez estabelecida, a infecção pode rapidamente se espalhar. No sítio aspergido com a formulação em pó, YGP-GET não exibiu eficácia em dosagem menor (0,5 g/L) e a dose de 2 g/L foi menos eficaz que o tratamento convencional. Naquele
25 sítio, as aplicações recentes de pesticida resultaram na pressão baixa da doença, o que pode ter limitado a eficácia aparente do tratamento com terpeno. Contudo, foi considerado que a dosagem de menos de 2 g/L de produto de terpeno foi inadequada.

30 No sítio aspergido com a formulação líquida, foi

provida excelente proteção da proteção exposta pelo nível de dose maior de 4 g/L. O crescimento vegetativo excessivo nesse sítio resultou em tratamento mais eficaz dos ramos externos, mais novos, em comparação ao crescimento dos mais velhos na cobertura interna. A cobertura foliar completa pelo produto de terpeno é útil, como o tratamento não é sistêmico. É estimado que um aumento de aproximadamente 30% em relação ao volume usado para tratamentos sistêmicos convencionais obtenha boa cobertura usando o tratamento com terpeno.

Conclusões

A aplicação foliar da formulação líquida de YGP-GET foi altamente eficaz no controle do míldio pulverulento em uma concentração de 4 g/L. As concentrações menores de 0,5 g/L de pó e 1 g/L de líquido não foram eficazes.

Exemplo 18 - Experimentos de Campo de Composição de Terpeno Encapsulado no Míldio Pulverulento

Míldio pulverulento de uvas é causado pelo fungo *Uncinula necator*, e causa reduções no crescimento do vinho, qualidade do fruto e resistência dos vinhedos ao inverno. Nas uvas de vinho, um nível de infecção de apenas 3% das bagas pode afetar a qualidade do vinho. A doença é caracterizada por pequenos emplastos branco acinzentados de crescimento de fungos que aumentam em um revestimento branco pulverulento sobre as folhas. O crescimento do fungo pode ocorrer também nas bagas, que podem se dividir. Em contraste com o míldio felpudo, que requer condições quentes e úmidas, o míldio pulverulento pode ser um problema nas estações de crescimento mais secas, como ele se favorece das áreas sombreadas com umidade, porém não

condições de tempo ensolarado. Medidas preventivas são recomendadas para o controle do míldio pulverulento, com aplicações precoces de fungicidas seguidas por aplicações repetidas em intervalos apropriados.

5 Esse estudo tem como objetivo investigar a eficácia da aplicação da composição de YGP-GET para a prevenção do míldio pulverulento em uvas.

Três blocos adjacentes, cada um cobrindo 1000 m², foram identificados no sítio 18 no vinhedo de Kir-Yianni. 10 Em 19 julho de 2004, um dos três blocos foi aspergido com a formulação líquida de YGP-GET a uma dose de 2 mL/L e um foi deixado sem tratamento. O bloco remanescente foi aspergido com o tratamento convencional de Equesion (2,5 g/L), Alliete (0,9 g/L) e Punch (0,075 mL/L) (vide a figura 22). 15 As parreiras em cada bloco foram monitoradas quanto aos sinais do míldio pulverulento na semana seguinte.

Três blocos adjacentes, adicionais, cada um cobrindo 1000 m², foram identificados no sítio 20 no vinhedo de Kir-Yianni. Em 20 julho de 2004, um dos três 20 blocos foi aspergido com a formulação líquida de YGP-GET a uma dose de 2 mL/L e os dois blocos remanescentes foram deixados sem tratamento (vide a figura 22). As parreiras em cada bloco foram monitoradas quanto aos sinais do míldio pulverulento na semana seguinte.

25 Em ambos os sítios, os flocos foram tratados anteriormente com vários produtos, incluindo um aplicação anterior do produto terpeno.

Todos tratamentos com terpeno foram aplicados a uma taxa de 1200 L/10000 m² para garantir cobertura completa.

30 Os estágios de crescimento que se seguem das uvas

foram registrados:

- surgimento do botão em 26 de março de 2004
- floração em 1 de junho de 2004
- desenvolvimento do fruto em 6 de agosto de 2004

5 As aplicações do estudo tiveram lugar na pré-desenvolvimento do fruto. A estação de crescimento de 2004 foi excepcionalmente tardia e completamente úmida. A pressão da doença do míldio felpudo foi extremamente alta, os níveis de botrite foram elevados, e a pressão do míldio
10 pulverulento foi moderada.

Detalhes dos Produtos de Comparação

Nenhum produto de comparação foi empregado no sítio 20. O tratamento de comparação empregado no sítio 18 é detalhado a seguir.

15 Punch(R) (flusilazol a 40%), DuPont.

Em 19 julho de 2004, Punch foi aplicado a uma dose de 0,075 mL/L como um tratamento preventivo para míldio pulverulento de acordo com as instruções do fabricante.

Detalhes dos Produtos Adicionais

20 Nenhum produto adicional foi usado no sítio 20. Os produtos adicionais empregados no sítio 18 são detalhados a seguir.

Sistema Equesion (famoxadona a 22,5% mais cimoxanil a 30%)

25 Alliete (fosetil-al a 80%)

Em 19 de julho de 2004, Equesion (2,5 g/L) e Alliete (0,9 g/L) foram aplicados como tratamentos preventivos para míldio felpudo. A dose foi determinada de acordo com as instruções do fabricante.

30 Os produtos de comparações e adicionais representam

tratamentos convencionais na programação de controle de praga integrada.

As parreiras foram examinadas visualmente quanto aos sintomas do míldio pulverulento.

5 Resultados:

Sítio 18

Aproximadamente 20% dos pedúnculos e caules no bloco de controle eram negros, indicando infecção moderada do míldio pulverulento. Em ambos, o bloco de tratamento convencional e o bloco tratado com terpeno, todos os caules e cachos estavam verdes, indicando o fornecimento de proteção adequada.

Sítio 20

Nenhuma evidência de infecção por míldio pulverulento foi observada em qualquer um dos blocos.

Observações Adicionais

Ao final da estação de crescimento, os blocos nos sítios 18 e 20 mostraram, de modo geral, uma tensão de perda devido à doença em relação ao restante do vinhedo.

Infecções por míldio pulverulento causam perdas consideráveis aos cultivadores através das reduções no crescimento da parreira, qualidade do fruto e resistência dos vinhedos ao inverno. Adicionalmente, a qualidade da parreira pode ser afetada por um nível de infecção de tão pouco quanto 3% das bagas. O controle da doença foca-se na prevenção, uma vez que, quando estabelecida, a infecção pode se dispersar rapidamente. Nesse estudo, a aplicação do produto de terpeno YGP-GET no sítio 18 preveniu eficazmente a infecção por míldio pulverulento, e o nível de controle exibido pelo produto de terpeno foi comparável aquele

provido pelo tratamento convencional. Os resultados do sítio 20 não são conclusivos, contudo, devido à falta da infecção por míldio pulverulento. Essa falta de infecção provavelmente se deve à aplicação extensiva de pesticidas antes do estudo, o que resultou em pressão baixa da doença.

O nível mais baixo de tensão devido à doença nos sítios 18 e 20 sugere que o tratamento precoce com terpeno aplicado nesses sítios pode ter sido benéfico no controle da infecção a longo prazo.

10 **Conclusões:**

O YGP-GET preveniu eficazmente a infecção por infecção por míldio pulverulento, com um nível de controle comparável aquele provido pelo tratamento convencional.

15 Exemplo 18 - Experimentos de Campo Adicionais da Composição de Terpeno Encapsulada no Míldio Pulverulento

O estudo teve o objetivo de investigar, adicionalmente, a eficácia do YGP-GET no tratamento do míldio pulverulento em uvas de mesa sem caroço do tipo Grimson. Uma área de 1000 m² no vinhedo de Tsigaras (aproximadamente 80 km ao sul do Kir-Yianni vinhedo) foi inadvertidamente deixada sem tratamento durante uma aplicação de Cisteína em 1 julho de 2004. As parreiras nessa área mostraram, subseqüentemente, sintomas graves de míldio pulverulento nas folhas, caules e uvas. Em 12 julho de 2004, a área sem tratamento foi aspergida com 3 mL/L da formulação líquida de YGP-GET a uma taxa de 1.200 L/10000 m², e o restante do vinhedo foi aspergido com o produto de comparação Rogana. As parreiras foram avaliadas quanto aos sintomas do míldio pulverulento após 24 horas.

30 As parreiras receberam sistema guia de treliça lira

alta.

Detalhes do Produto de Comparação

Rogana (fenbuconazol a 5%, binocap a 16%),
fabricado pela BASF (BASF Agro Hellas S.A., Athens, Greece)

5 Em 12 julho de 2004, Rogana foi aplicado ao vinhedo
de Tsigaras como um tratamento para míldio pulverulento. A
dose foi determinada de acordo com as instruções do
fabricante. As parreiras foram examinadas visualmente
quanto aos sintomas do míldio pulverulento.

10 Resultados

Os sintomas graves de míldio pulverulento eram
evidentes antes da aplicação de YGP-GET. Apenas 24 horas
após a aplicação de YGP-GET, a floração branca do míldio
pulverulento tornou-se preta, indicando atividade antifungo
15 efetiva. Como a doença foi efetivamente controlada nessa
época, nenhum tratamento adicional foi aplicado. O YGP-GET
mostrou eficácia comparável a do tratamento convencional.

Discussão:

Nesse estudo, uma infecção por míldio pulverulento
20 estabelecida foi tratada rápida e eficazmente empregando
YGP-GET. Apenas 24 horas após aplicação, a infecção grave
anterior por míldio pulverulento havia cessado por
aplicação do produto terpeno, com eficácia comparável ao
tratamento convencional.

25 Os dados preliminares obtidos desse estudo sugerem
que YGP-GET pode ser eficaz no tratamento das infecções por
fungos estabelecidas, além de mostrar capacidade
preventiva.

Exemplo 19 - Experimentos de Campo Adicionais da Composição
30 de Terpeno Encapsulado em Míldio Pulverulento

Histórico e Bases Racionais

No experimento corrente, o emprego de YGP-GET foi investigado como parte do programa experimental do vinhedo da Tasmânia (Frogmore Creek Vinhedo, Hathaway Trading Pty Ltd, Box 187, Richmond TAS 7025, Austrália) para controlar o míldio pulverulento empregando produtos orgânicos. O objetivo desse estudo foi investigar a eficácia de curto prazo da aplicação de YGP-GET no controle orgânico do míldio pulverulento em parreiras de uva Chardonnay.

Nesse experimento, as parreiras (variedade Chardonnay) foram tanto tratadas com o produto de terpeno YGP-GET quanto deixadas sem tratamento (controle) em 7 de fevereiro de 2005. Embora suprimida pelos tratamentos orgânicos anteriores, a gravidade do pré-experimento para míldio pulverulento estava a um nível considerado inaceitável comercialmente e era equivalente nas seis áreas de tratamento ativo e 6 áreas de controle. O estágio da colheita era aproximadamente o E-L 33-34 (pré-desenvolvimento do fruto).

YGP-GET (4 mL/L) (formulação líquida) foi aspergido nas seis áreas de 6 Chardonnay, que foi tratada anteriormente com leite. Seis áreas de Chardonnay serviram como controles sem tratamento, porém elas haviam sido tratadas anteriormente com óleo/soro. O número de parreiras por área era tipicamente de 7.

Detalhes da composição do YGP-GET empregado nesse protocolo são fornecidos na Tabela 20.

Tabela 20 - Formulação de Batelada Empregada no Presente Estudo

Detalhes da mistura de	Peso em kg	% em peso
------------------------	------------	-----------

matéria prima		
Geraniol	146,75	6,88
Eugenol	73,37	3,44
Timol	146,74	6,88
Partículas de levedura	327,55	15,35
Xantana	1,43	0,07
Polissorbato	1,43	0,07
Água	1.436,17	67,32
Total	2.132,01	100,00

A gravidade do míldio pulverulento foi avaliada 3 dias antes tratamento com terpeno e novamente 3 dias pós-tratamento. Em cada área, 20 cachos de uva foram selecionados aleatoriamente (10 cachos por lado de painel), e a gravidade da doença foi estimada como a área de porcentagem dos cachos coberta com colônias de míldio ativas. Nenhuma avaliação adicional foi possível uma vez que cultivador aspergiu subsequenteemente toda a área do experimento com enxofre e um adjuvante de aspersão à base de óleo vegetal (Synertrol Horti Oil).

Número/Área de Plantas a Serem Tratadas

Produto de Teste: YGP-GET (4 mL/L) a ser aplicado às 6 áreas de Chardonnay (total de aproximadamente 42 parreiras), que haviam sido tratadas anteriormente com leite.

Controle: Nenhum tratamento foi aplicado às 6 áreas de Chardonnay (total de aproximadamente 42 parreiras) a serem usadas como controles, porém elas haviam sido tratadas anteriormente com óleo/soro.

20 Métodos de Cultivo

Parreiras *Vitis vinifera* (Chardonnay) no Bloco B2:

posicionamento do broto na vertical com caules arqueados.

Disposição do Cultivo

Espaçamento: Distância de 2,5 m entre as fileiras e 1,25 m entre as parreiras (dentro da fileira), com 3.200 parreiras por hectare. A orientação das fileiras foi norte para sul.

Densidade da Cobertura

O método ponto-quadratim foi empregado para caracterizar a densidade da cobertura pré-experimento das parreiras de Chardonnay (Tabela 21). As medições foram realizadas em 13 de janeiro de 2005 por seleção das seções representativas da cobertura dentro das áreas de Chardonnay que anteriormente haviam sido tratadas com enxofre e deixadas não tratadas. Dez medições foram realizadas em cada uma das 6 áreas de cada tratamento anterior (isto é, um total de 60 medições para áreas tratadas com enxofre e 60 medições para áreas sem controle). Além disso, o comprimento e número de nodos em 3 brotos eretos (por área) foi medido.

Tabela 21 - Densidade da cobertura de pré-experimento das parreiras de Chardonnay

Antes do tratamento	Fend as (%)	Número de camada de folha (LLN)	Folhas internas (%)	Cachos internos (%)	Número médio de nodos	Comprimento médio do broto (cm)
Não tratado	12	1,5	22	26	21	110
Enxofre	5	2,0	27	40	21	104

Valores	20-	≤1,0-	<10%	<40%	NA	NA
ótimos	40%	1,5				

NA, não aplicável

Condição Geral

Tratamento anterior dessas áreas com materiais experimentais suprimiu o míldio pulverulento em comparação
 5 ao controle não tratado. Contudo, o nível de míldio pulverulento foi considerado comercialmente inaceitável, embora equivalente em ambas as áreas tratada com leite, óleo/soro.

Método de aplicação, dose e regime

10 O tratamento com YGP-GET (4 mL/L) foi aplicado em 7 de fevereiro de 2005 com uma pistola manual conectada a um carretel de mangueira e bomba montado na carroceria plana de um veículo utilitário. A aspersão foi propelida com uma pressão de bomba de 1.500-1.600 kPa, distribuindo
 15 aproximadamente 63 mL/segundo. O volume de aspersão padrão para tratamentos convencionais (aproximadamente 900 L/10000 m²) foi empregado.

A gravidade do míldio pulverulento, estimada como a área (%) dos cachos de uva cobertos com colônias de míldio
 20 ativo, foi avaliada para 20 cachos selecionados aleatoriamente dentro de cada área (10 cachos por lado de painel). A gravidade da doença foi avaliada em 4 de fevereiro de 2005, 3 dias antes da aplicação do tratamento com YGEP-GET e novamente no dia 10 de fevereiro de 2005, 3
 25 dias após aplicação do terpeno.

Os dados foram transformados usando transformação de arcsin para obter separações médias.

Resultados

Antes do tratamento, a gravidade média do míldio pulverulento nos cachos da uva Chardonnay nas 6 áreas a serem tratadas com terpeno (20,4%) foi semelhante aquela nas 6 áreas de controle (23,2%, Tabela 22). Análise estatística com base na transformação de arcsin desses dados verificou que não havia diferença significativa na gravidade da doença antes do tratamento (Tabela 23).

Três dias após o tratamento, contudo, a gravidade média do míldio pulverulento era de 23,8% nos cachos tratados com YGP-GET, versus 37,8% nos controles (Tabela 22). A transformação arcsin desses dados mostrou uma diferença estatisticamente significativa em favor dos cachos de uva tratados com terpeno, que tinham uma área menor coberta com as colônias de míldio ativo ($p = 0,058$; Tabela 23).

Tabela 22. Gravidade média do míldio pulverulento (%) nos cachos de Chardonnay antes e após tratamento com YGP-GET

Tratamento aplicado em	Gravidade Média	
	Em 4 de fev. 2005	Em 10 fev. 2005
7 de fevereiro de 2005		
YGP-GET	20,4	23,8
Nenhum	23,2	37,8

Tabela 23. Separação estatística dos tratamentos seguindo-se transformação arcsin dos dados

Tratameto aplicado em	Gravidade Média (SEM)	
	Em 4 de Fev. 2005	Em 10 de fev.2005
7 de fevereiro de 2005		
YGP-GET	0,2063 (0,03857)	0,2411 (0,04303)
Nenhum	0,2401 (0,08534)	0,3954 (0,07852)
	$t = 0,36$	$t = 1,72$

	df = 10	df = 10
	p = 0,726	p = 0,058
	Teste dois lados	Teste um lado
	testados:	testado:
	Nenhuma diferença	Não tratado > tratado

Discussão:

A infecção das parreiras com míldio pulverulento pode causar perdas consideráveis aos cultivadores através dos efeitos prejudiciais no crescimento dos vinhedos e resistência, bem como da qualidade do fruto e vinho. Nos

5 vinhedos controlados organicamente, os cultivadores estão buscando alternativas para os tratamentos tais como enxofre elementar.

Esse estudo investigou a eficácia das formulações

10 de terpeno encapsulado (4 mL/L) como uma formulação líquida no controle do míldio pulverulento em um vinhedo orgânico na Tasmânia, Austrália. Embora outros tratamentos experimentais venham sendo empregados em tão pouco quanto 3 semanas antes da aplicação do terpeno, o nível da infecção

15 por míldio pulverulento foi ainda considerado comercialmente inaceitável. Três dias após tratamento das parreiras de Chardonnay com YGP-GET, a gravidade do míldio pulverulento nas uvas tratadas foi significativamente menor que nos controles não tratados. Embora a gravidade da

20 infecção em controles sem tratamento tenha piorado durante os 6 dias entre as avaliações de pré e pós tratamento, ela permaneceu estável nas uvas tratadas. Portanto, YGP-GET parece ter tornada lenta a taxa de aumento da doença nos cachos de uva que possuíam colônias bem estabelecidas de

esporulação do míldio pulverulento antes do tratamento. Presumivelmente, a expansão da colônia foi inibida, embora as colônias existentes tenham continuado a esporular em algum grau. A avaliação de longo prazo maior da eficácia não foi possível em razão do cultivador ter aspergido subseqüentemente toda a área de experimento com enxofre.

Esses resultados encorajadores demonstram a eficácia do YGP-GET no controle do míldio pulverulento nas parreiras.

10 Exemplo 20 - Experimentos de Campo da Composição de Terpeno Encapsulado na Botrite

A podridão dos cachos, Botrite, das uvas é causada por *Botrytis cinerea*, um fungo comum que pode causar sérias perdas no rendimento do fruto. As bagas são o sítio predominante de infecção, embora a doença possa também afetar a floração e folhas. Inicialmente, as bagas infectadas parecem macias e aguadas e podem ficar cobertas com o crescimento do fungo cinza em condições de alta umidade. Com o tempo, as bagas infectadas murcham e caem. A botrite se favorece das condições úmidas com pouca circulação de ar e as bagas divididas ou danificadas são especialmente suscetíveis a dispersão da infecção. Estratégias de controle para a botrite incluem promoção de boa circulação de ar, prevenção do enrolamento e aplicação de fungicidas em épocas apropriadas durante a estação de crescimento.

O objetivo desse estudo foi o de investigar a eficácia de YGP-GET no tratamento da infecção por botrite nas uvas.

30 A emergência da botrite no vinhedo de Kir-Yianni em

meados de outubro de 2004 (3 semanas após uma aplicação de Teldor(R)) não seria tratada com agroquímicos convencionais uma vez que as restrições de tempo de reentrada associadas preveniriam a colheita planejada. Duas áreas de 1000 m² adjacentes foram portanto identificadas no sítio 7 do vinhedo e, no dia 12 de outubro de 2004, uma dessas áreas foi tratada com 4 mL/G de formulação líquida de YGP-GET e a outra foi deixada sem tratamento (vide figura 23). A colheita foi realizada 3 dias mais tarde, e a proporção de bagas infectadas foi determinada em cada área (porcentagem em peso do rendimento total). As bagas não infectadas de ambas as áreas tratada e não tratada foram então misturadas no tanque de fermentação.

O sítio 7 foi tratado com vários produtos antes da aplicação da formulação de terpeno, porém ainda mostrou infecção por botrite.

As parreiras receberam uma aplicação simples de 4 mL/L de formulação líquida de YGP-GET a uma taxa de 1.200 L/10000 m².

Os seguintes estágios de crescimento das uvas foram registrados:

- rompimento do botão, 26 de março de 2004
- floração em 1º de junho de 2004
- desenvolvimento do fruto, 6 de agosto de 2004
- colheita, 15 de outubro de 2004

As aplicações do estudo aconteceram 3 dias antes da colheita.

A estação de crescimento de 2004 foi excepcionalmente tardia e foi úmida demais. A pressão da doença para míldio felpudo foi extremamente alta, a pressão

do míldio pulverulento foi moderada e os níveis de botrite foram elevados.

YGP-GET foi aplicado nessa época para avaliar sua eficácia em potencial contra uma infecção por botrite, que não poderia de outra forma ter sido tratada em razão das
5 restrições de tempo de pesticida antes da colheita.

A avaliação visual do sítio antes da aplicação do produto de terpeno revelou evidência de infecção por botrite. Após a colheita, as bagas foram transportadas
10 sobre uma correia transportadora e as bagas infectadas foram separadas manualmente das não infectadas antes da moagem. A proporção de bagas infectadas foi calculada como uma porcentagem do rendimento total (em peso) para cada área.

Resultados

15 A avaliação visual do sítio antes da aplicação do YGP-GET revelou evidência de infecção por botrite. Seguindo-se a colheita (3 dias após aplicação de YGP-GET), as proporções das bagas infectadas foram de 13% e 23% nas áreas tratadas e não tratadas, respectivamente. As áreas
20 testadas não foram suficientes para avaliar o significado estatístico; contudo, o tratamento com YGE-GET tornou a progressão da doença claramente mais lenta.

A fermentação não foi afetada por mistura das bagas não infectadas das áreas tratadas e não tratadas com
25 terpeno.

Discussão

Os tratamentos convencionais para botrite devem ser descontinuados 3 semanas antes da colheita, deixando um tempo para que dano considerável à colheita e qualidade
30 ocorra. O desenvolvimento de um tratamento que seria

empregado até a colheita ou um que pudesse ser continuado até próximo a colheita em relação aos produtos existentes, resultaria em aperfeiçoamentos significativos no rendimento da colheita e qualidade do vinho e seria de benefício considerável para os cultivadores. Nesse estudo, o tratamento com o produto de terpeno YGP-GET tornou visivelmente lenta a progressão da infecção por botrite já estabelecida, apenas 3 dias antes da colheita, resultando em uma menor proporção das bagas infectadas na área tratada com terpeno em relação à área não tratada. Adicionalmente, a despeito do uso de YGP-GET próximo à colheita, a fermentação não foi afetada pela combinação das uvas tratadas e não tratadas.

Esses resultados sugerem que YGP-GET é eficaz na redução do impacto das infecções estabelecidas por botrite e pode ser usado próximo à colheita, sem efeitos prejudiciais à fermentação subsequente.

Exemplo 21 - Avaliação dos Terpenos Encapsulados para o Tratamento de Míldio Felpudo Estabelecido e Subsequente
Avaliação da Qualidade da Uva

Um experimento de YGP-GET foi realizado em 25/08/2004 aplicando a composição em uma taxa de 1.000 g por 250 litros.

Um vinhedo de Cabernet Sauvignon que foi afetado em 100% e sofreu perda substancial de folhas devido ao míldio felpudo foi aspergido. Quaisquer folhas remanescentes foram infectadas com manchas de míldio felpudo conforme evidenciado por mancha amarela na parte superior da folha e crescimento penugento na parte inferior da folha; a indicação clássica de míldio felpudo. Muitas folhas já

estavam quase que completamente amarelas, indicando infecção substancial. Essa perda de folhas e a infecção em geral retarda a maturidade das uvas e, em muitos casos, as uvas nunca amadurecerão completamente para fins de
5 fabricação de vinho.

A observação de cachos totalmente não amadurecidos (isto é, bagas verde escuro duras ~1 cm de diâmetro e de forma oval) ocasionalmente nos vinhedos indicaram que os mesmos estavam provavelmente infectados antes da
10 desenvolvimento do fruto e provavelmente na floração ou antes. Nenhuma aplicação de cobre anterior foi usada (calda bordalesa ou sulfato de cobre básico). Esse vinhedo estava altamente infectado na colheita anterior ao ponto que nenhuma colheita foi produzida de Cabernet Sauvignon. A
15 perda da folha no último ano foi de 100% a despeito do tratamento com bicarbonato de potássio na tentativa de obter o extermínio do míldio felpudo, seguido por aplicação de Estilbourina para um prazo maior de proteção sistêmica.

Em 19/09/2004, as uvas tratadas nesse experimento
20 foram colhidas e moídas e as observações que se seguem foram feitas com relação ao mosto (Tabela 24):

Tabela 24

	Controle	Tratado	Desejável
PH	3,28	3,30	3,3-3,5
TA	0,92	0,85	0,7-0,75
Brix	17,4	18,7	20-22

Esses resultados indicam que as uvas dos vinhedos tratados são mais maduras que aquelas dos vinhedos não
25 tratados. A observação das uvas propriamente indicou que as uvas não tratadas foram, em média, de cor mais leve,

algumas com um matiz rosa/púrpura/verde, indicativo de uvas que já passaram o desenvolvimento do fruto, considerando-se que as frutas tratadas eram de cor púrpura escura em média e opacas, típicas de uvas completa ou quase completamente amadurecidas.

O sabor dessas uvas revelou que as uvas tratadas possuem um sabor frutado pleno típico de Cabernet Sauvignon madura, considerando-se que as frutas não tratadas não possuem o sabor frutado pleno. As uvas não tratadas tinham um sabor ácido de maçã verde indicando provável taxa de ácido málico/tartárico alta para a boa fabricação do vinho.

Essas uvas foram moídas e os caules retirados na preparação para produção de um vinho dessas uvas, de modo a demonstrar a diferença nessas uvas e demonstrar a adequabilidade das uvas tratadas à fabricação do vinho. O cultivador de uvas foi avisado que esse tratamento poderia afetar o sabor do vinho, embora por sugestão, ele provou as uvas tratadas no dia após a aplicação de YGP-GET e não encontrou sabor ou aroma remanescente.

A diferença nas uvas tratadas e não tratadas é adicionalmente demonstrada na cor do mosto. O suco de uvas não tratadas era de cor verde clara/incolor (um pouco semelhante a mosto do vinho branco) considerando-se que as uvas tratadas eram de cor rosada típica das uvas Carbernet Sauvignon amadurecidas, imediatamente após a moagem.

Esses resultados indicam que YGP-GET é eficaz no tratamento do vinhedo do último verão, exterminando e cessando a reinfestação por míldio felpudo, pelo menos a curto prazo. Adicionalmente, a pesquisa na eficácia de longo prazo do YGP-GET no controle do míldio felpudo seria

útil, porém os resultados apresentados mostram que YGP-GET é um tratamento útil.

O míldio felpudo de início tardio pode arruinar completamente uma colheita e não existem atualmente
5 tratamentos eficazes que possam ser aplicados pouco antes da colheita e que mantenham sua capacidade de prover proteção. A resistência maior do YGP-GET é a capacidade de prover uma mortalidade rápida e manter sua eficácia por um período de tempo maior que os outros fungicidas de contato.

10 Existem vários antifungos nesse mercado que possuem um registro de rastreamento estabelecido contra míldio felpudo, porém todos necessitam de algum tempo após a aplicação antes da colheita ser realizada. Alguns tratamentos (como produtos contendo enxofre) não podem ser
15 empregados se a temperatura subir acima de 29,4°C. A fitotoxicidade dos fungicidas contendo cobre é também significativa, dependendo da variedade da uva. O contato com os fungicidas não possui um efeito de longo prazo, assim, uma segunda aplicação de um fungicida de atividade
20 mais longa é freqüentemente necessária, porém pode ser restrita por regulação relevante (por exemplo, PHI ou REI).

Muitos tratamentos convencionais para míldio felpudo possuem uma reentrada restrita (REI e/ou PHI) o que significa que o cultivador não pode aplicar o tratamento
25 com medo de que aplique alguma coisa como Mancozeb, que possui um PHI de 66 dias; o cultivador então ficaria impedido de colher suas uvas na maturidade plena.

O míldio felpudo está implicado como a causa primária dos vinhos muito pobres que estão sendo produzidos
30 leste do Mississippi. YGP-GET permitiria que as uvas

afetadas amadurecessem apropriadamente e fossem colhidas na maturidade plena nessa indústria que cresce rapidamente.

Vantajosamente, YGP-GET seria um candidato a aprovação pelos vários comitês "orgânicos" (muitos auto-designados) sendo esse produto apropriado para uso no crescimento das uvas, de acordo com as diretrizes "orgânicas". Isso abre outro filão em um segmento de mercado que cresce rapidamente nos Estados Unidos da América e mundialmente.

10 Exemplo 22 - Avaliação In Vitro das Propriedades Fungicidas dos Terpenos Encapsulados e Não Encapsulados

Testes adicionais foram realizados de modo a avaliar as 31 preparações de terpeno não encapsulado estabelecidas no Exemplo 15 e as preparações 16 e 22 encapsuladas nas partículas de glicano.

Para conduzir esses ensaios, 20.000 esporos foram colocados em caldo de dextrose de batata de 1/3 de resistência (PDB) e quantidades suficientes de formulações de terpeno selecionadas foram adicionadas para fornecer concentrações variando de 10 a 1.000 ppm. Esses materiais de teste foram colocados em tubos Eppendorf capeados, estéreis e separados com esporos de *Botrytis cinerea* (B.c.), incubados por 24 horas, então os esporos foram recuperados por centrifugação e as soluções de terpeno foram descartadas. Os esporos/biomassa foram enxaguados com água estéril, centrifugados novamente e então retomados em 300 µL de um PDB de 1/3 de resistência e transferidos para placas com 96 poços. A densidade óptica dos esporos sobreviventes crescendo em micélios foi medida com o passar do tempo. A atividade fungicida é definida como extermínio

total de 20.000 esporos após 24 horas de exposição ao terpeno, como evidência pela ausência de crescimento de micélio.

Os resultados sugerem que determinadas formulações não eram fungicidas em um nível estatisticamente significativo de acordo com as condições de teste apresentadas (resultados não mostrados). Essas eram:

1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30. Vide Exemplo 15 (Tabela 17) quanto aos detalhes das composições.

Tabela 25

Material	Concentração inibidora mínima (ppm)	Material	Concentração inibidora mínima (ppm)
3	<1.000; >750	7	<1.000; >750
10	<1.000; > 500*	13	<1.000; >750
16	<1.000; >750	22	<750; > 500
26	<1.000; >750	31	<1.000; >750

* Nos diferentes testes, a concentração mais baixa que não forneceu crescimento foi tanto de 500 quanto de 750 ppm.

15 **Teste Comparativo dos Compostos em Água e Encapsulados em Partículas Ocas de Glicano**

Amostras das formulações 16 (geraniol, eugenol e timol) e 22 (eugenol, timol e citral) encapsuladas em partículas ocas de glicano foram preparadas de acordo com as técnicas descritas anteriormente. As propriedades fungicidas foram então avaliadas para formulações encapsuladas e não encapsuladas empregando o protocolo

previamente descrito para as formulações não encapsuladas.

Os resultados foram bem diferentes com formulações de terpeno encapsuladas, conforme comparado com os terpenos suspensos em água, e mostrado na figura 24.

5 A concentração mínima eficaz é mostrada abaixo na Tabela 26.

Tabela 26

Material	MIC em suspensão	MIC em partículas de levedura
16	<1000, >750	<100, > 250
22	<750, > 500	< 500, > 250

Assim, os resultados com os materiais 16 e 22 são bem diferentes quando na suspensão aquosa e quando testados e encapsulados nas partículas de glicano. (Observação: conforme mencionado mais a frente, houve alguma variação nos resultados com terpenos suspensos em água, o experimento observado acima é um exemplo disso). Os valores MIC são compostos de vários experimentos. De modo importante, os resultados com formulações de terpeno encapsuladas não sofrem dos problemas de capacidade de variação associados às suspensões de terpeno aquosas. Foram realizados cinco testes separados de terpenos suspensos em água e três com as YPs.

20 As formulações de terpeno encapsulado são prontamente miscíveis em água e fornecem uma formulação de terpeno de liberação lenta no meio aquoso. Isso resulta em um tempo de exposição mais longo dos esporos aos terpenos.

Foram encontrados problemas de monitoramento das formulações de terpeno não encapsulado em suspensão nos meios de testes que podem ter afetado os resultados.

Exemplo 23 - Avaliação In vitro dos Terpenos Encapsulados para Controle do Míldio Pulverulento

O presente estudo foi conduzido para determinar as misturas de terpeno mais eficazes e os níveis nos quais elas são ativas em relação ao míldio pulverulento.

Foram avaliados 31 terpenos ou misturas de terpeno encapsulado nas paredes de célula de levedura (terpenos-YP); os códigos empregados em relação às composições específicas são apresentados na Tabela 17 do Exemplo 15.

O desenvolvimento do protocolo foi acionado pela biologia básica do organismo. O fungo é um agente patogênico obrigatório e assim não pode ser cultivado se não nas folhas das uvas. Portanto, nós inoculamos plantas (sementes 'Riesling') e conídios colhidos por lavagem das folhas infectadas com esporulação abundante.

Uma variação no método usado por Reuveni (2001; Can. J. Plant Pathol. 23:52-59) foi empregada. Uma ou duas folhas infectadas com *Uncinula necator* foram colocadas em um tubo de plástico estéril de 50 mL. Tween-20 (7,5 mL, 0,0005%) foi adicionado ao tubo e as folhas foram vigorosamente vortexadas por 30 segundos. Os conídios foram contados empregando uma câmara de contagem e ajustados para $1-2 \times 10^5$ conídios/mL. Terpenos YP foram diluídos para soluções de trabalho de 4.000 ppm. As reações aconteceram em tubos Eppendorf siliconizados de 600 µL e o volume final da reação foi de 600 µL. Terpenos de YP foram diluídos no tubo para fornecer concentrações finais de 100, 250, 500, 750 ou 1.000 ppm de terpeno. 40 µL da suspensão de conídios foram adicionados a cada tubo e os mesmos foram brevemente vortexados separadamente. Água e material de teste

(apenas partículas, sem terpeno) foram incluídos como os controles. Os materiais de teste e conídios foram incubados por 1-1 hora e meia para prover tempo de contato suficiente para inibição dos esporos, sem afetar adversamente a
5 germinação do esporo na ausência dos terpenos. Essa breve imersão foi essencial a fim de permitir tempo de contato adequado com os terpenos, uma vez que as misturas de terpeno na superfície do ágar volatizaram rapidamente ou foram absorvidas na água.

10 Lâminas de vidro para microscópio foram revestidas com 750 µL de ágar aquoso a 1,5%. As lâminas de vidro foram colocadas nas caixas de germinação, cada uma contendo um mata-borrão para umidade. Quando foram feitas tentativas para colocar diretamente os conídios e misturas de terpeno
15 sobre o ágar, aconteceram alguns efeitos dos terpenos, provavelmente em razão do tempo de contato inadequado. Foram colocadas tampas sobre cada uma das caixas e os materiais foram deixados incubar por 48 horas a temperatura ambiente em um tampo de bancada. Em alguns experimentos, as
20 lâminas com diferentes níveis de terpenos foram colocadas dentro da mesma caixa. Foi verificado que essa técnica permite resultados errados, uma vez que os voláteis das lâminas com altos níveis de terpeno inibiram os conídios sobre as lâminas com níveis menores de materiais. Portanto,
25 os dados finais foram tomados de lâminas nas caixas contendo apenas um ou dois níveis do mesmo material de teste.

Após 48 horas, as lâminas foram examinadas usando um microscópio de luz. Vários ajustes de fase-contraste
30 foram empregados para se obter um contorno mais definido de

cada conídio. As YPs são muitas vezes menores que os conídios e as duas eram fáceis de serem diferenciadas. Pelo menos 100 esporos foram avaliados quanto a germinação por mancha; se o número de esporos observáveis for inferior a 5 100, cada esporo encontrado será contado. Os comprimentos dos tubos de germinação de pelo menos 100 conídios germinados foram medidos, embora mais tarde tenha sido verificado que esses dados não eram muito úteis.

Nós também verificamos que uma pequena porcentagem 10 de conídios já havia germinado quando eles foram retiradas das folhas. Isso é de se esperar, uma vez que as conídios do míldio pulverulento não necessitam de água livre para germinar e portanto, podem germinar a qualquer tempo. Portanto, nós ajustamos um máximo de 4% de germinação como 15 nossa interrupção para atividade fungicida, uma vez que esse era o nível frequentemente observado nos controles de água de tempo 0. A idade da infecção por míldio pulverulento também resultou em alguma variabilidade. As infecções com mais de três semanas forneceram um nível 20 menor de germinação total nos controles (36% nos controles de água sobre lâminas de ágar), enquanto infecções mais novas forneceram níveis de germinação muito maiores (ao redor de 70%). Nós observamos todos materiais de teste várias vezes, com os dados sendo coletados em níveis onde 25 ocorreu a inibição. Foram empregadas três replicações por teste.

Resultados:

As concentrações dos materiais variaram de 100 a 1.000 ppm de terpeno. Cada material de teste era fungicida 30 pelo menos na concentração mais alta testada. Quatro

classes de eficácia fungicida foram estabelecidas para as 31 formulações. As formulações de terpeno e seu grupamento, com base na dose inibidora mínima (fungicida) são providas a seguir.

- 5 Grupo A (> 100 ppm, < 250 ppm): 7, 10, 22 e 30
 Grupo B (> 250 , < 500): 1, 2, 3, 7, 8, 13, 14, 16,
 19, 20, 23-29 e 31
 Grupo C (> 500 , < 750): 4, 6, 9, 11, 15, 18 e 21
 Grupo D (> 750 , < 1.000): 5, 12 e 17

10 A dose fungicida foi calculada com base na
 germinação dos conídios de míldio pulverulento 48 hora após
 a reação, conforme determinado por observação microscópica.
 Uma vez que os conídios de míldio pulverulento germinam
 dentro de 24 horas no controle, se a germinação não ocorrer
 15 com 48 horas, nós consideramos que os esporos foram
 exterminados. Em alguns poucos casos, nós continuamos a
 observar por 72 horas ou mais, porém nenhuma informação
 adicional foi obtida.

20 Exemplo 24 - Avaliação *In vitro* de Terpenos Encapsulados
 para Controle do Míldio Felpudo

 O presente estudo foi realizado para determinar as
 misturas de terpeno mais eficazes e os níveis nos quais
 elas são ativas em relação ao míldio felpudo.

25 *Plasmopara viticola*, o agente causador do míldio
 felpudo da uva, *in vitro*, foi empregado em todos os
 estudos. Essa era uma cepa patogênica do tipo selvagem
 obtida de colegas em Cornell. O organismo foi mantido nas
 folhas de sementeiras obtidas de sementes 'Riesling'.

30 O desenvolvimento do protocolo foi acionado por
 biologia básica do organismo. O fungo é um agente

patogênico obrigatório e assim não pode ser cultivado se não nas folhas das uvas. Portanto, nós inoculamos plantas (sementeiras 'Riesling') e colhemos esporângia por lavagem cuidadosa das folhas infectadas com água. Nós tentamos, 5 originalmente, conduzir os ensaios por observação da esporângia sobre as lâminas de vidro com sobrelâminas. Contudo, nosso propósito era olhar as lâminas por um tempo e esse método simplesmente não permitiu isso. Os volumes empregados eram muito pequenos para avaliação adequada, a 10 esporângia freqüentemente desintegra quando da pressão da sobrelâmina e os zoósporos enquistariam muito rapidamente após liberação. Foi empregada uma variação no método usado por Reuveni (2001; Can. J. Plant Pathol. 23:52-59) empregando lâminas de aperto. Essas lâminas não requerem 15 sobrelâminas, os zoósporos permanecem móveis por muitas horas e os volumes usados permitem múltiplas avaliações com o passar do tempo.

Para todos os experimentos, esporângias de 1-3 folhas infectadas com *Plasmopara viticola* foram lavadas 20 gentilmente com água estéril em um béquer e contadas empregando uma câmara de contagem Petroff-Hauser. Uma concentração de esporângias foi de pelo menos $1 \times 10^5/\text{mL}$.

Terpenos YP foram diluídos nas soluções de trabalho de 4.000 ppm. As reações aconteceram em tubos Eppendorf de 25 600 μL siliconizados e o volume de reação final foi de 100 μL . Os terpenos YP foram diluídos no tubo para fornecer concentrações finais de terpeno de 10, 50, 100, 250 e 500 ppm. Setenta e cinco μL da suspensão de esporângias foram adicionados a cada tubo e gentilmente misturadas por 30 pipetação ascendente e descendente. Água e material de

teste 32 (apenas YP, sem terpeno) foram incluídos como os controles.

Ensaio número 1 - Tubos Fechados

Uma avaliação preliminar foi realizada em todos os 31 materiais de teste, em terpeno a 10, 50 e 100 ppm para estimar a faixa correta de eficácia (isto é, nenhum zoósporo móvel observado durante as oito horas subsequentes). Uma vez que as esporângias foram observadas germinar e os zoósporos foram observados nos controles (meia a uma hora mais tarde), 15 µL foram transferidos para uma lâmina de aperto de vidro do tubo, um por vez e imediatamente observados empregando um microscópio de luz. Se os zoósporos móveis pudessem ser vistos nessa concentração, isso não foi observado. A lâmina foi limpa. A cada 2-3 horas, o processo foi repetido com novo material de teste do tubo. Ao final de 8 horas, a porcentagem de germinação das primeiras 100 esporângias foi determinada. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente e observadas novamente no dia seguinte. Os critérios para atividade de extermínio foram (a) germinação esporangial não superior a dos controles em 0 hora (não superior a 10%) e (b) nenhum zoósporo móvel. As porcentagens da germinação de esporângias nas doses eficazes variaram de 1,8 a 6,7% em comparação aos controles de água (87%) e YP-32 (76%).

Nesse ensaio, as esporângias estavam em contato constante com os materiais de teste no recipiente vedado.

Ensaio número 2 - Incubação de Uma Hora

O sistema de ensaio descrito acima não pode prover dados acurados com relação às concentrações letais, em razão da ausência de germinação esporangial e zoósporos

moveis presentes nos materiais em tubos fechados e os materiais de teste que são continuamente imersos nas soluções de teste. Nós não podemos remover as células dos materiais na solução em razão da centrifugação ser letal às esporângias e zoósporos. Portanto, após 1 hora de incubação nos tubos Eppendorf fechados, as misturas de teste (40 µL) foram transferidas para as lâminas de aperto. Nessa camada fina, espera-se que os terpenos volatilizem no ar e portanto, espera-se que as concentrações letais sejam determinadas mais acuradamente.

As lâminas foram armazenadas em caixas de germinação, cada uma contendo um mata-borrão para umidade. A cada duas horas as lâminas foram inspecionadas quanto aos zoósporos móveis. A concentração na qual nenhum zoósporo móvel é observado após 24 horas foi considerada a MIC nesse ensaio.

Resultados:

As concentrações de materiais de teste diferiram entre os ensaios, porém no total variaram de 10 a 500 ppm de terpeno. Cada material de teste foi eficaz pelo menos na concentração mais alta testada em ambos os ensaios. Três classes de Concentrações Mínimas Eficazes (MICs) foram estabelecidas para os 31 terpenos em cada teste. A MIC para cada material de teste é a concentração na qual os zoósporos móveis estão ausentes.

Os grupos listados empregando os números de teste são como se segue:

Ensaio número 1 - MICs - Tubos fechados (imersão constante nas suspensões de terpeno)

Grupo A (< 50 ppm): 3, 7, 11, 14, 17, 19, 25 e 26

Grupo B (> 50 , < 100): 1, 4, 8, 10, 13, 16, 20, 22, 23, 27, 28, 30 e 31

Grupo C (> 100 , < 250): 2, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 29

5 Ensaio número 2 - MICs - Incubação de Uma Hora
(terpenos dissipados por volatilização a partir das camadas finas)

Grupo A (< 100 ppm): 4

10 Grupo B (> 100 , < 250): 3, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20 e 22-31

Grupo C (> 250 , < 500): 1, 2, 5, 6, 9, 12, 15, 18 e 21

Trinta e um materiais de teste de terpeno YP foram avaliados em suas capacidades de inibir a liberação de zoósporos móveis das esporângias da *Plasmopara viticola*. Dois ensaios foram conduzidos. No primeiro teste, nós examinamos ambas germinação esporangial e motilidade de zoósporo a partir dos materiais incubados nos tubos fechados; no segundo teste, nós avaliamos apenas a mobilidade do zoósporo nas lâminas de depressão, após incubação nos tubos fechados por uma hora.

A ausência de zoósporos móveis é o modo mais claro para determinar a eficácia dos materiais de teste e, portanto, foi empregada como o critério definitivo. A mobilidade do zoósporo é importante para infecção por esse agente patogênico. A inibição da germinação das esporângias é a primeira etapa na direção do controle da doença do míldio felpudo: se as esporângias permanecem intactas, então os zoósporos não serão liberados. Nossos dados com relação à germinação esporangial sustentam as MICs acima,

mesmo que a germinação nunca fosse de 0%. Algumas esporângias já haviam germinado quando foram colhidas das folhas. A porcentagem de germinação a 0 hora (nenhum zoósporo observado) variou de 6% a 16%.

5 No primeiro ensaio, os terpenos controlaram a liberação de zoósporos sob condições de teste ideais. Indubitavelmente, os materiais de teste possuem um efeito letal sobre o agente patogênico do míldio felpudo. Contudo, o Ensaio número 2 provê um teste melhor da letalidade em
10 situações que podem também ocorrer nas folhas da planta, onde os terpenos são dissipados por volatilidade. Tomados juntos, os dois ensaios fornecem uma avaliação completa das capacidades *in vitro* dos materiais de terpeno YP no controle do agente patogênico do míldio felpudo da uva.

15 Exemplo 25 - Avaliação *In vitro* dos Terpenos Encapsulados para Controle de *Botrytis cinerea*

 Quinze terpenos ou misturas de terpenos encapsulados nas paredes de célula de levedura foram avaliados. As formulações testadas não contêm L-carvona.

20 *Botrytis cinerea* foi empregado em todos os estudos. A identificação da cepa é B36 e foi obtida da Cornell University. O organismo foi mantido em ágar V8 a 25°C.

 O protocolo desse estudo combina aspectos de um ensaio de rasazurina (Alamar Blue) com outro protocolo
25 previamente usado com *B. cinerea*. A presença de resazurina permite que se faça a medição dos níveis de letalidade dos terpenos na presença de partículas de levedura.

 Os esporos da *Botrytis cinerea* foram colhidos em água e ajustados para uma concentração de 1 x 10⁵
30 esporos/mL. Terpenos YP foram diluídos para concentrações

5 finais de 100, 250 ou 500 ppm em tubos Eppendorf estéreis de 1,5 mL. 50 µL da suspensão de esporo e 375 µL de PDB resistência 1/3 foram adicionados aos tubos. As suspensões foram vortexadas rapidamente e incubadas à temperatura ambiente por 24 horas. O interior de cada tubo foi então raspado empregando um palito de dente estéril para liberar as hifas das paredes.

10 Ensaio Fungostático: Após 24 horas, duas amostras separadas de 50 µL das suspensões de teste foram removidas e colocadas em poços de placas de microtitulação em conjunto com 30 µL de PDB resistência a 1/3 e 20 µL de resazurina a 250 ppm. Essas misturas foram incubadas por toda a noite por 16-20 horas. Observações visual foram feitas. Aquelas concentrações de YP e suspensões de esporo 15 onde as misturas de teste permaneceram púrpura foram consideradas como sendo fungostáticas. As suspensões de resazurina são púrpura, porém se reduzidas por atividade biológica, as soluções se tornam rosa e então límpidas.

Ensaio Fungicida:

20 Após as duas amostras das suspensões de teste serem removidas, os tubos foram centrifugados a 314 rad/s por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado, que continha YPs, esporos de *Botrytis* e qualquer hifa germinada foi lavado com 400 µL de água. Os tubos foram centrifugados 25 novamente e a microesfera foi ressuspensa em 400 µL de PDB 1/3 estéril. Foram adicionados 150 µL de resazurina a 250 ppm em cada tubo. Os tubos foram vortexados e incubados à temperatura ambiente por toda a noite por 16-20 horas. Avaliações visuais foram realizadas e aquelas concentrações 30 de YP e suspensões de esporo onde as misturas de teste

permaneceram púrpura foram consideradas como sendo fungicidas. Após 72 horas, avaliações visuais dos tubos foram realizadas novamente e amostras púrpura foram consideradas com sendo fungicidas.

5 Cada poço ou tubo foi avaliado quanto à classificação de cor. Nenhuma alteração de cor foi classificada como 4; poços límpidos foram classificados como 0. Uma classificação de 3 ou mais foi considerada estática (pouca ou nenhuma alteração de cor) e apenas uma
10 razão de 4 (nenhuma alteração) foi considerada letal.

Três replicações de cada material de teste em cada concentração foram usadas para cada experimento e cada experimento foi realizado duas vezes.

Resultados:

15 Testes fungostáticos - Cada material de teste foi fungostático pelo menos na concentração mais alta testada. O critério para eficácia foi de pelo menos 75% de inibição de crescimento em relação ao controle. As faixas de eficácia foram estabelecidas para os 15 terpenos e são
20 providas a seguir.

Grupo A (< 100 ppm): 3, 7, 10, 16, 19 e 26

Grupo B (> 100, < 250): 1, 2, 6, 11, 13, 17 e 22

Grupo C (> 250, < 500): 4 e 8

Testes fungicidas - Avaliação visual da alteração
25 de cor para os testes fungicidas foi medida duas vezes: uma vez após 16-20 horas e uma vez novamente após 72 horas. Após 20 horas, todos os materiais de teste foram fungostáticos, pelo menos na concentração mais alta testada. Contudo, após 72 horas, apenas algumas das
30 amostram ainda eram consideradas fungicidas. As faixas de

eficácia para cada terpeno em cada ponto de tempo são fornecidas a seguir.

Após 16-20 horas:

Grupo A (> 100 , < 250): 2, 3, 6, 7, 10, 13, 16, 17,
5 19, 22 e 26

Grupo B (> 250 , < 500): 1, 4, 8 e 11

Após 72 horas:

Grupo A (> 100 , < 250): 7

Grupo B (> 250 , < 500): 1, 3, 10, 13, 16, 19, 22 e
10 26

Grupo C (> 500): 2, 4, 6, 8, 11 e 17

Classificações do Compósito:

Cada faixa de eficácia recebeu uma classificação (Grupo A=1 , B=2 e C=3).

15 As tabelas que se seguem (Tabelas 27 a 29) mostram as classificações para cada teste e as classificações totais para cada terpeno YP. Quanto menor o número, melhor a eficácia.

Tabela 27 - Faixas de Eficácia e Classificações para Cada

20 Teste

Número	Código	Estática	Classificação	16 - 20 horas	Classificação	72 horas letal	Classificação
1	G	>100 , <250	2	>250 , <500	2	>250 , <500	2
2	E	>100 , <250	2	>100 , <250	1	>500	3
3	T	<100	1	>100 , <250	1	>250 , <500	2
4	C	>250 ,	3	>250 ,	2	>500	3

		<500		<500			
6	GE	>100, <250	2	>100, <250	1	>500	3
7	GT	<100	1	>100, <250	1	>100, <250	1
8	GC	>250, <500	3	>250, <500	2	>500	3
10	ET	<100	1	>100, <250	1	>250, <500	2
11	EC	>100, <250	2	>250, <500	2	>500	3
13	TC	>100, <250	2	>100, <250	1	>250, <500	2
16	GET	<100	1	>100, <250	1	>250, <500	2
17	GEC	>100, <250	2	>100, <250	1	>500	3
19	GTC	<100	1	>100, <250	1	>250, <500	2
22	ETC	>1 00, <250	2	>100, <250	1	>250, <500	2
26	GET C	<100	1	>100, <250	1	>250, <500	2

Tabela 28 - Classificações para Cada Teste e Contagem de Compósito

Número	Código	Estática	16-20 horas letal	72 horas letal	Compósito
1	G	2	2	2	6
2	E	2	1	3	6
3	T	1	1	2	4

4	C	3	2	3	8
6	GE	2	1	3	6
7	GT	1	1	1	3
8	GC	3	2	3	8
10	ET	1	1	2	4
11	EC	2	2	3	7
13	TC	2	1	2	5
16	GET	1	1	2	4
17	GEC	2	1	3	6
19	GTC	1	1	2	4
22	ETC	2	1	2	5
26	GET	1	1	2	4
	C				

Tabela 29 - Classificações de Terpenos YP do Mais Eficaz ao Menos Eficaz

Número	Código	Compósito
7	GT	3
3	T	4
10	ET	4
16	GET	4
19	GTC	4
26	G ETC	4
13	TC	5
22	ETC	5
1	G	6
2	E	6
6	GE	6
17	GEC	6
11	EC	7
4	C	8.
8	GC	8

Os oito materiais de teste mais eficazes possuem

timol (T) tanto sozinhos quanto como um componente de mistura.

Discussão:

Nos estudos *in vitro* anteriores, materiais de teste
5 de terpeno YP que continham L-carvona proveram eficácia
mínima no controle dos agentes patogênicos importantes das
plantas. Os dezesseis materiais de teste que continham esse
componente foram portanto excluídos. Resazurina foi
incluída como um corante indicador. Como o *Botrytis* degrada
10 a razurina, uma alteração de cor do púrpura para rosa à
límpido ocorre. Para os ensaios fungistáticos, as amostras
foram transferidas para placas de microtitulação de 96
poços e reagidas com resazurina por 16-20 horas antes da
avaliação visual de mudança de cor. Após centrifugação e
15 lavagem, o material remanescente nos tubos foi reagido com
resazurina para prover avaliações fungicidas.

Material de teste YP-7 foi a amostra mais eficaz em
cada teste. O YP-7 também é o material mais ativo no
controle do míldio pulverulento, *in vitro*.

20 Conclusões:

Nem todos os materiais de teste YP foram
fungostáticos contra *Botrytis cinerea* pelo menos a 500 ppm.
Após 16-20 horas, todos os materiais foram considerados
como sendo fungicidas pelo menos a 500 ppm. Contudo, após
25 72 horas, apenas 10 materiais de teste ainda eram
considerados como sendo fungicidas. Os mais eficazes eram
fungicidas entre 250 e 500 ppm.

Exemplo 26 - Avaliação *In vitro* dos Terpenos Encapsulados para Controle das Bactérias da Plantas

30 Todas as três bactérias testadas eram

proteobactérias e também gram-negativas. Elas possuem uma membrana externa composta principalmente de lipopolissacarídeos. *Erwinia amylovora* é da família *Enterobacteriaceae*. Outras bactérias dessa família incluem

5 *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*. *Pseudomonas syringae* é da família *Pseudomonadaceae*. Outros elementos importantes dessa família incluem *Pseudomonas aeruginosa* (um agente patogênico oportunista). Proximamente relacionadas às *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* estão

10 inúmeras variedades patogênicas, incluindo aquelas que infectam o arroz e a cenoura. As *Pseudomonas* e *Xanthomonas* estão muito proximamente relacionadas.

Durante o século 20, introduções de material de planta infestado serviram para estabelecer a *E. amylovora*

15 na Europa, Oriente Médio e Nova Zelândia. A *E. amylovora* causa o encrestamento da maçã e da pêra. Em 1995, a praga foi observada primeiro em Po River Valley ao norte da Itália, que é a maior área de produção de pêras do mundo. Desde 1995, o governo italiano destruiu 500.000 pereiras em

20 uma tentativa de erradicar a *E. amylovora* (<http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/FireBlight/HISTORY.HTM>).

O crestamento bacteriano aureolado e o simples do feijão representam as doenças mais economicamente

25 importantes e difundidas do feijões secos e do tipo aperitivo. Os Estados Unidos da América, Canadá e Colômbia são alguns dos grandes produtores desses feijões. A maioria das estratégias de controle envolve o plantio de sementes isentas de agente patogênico certificadas, alternância de

30 colheita e aspersões de produtos químicos semanalmente

(<http://www.ipgenetics.com/commonbean.asp>).

Metodologia:

Erwinia amylovora (cepa Ea273; crestamento da maçã), *Pseudomonas syhngae* pv. *phaseolicola* (cepa Pph MF; 5 crestamento bacteriano aureolado do feijão) e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (cepa Xph XPW; crestamento bacteriano comum do feijão) foram usadas nesse estudo. Essas cepas foram obtidas da Cornell University.

Culturas - Todas três bactérias foram cultivadas em 10 placas LB (Luria-Bertani) (Sambrook e outros, 1989) a 28°C. Culturas de partida (50 mL de caldo LB) foram inoculadas das placas e cresceram por toda a noite (17,8 rad/s, 28°C). Um mL da cultura de partida foi transferido para um frasco novo de caldo LB de 50 mL e cresceu sob as mesmas condições 15 até a fase estacionária ser alcançada. As culturas foram lidas em 620 nm quanto a densidade óptica (OD) e então foram diluídas com caldo LB para fornecer 1005-106 células/mL. Esse material diluído foi empregado para inocular os poços nos ensaios de placa de microtitulação.

20 Ensaios Bacteriostáticos:

Os ensaios da placa foram conduzidos empregando caldo LB como o meio de crescimento. Os materiais de teste de terpeno YP foram diluídos na placa para fornecer uma faixa de 7,8 a 1.000 ppm (Al terpeno). As bactérias 25 diluídas foram adicionadas à cada poço para fornecer um volume de poço final de 200 µL. Os poços de controle não contêm quaisquer terpenos YP. As placas foram lidas a 620 nm para medições iniciais (OD inicial) e incubadas a 28°C por dois dias. Após dois dias, as placas foram novamente 30 lidas a 620 nm (OD final). OD final menos OD inicial (OD

delta) fornece a alteração no crescimento em relação ao tempo. O critério para eficácia foi pelo menos de 75% de inibição do crescimento em relação ao controle. Portanto, o OD delta nos poços de teste deveria ser inferior a 25% do crescimento nos poços de controle, a fim de ser considerado eficaz no controle das bactérias.

Ensaio Bactericidas:

Após os ensaios bacteriostáticos serem completados, as placas foram centrifugadas a 209 rad/s por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e 100 µL do caldo LB fresco foram adicionados a cada poço. As placas foram lidas em 620 nm (OD inicial) incubadas a 28°C por 3-4 dias e lidas novamente a 620 nm (OD final). Concentrações eficazes proveram pelo menos 75% de inibição de crescimento em relação ao controle.

Duas replicações foram usadas para cada terpeno YP e ambos os ensaios (estático e letal) foram conduzidos três vezes para cada bactéria.

Resultados:

Ensaio Bacteriostático - Para todas as três bactérias, cada material de teste foi bacteriostático pelo menos na concentração mais alta testada. O ensaio foi operado por 48 horas. O critério para eficácia foi pelo menos de 75% de crescimento em relação ao controle. As faixas de eficácia foram estabelecidas para os 31 terpenos e são providas a seguir.

Tabela 30 - Resultados Bacteriostáticos

Agente Patogênico	MIC (ppm)	Estática	Terpeno YP
-------------------	-----------	----------	------------

<i>Erwinia amylovora</i>	>15,625, <31,25	3,7,13,16,19,20,22,24,27
	>31,25, <62,5	6,8,9,10,14,17,18,21,23,26,28,29,31
	>125, <250	n/a
	>250, <500	5
<i>Pseudomonas Syringae</i>	>125, <250	13,14,16,22,30
	>250, <500	1-4,6-12,15,17-20,23-29,31
	>500, >1000	5,21
<i>Xanthomonas Campestris</i>	>31,25, <62,5	3,14
	>31,25, <62,5	1,2,6,7,9,10,13,16,23,25-28,30
	>125, <250	4,8,11,12,15,18-20,22,24,29,31
	>250, <500	5,17,21

Ensaio Bactericida - Um grande número de formulações de terpeno não foi eficaz no extermínio das bactérias na concentração mais alta testada. As faixas de eficácia foram estabelecidas para os 31 terpenos e são

5 providas a seguir na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultados do Ensaio Bactericida

Agente Patogênico	MIC Letal (ppm)	Terpeno YP
<i>Erwinia amylovora</i>	>250, <500	3,7,9,10,11,13,14,16
	>500, >1.000	1,2,6,8,15,19,22,26
	1.000+	4,5,12,17,17,20,21,23,24,25,27-31

<i>Pseudomonas Syringae</i>	>500, >1.000	3, 5, 7, 10, 13, 19, 26
	1.000+	1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14- 18, 20-25, 27-31
<i>Xanthomonas Campestris</i>	>250, <500	2, 13
	>500, > 1.000	4, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 19, 20, 22, 28
	1.000+	1, 3, 5, 6, 9, 12, 16, 17, 18, 21, 23-27, 29-31

Em cada teste, *Erwinia* foi o agente patogênico mais sensível às formulações de terpeno YP seguido por *Xanthomonas* e então *Pseudomonas*.

As classificações foram avaliadas para cada terpeno YP em cada ensaio para cada bactéria. Quanto menor o número de classificação, melhor a eficácia do material de teste. As classificações estática e letal foram multiplicadas para fornecer uma contagem da combinação. Esse número indica o quanto o terpeno YP controlou cada bactéria. As contagens das três combinações (uma para cada bactéria) foram adicionadas para fornecer uma contagem do compósito, que indica a eficácia do terpeno YP através de todas três bactérias. A tabela 32 lista os terpenos YP em ordem de eficácia com base na contagem do compósito (total) juntamente com a composição de cada material de teste.

Tabela 32 - Contagens Totais de Compósito de Controle Bacteriano

Código YP	Contagem do Compósito	Terpenos	Código YP	Contagem do Compósito	Terpenos
YP-13	4	TC	YP-28	14	GTCL

YP-3	6	T	YP-1	16	G
YP-14	6	TL	YP-15	16	CL
YP-7	7	GT	YP-23	16	ETL
YP-10	8	ET	YP-24	16	ECL
YP-16	9	GET	YP-30	17	GETL
YP-19	10	GTC	YP-4	19	C
YP-22	10	ETC	YP-18	19	GEL
YP-2	12	E	YP-25	19	TCL
YP-9	12	GL	YP-29	19	GECL
YP-26	12	GETC	YP-31	19	GETCL
YP-11	13	EC	YP-12	22	EL
YP-20	13	GTL	YP-17	22	GEC
YP-27	13	ETCL	YP-21	24	GCL
YP-6	14	GE	YP-5	30	L
YP-8	14	GC			

Discussão:

As oito melhores formulações de terpeno Y para controle dessas bactérias contém cada uma timol. A maioria das combinações que contém L-carvona é muito fraca no

5 controle dessas bactérias.

Resumo dos Resultados dos Exemplos 23 a 26

Determinadas combinações de terpenos encapsulados mostraram eficácia específica contra determinados tipos de agentes patogênicos de plantas. Essas combinações foram

10 observadas como sendo:

1. Para todos os organismos, as composições mais eficazes são 7 (Geraniol e Timol), com 10 (Eugenol e Timol) e 13 (Timol e citral) uma segunda próxima.

2. 7 (Geraniol e Timol) é a mais eficaz para

15 controle dos fungos/oomicetos.

3. 13 (Timol e citral) é a mais eficaz para bactérias.

4. Combinação 10 (Eugenol e Timol) é altamente eficaz contra ambos fungos e bactérias.

5. No próximo grupo de eficácia estão 3 (Timol), 19 (Geraniol, Timol e citral) e 22 (Eugenol, Timol e Citral).

6. O quarto grupo na classificação consiste em 16 (Geraniol, Eugenol e Timol) e 26 (Geraniol, Eugenol, Timol e Citral).

10 7. Especificamente para o míldio felpudo, 4 (C) é altamente eficaz, porém não está no topo da classificação para mais nada.

Esses resultados indicam que quatro terpenos, o citral, eugenol, geraniol e timol sozinhos ou em
15 combinação, especialmente quando encapsulados nas partículas de glicano de levedura exibem forte atividade antibacteriana e antifungo. Na maioria dos casos a presença de timol é significativa.

20 As tabelas 33 a 35 resumem as classificações do desempenho de várias formulações.

Tabela 33 - Resumo dos Fungos/Oomiceto

Número	Conteúdo	B.c.	Pulveru	Felpudo	Compósi	Classificaç
o			lento		to	ão
7	GT	1	1	2	4	1
3	T	2	2	2	6	3
10	ET	2	1	2	5	2
16	GET	2	2	2	6	3
19	GTC	2	2	2	6	3
26	G ETC	2	2	2	6	3
13	TC	2	2	2	6	3

22	ETC	2	1	2	5	2
1	G	2	2	3	7	4
2	E	3	2	3	8	4
6	GE	3	3	3	9	4
17	GEC	3	4	2	8	4
11	EC	3	3	2	8	4
4	C	3	3	1	7	4
8	GC	3	2	2	7	4

* Com base nos dados letais de 72 horas

Tabela 34 - Resumo Bacteriano

Número	Conteúdo	E.a. Letal	Ps.p. letal	X.cp. letal	Soma	Classi ficação
7	GT	1	1	2	4	2
3	T	1	1	3	5	3
10	ET	1	1	2	4	2
16	GET	1	2	3	6	4
19	GTC	2	1	2	5	3
26	G ETC	2	1	3	6	4
13	TC	1	1	1	3	1
22	ETC	2	2	2	6	4
1	G	2	2	3	7	5
2	E	2	2	1	5	3
6	GE	2	2	3	7	5
17	GEC	3	2	3	8	6
11	EC	1	2	2	5	3
4	C	3	2	2	7	5
8	GC	2	2	2	6	4

Tabela 35 - Classificação de Combinação de Fungos e Bactérias

Número	Conteúdo	Classificação Fungo/Oomicete	Classificação bacteriana	Classificação do composto
7	GT	1	2	3
3	T	3	3	6
10	ET	2	2	4
16	GET	3	4	7
19	GTC	3	3	6
26	G ETC	3	4	7
13	TC	3	1	4
22	ETC	2	4	6
1	G	4	5	9
2	E	4	3	7
6	GE	4	5	9
17	GEC	4	6	10
11	EC	4	3	7
4	C	4	5	9
8	GC	4	4	8

Exemplo 27 - Eficácia das Composições Encapsuladas Contra Ácaros

Ácaros aranha de duas manchas, que se alimentam de uma variedade de plantas incluindo tomates. A finalidade do presente estudo foi de conduzir, preliminarmente, experimentos na planta em uma estufa comercial para determinar a eficácia de duas misturas de terpeno YP contra ácaros aranha de duas manchas (*TSSM*, *Tetranychus urticae*) e doenças foliares (Botrite) do tomate. Foram utilizadas as populações ocorrendo naturalmente de ácaros aranha de duas manchas.

Foram empregados YP-4 (citral) e YP-22 (timol, eugenol, citral) (formulações com terpeno a 16%).

Em 28 de março, uma fileira dupla de 68 tomateiros (*Lycopersicon esculentum* var. Trust) foram plantados no
5 estágio de 6 folhas em plástico preto na palha cobrindo o solo nativo; o experimento foi realizado empregando 'Trust' como uma variedade de tomate, essa variedade é mais suscetível ao TSSM que outras variedades, tais como 'Boa'. O espaçamento das plantas foi de 30,5 cm em cada fileira. O
10 cultivador cooperou colocando treliça e aprumando as plantas verticalmente em um ponto de crescimento simples. Blocos de duas plantas por tratamento foram sinalizados e aleatorizados na fileira dupla com 4 replicações. Duas plantas sem tratamento separaram todos os blocos. As
15 formulações de terpeno YP-4 e YP-22 foram aplicadas a uma razão de 4 mL/L para umectar as folhas nos dias que se seguem: 11 de maio (observação: todas as datas nesse exemplo são do ano de 2005), 2 e 15 de junho e 1º e 18 de julho. Os tratamentos de controle receberam água até
20 umectar a folha nas mesmas datas.

Dados de rendimento (número e peso dos frutos), incidência de doença e porcentagem de lesão foliar por TSSM foram registrados a cada 1-2 semanas começando no dia 27 de maio até a conclusão do experimento em 29a de julho.

25 O número de ácaros por centímetro quadrado foi também medido em 25 de julho. Amostras de folhas foram retiradas de cada planta cerca de um metro e meio do solo (baixa) e cerca de dois metros e meio do solo (alta). As folhas foram colocadas em sacos de papel úmido para evitar
30 que secassem. O lado inferior de cada folha foi examinado

microscopicamente e as contagens foram feitas. O número total de ácaros vivos (em movimento e imóvel) foi determinado. Os ácaros na fase imóvel adotam uma pose característica que é facilmente distinguida dos ácaros mortos. Nenhuma distinção foi feita entre fêmeas e machos ou entre adultos e jovens.

Esse experimento, foi complicado em alguns aspectos por dois fatores. Primeiro, na maior parte da produção da estufa de tomates, as folhas velhas são removidas conforme a planta cresce. Isso reduz as populações de ácaros, uma vez que uma quantidade substancial deles é removida juntamente com as folhas velhas. Essas folhas mais velhas foram intencionalmente deixadas na planta como uma medida para aumentar a gravidade do teste.

Em segundo, uma planta no experimento, que era uma das plantas tratadas com YP-22 na quarta replicação, foi infectada com um vírus que causou grave deformação na planta. Ela também apresentou o resultado surpreendente de ser muito atraente aos ácaros e levou à replicação dos ácaros. Isso levou a uma grande explosão da população de ácaros que circundou essa planta. A planta foi removida do experimento em 25 de junho, porém o nível muito alto de ácaros derivados dessa planta infectada com o vírus se difundiu para as áreas adjacentes com o tempo e desviou os resultados.

Essa população de ácaros muito alta não poderia ter sido controlada por qualquer produto. Populações de ácaros, mesmo se afastadas retornam muito rapidamente. Por essa razão, os dados reportados aqui mostram os resultados com o passar do tempo em uma base passo a passo.

Doença Prematura por Fungo

Prematuramente nesses experimentos, parece ter havido um baixo nível de doenças por fungos, provavelmente *Botrytis cinerea*. Essa doença foi classificada até a lesão por ácaros se tornar tão intensa a ponto de nenhuma classificação adicional ser possível. Os resultados são mostrados a seguir na figura 25.

Classificações das Lesões por Ácaros

Em razão das questões de vírus na planta, essa discussão focará os resultados por replicações individuais, com um resumo a seguir. Os resultados da avaliação da lesão por ácaro são mostrados nas figuras 26a-d. A replicação 1 (figura 26a) fornece resultados muito além dos esperados, com YP-22 reduzindo substancialmente as classificações de lesão por ácaro aranha de duas manchas (TSSM) em todo o curso do experimento. Os tratamentos começaram em 11 de maio, assim as diferenças nas primeiras classificações de TSSM em 15 de junho são razoáveis. A replicação 2 (figura 26b) seguiu um curso de tempo semelhante, exceto pelo fato de que a lesão por TSSM no início do experimento foi muito baixa. A replicação 4 (figura 26d) será discutida a seguir; seus resultados afetam a replicação 3 (figura 26c). Até 23 de junho, as classificações para TSSM foram consistentes com as outras replicações, porém aumentaram tremendamente em 1º de julho e foi a maior com YP-22. Isso ocorreu, sem dúvida, em razão da planta infectada com vírus ser uma tratada com YP-22. A infecção por vírus aumentou dramaticamente as populações de ácaro, tanto porque ela era muito atraente ou porque permitiu alavancar a proliferação dos ácaros ou ambos. Em qualquer classificação, as

populações de ácaros se tornaram muito altas. A população de ácaros dispersou rapidamente da planta infectada com o vírus e tratada com YP-22 para as outras plantas nessa replicação, e assim, em 11 de junho, todas as classificações de TSMm eram muito altas na replicação 4. Para evitar infestação do restante da estufa e do experimento, as plantas na replicação 4 foram descartadas após isso. Na replicação 3, em 1º de julho, as classificações do TSSM começaram a subir e após isso, começaram a subir rapidamente. Assim, não existe dúvida de que a replicação 3 recebeu pressão crescentemente alta dos ácaros que começaram com a planta simples na replicação 4. É improvável que qualquer tratamento pudesse conter a explosão do crescimento populacional que surgir com a planta infectada com vírus.

A figura 27 é uma fotografia mostrando uma comparação entre uma planta tratada com YP-4 e um controle. Pode ser visto claramente que o tratamento com a composição YP-4 contendo terpeno encapsulado resulta em uma planta mais saudável e produtiva.

Número de Ácaros

Os ácaros foram enumerados microscopicamente dos lados inferiores das folhas retiradas de uma planta a cerca de um metro e meio do solo (baixa) e cerca de dois metros e meio do solo (alta). Os resultados são mostrados na Tabela 36.

Tabela 36 - Comparação da Infestação por Ácaro Entre Plantas Tratadas e de Controle

Tratamento	Localização da planta	Média de ácaros/m ²	Desvio Padrão	Número máximo	Número mínimo
------------	-----------------------	--------------------------------	---------------	---------------	---------------

Controle	Baixa	10,86	11,06	27,55	0,00
YP-4	Baixa	3,38	1,28	4,68	1,06
YP-22	Baixa	0,36	0,34	0,84	0,04

Esses dados indicam o bom controle do ácaro. Existe uma grande variação nos números de ácaros/folha nas plantas de controle, conforme seria de se esperar para essa praga. Contudo, os números máximos com ambos tratamentos, especialmente o tratamento com YP-22 são substancialmente mais baixos em relação ao controle.

Nesse estudo, os ácaros foram controlados especialmente por YP-22. Contudo, onde ocorreram altas pressões de ácaros, o YP-22 foi insuficiente para prover controle adequado. É provável que nenhum acaricida fornecesse controle bom em razão das populações de ácaro muito altas em parte desse estudo. Também é digno de nota que nós aplicamos os materiais a cada duas semanas e uma vez que os ácaros possuem boa capacidade de renovação, os materiais de teste YP apresentaram atividade residual; isso foi quase que certamente provido como o resultado do encapsulamento.

Os resultados são extremamente encorajadores, uma vez que nas formulações a serem usadas, a razão de aplicação e a frequência de aplicação não foram otimizadas. Sem dúvida, seria possível aperfeiçoar a eficácia por otimização das misturas de terpeno, razões e frequências de aplicação. Tal otimização seria matéria de tentativa e erro a ser obtida.

Adicionalmente, existem pelo menos dois tipos de adjuvantes que podem ser usados para aumentar a eficácia. Silwet é um agente tensoativo organossilicone que é

adicionado aos pesticidas como uma mistura de tanque. Os
bons dados indicam que essencialmente aumenta a atividade
dos acaricidas (referência disponível por solicitação). Ele
pode ser usado com todas plantas e está prontamente
5 disponível. Nós temos dados indicando também que materiais
semelhantes melhoram a eficácia do controle da doença
causada por fungos com agentes de biocontrole.
Alternativamente, o Stirrup é um produto de feromônio que
atrai os ácaros para os depósitos de pesticidas e melhora a
10 absorção do material.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de um terpeno selecionado do grupo consistindo em timol, eugenol, geraniol e citral.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente terpeno compreende uma combinação de timol e um ou mais dentre eugenol, geraniol e citral.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que compreende um componente terpeno consistindo em quatro ou menos terpenos.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizada pelo fato de que compreende um componente terpeno consistindo em um dos grupos de combinações de terpenos que se seguem:

- timol e geraniol;
- timol e citral;
- timol e eugenol;
- timol, geraniol e citral;
- timol, eugenol e citral;
- timol, geraniol e eugenol; e
- timol, geraniol, eugenol e citral.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que o componente terpeno consiste exclusivamente nos terpenos especificados.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizada pelo fato de que não contém L-carvona.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que o componente terpeno se encontra na suspensão ou solução em um solvente.

5 8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o solvente é água.

 9. Composição, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que o componente terpeno se encontra na solução em água na
10 ausência de um agente tensoativo.

 10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que o componente terpeno está associado a um agente tensoativo.

15 11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que compreende a partícula oca de glicano ou uma partícula de parede celular encapsulando o componente terpeno.

20 12. Composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular são paredes celulares de fungo.

 13. Composição, de acordo com a reivindicação 12,
25 caracterizada pelo fato de que as partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular são paredes de célula de levedura.

 14. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que as paredes de célula de
30 levedura são um extrato seco de aspersão de *S. cerevisiae*.

15. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a partícula oca de glicano ou partículas de parede celular possuem um leve teor de lipídeo.

5 16. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que o componente terpeno encapsulado está associado a um agente tensoativo.

10 17. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizada pelo fato de que compreende 1 a 99% em volume de terpenos, 0 a 99% em volume de agente tensoativo e 1 a 99% partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular.

15 18. Composição, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que compreende cerca de 10% a cerca de 67% em volume de terpenos, cerca de 0,1 a cerca de 10% em volume de agente tensoativo e cerca de 10 a cerca de 90% partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular.

20 19. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizada pelo fato de que compreende cerca de 500 a cerca de 10.000 ppm de partículas ocas de glicano ou partículas de parede celular, onde as partículas contêm
25 cerca de 1 a cerca de 67% de componente terpeno.

 20. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizada pelo fato de que compreende entre cerca de 1 ppm e cerca de 350 ppt (350.000
30 ppm) do componente terpeno.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a composição compreende de 100 a 2.000 ppm do componente terpeno.

22. Composição, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, caracterizada pelo fato de que os terpenos são pelo menos terpenos de classificação alimentícia.

23. Composição, de acordo com qualquer uma das
10 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizada pelo fato de que compreende um composto ativo adicional.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que o composto ativo adicional é
15 um agente antimicrobiano, uma enzima, um agente antifungo, um agente antibacteriano, um agente inseticida, um agente antimicrobiano ou um anestésico.

25. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,
20 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24, caracterizada pelo fato de que compreende um antioxidante.

26. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25, caracterizada pelo fato de que está na
25 forma de um pó seco.

27. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25, caracterizada pelo fato de que está na forma de um líquido.

30 28. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25, caracterizada pelo fato de que está na forma de uma microesfera ou comprimido.

29. Composição, de acordo com a reivindicação 28,
5 caracterizada pelo fato de que a microesfera ou comprimido contém um agente de dispersão.

30. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
10 ou 29, caracterizada pelo fato de que está em combinação com um veículo ou excipiente agrícola, alimentícia ou farmaceuticamente aceitável.

31. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,
15 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30, caracterizada pelo fato de que está em combinação com o agente quelante ou gás inerte.

32. Método para preparação de uma partícula oca de glicano ou partícula de parede celular encapsulando um
20 componente terpeno, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) provisão de um componente terpeno, o componente terpeno compreendendo uma mistura de mais de um terpeno selecionado do grupo consistindo em timol, eugenol,
25 geraniol e citral;

b) provisão de uma partícula oca de glicano ou partícula de parede celular;

c) incubação do componente terpeno com a partícula de glicano ou partícula de parede celular sob condições
30 apropriadas para encapsulamento do terpeno; e

d) recuperação da partícula oca de glicano ou partícula de parede celular encapsulando o componente terpeno.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32,
5 caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de secagem da partícula encapsulando o componente terpeno.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, caracterizado pelo fato de que na etapa a) o componente terpeno é provido como uma suspensão em um solvente aquoso.

10 35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o componente terpeno se encontra em conjunto com o agente tensoativo.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32, 33, 34 ou 35, caracterizado pelo fato de
15 que na etapa b) a partícula oca de glicano ou partícula de parede celular é provido como uma suspensão em água ou outro líquido apropriado.

37. Método para exterminar um microorganismo, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende a
20 etapa de:

a) contato do dito microorganismo com uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31.

38. Método para tratamento ou prevenção de infecção
25 de uma planta, o método caracterizado por compreender a etapa de:

a) administração em uma dose terapeuticamente eficaz de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31 a uma planta ou ao solo próximo à
30 planta.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que é um método para tratamento ou prevenção de uma infecção bacteriana na planta.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a infecção é causada por um ou mais dentre *Erwinia amylovora* (crestamento da maçã), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (crestamento bacteriano aureolado do feijão) e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (cresatmento comum do feijão).

41. Método, de acordo com a reivindicação 40 ou 41, caracterizado pelo fato de que os componentes terpenos contêm uma das combinações de terpeno que se seguem:

- timol e citral;
- timol e geraniol; e
- timol e eugenol.

42. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que é um método para tratamento ou prevenção de infecção por fungo/oomiceto na planta.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42 caracterizado pelo fato de que a infecção é causada por um ou mais dentre míldio felpudo (*Plasmopara viticola*), míldio pulverulento (*Uncinula necator*) e apodrecimento da raiz por botrite (*Botrytis cinerea*).

44. Método, de acordo com a reivindicação 42 ou 43, caracterizada pelo fato de que os componentes terpenos contêm uma das seguintes combinações de terpenos:

- timol e geraniol;
- timol e citral;
- timol e eugenol; ou
- timol, eugenol e citral;

- timol, eugenol e geraniol; e

- timol, geraniol e citral.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38, 39, 40, 41, 42, 43 ou 44, caracterizado
5 pelo fato de que a composição é aplicada 21 dias ou menos antes da colheita.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que a prevenção das infecções
10 nas plantas é obtida por tratamento das plantas com as composições da presente invenção, de modo regular, como uma medida profilática.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que a composição é aplicada por
15 aspersão.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que a composição é aplicada via
20 irrigação ou a uma dose de remédio para o solo.

49. Método para prevenir ou tratar um paciente, o método caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

a) administração ao dito paciente de uma dose
25 terapeuticamente eficaz de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que a infecção é causada por um
30

dentre *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*,
Mycoplasma iowae, *Penicillium sp.*, e *Mycoplasma pneumoniae*.

51. Método, de acordo com a reivindicações 49 ou
50, caracterizado pelo fato de que a composição é
5 administrada oral, vaginal, retalmente, por inalação ou por
vias parenterais.

52. Método, de acordo com qualquer uma das
reivindicações 49, 50 ou 51, caracterizado pelo fato de que
a composição é aplicada topicamente.

10 53. Método, de acordo com qualquer uma das
reivindicações 49, 50 ou 51, caracterizado pelo fato de que
o indivíduo é um mamífero.

54. Método, de acordo com a reivindicação 52,
caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um primata.

15 55. Método, de acordo com a reivindicação 53,
caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

56. Método para exterminar insetos ou araquinídeos,
o dito método caracterizado pelo fato de que compreende a
etapa de:

20 a) administração ao dito inseto ou araquinídeo em
uma dose eficaz de uma composição de acordo com qualquer
uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,
12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,
27, 28, 29, 30 ou 31.

25 57. Método, de acordo com a reivindicação 55,
caracterizado pelo fato de que o inseto é selecionado do
grupo consistindo em formiga, cupim, piolho, pulgão, pulga,
gafanhoto e tripse.

58. Método, de acordo com a reivindicação 55,
30 caracterizado pelo fato de que o araquinídeo é selecionado

do grupo consistindo em ácaros, aranhas e carrapatos.

59. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizada pelo fato de que é para uso na prevenção ou tratamento de uma infecção em um paciente ou uma planta.

60. Uso de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizada pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de infecção causada por um microorganismo.

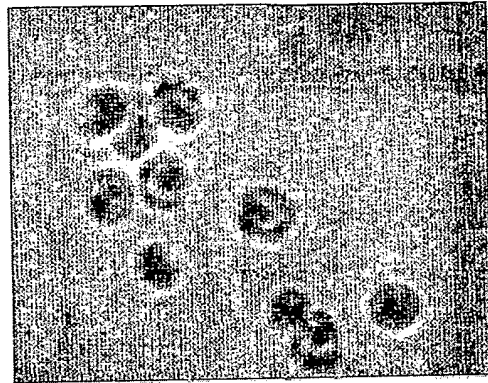


Fig. 1

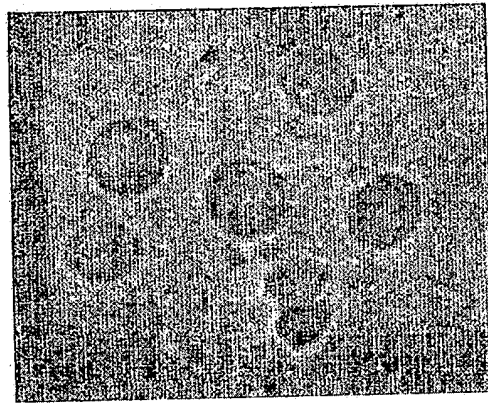


Fig. 2

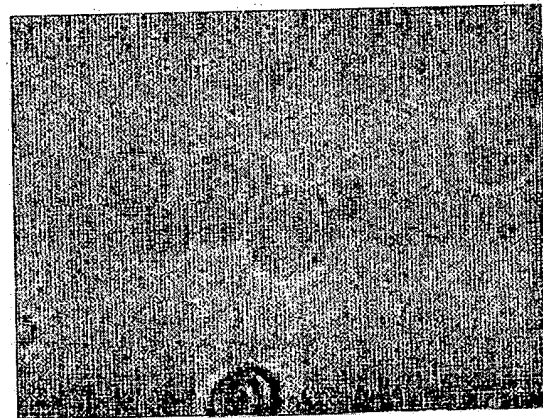


Fig. 3

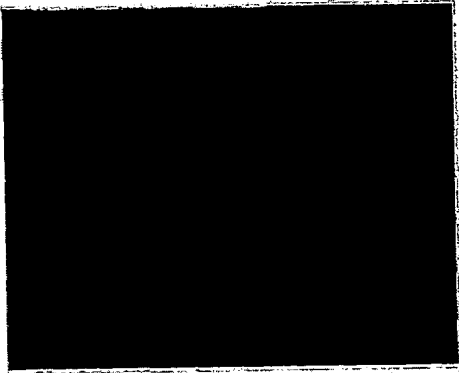


Fig. 4

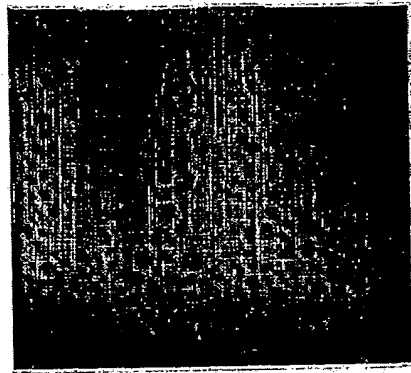


Fig. 5

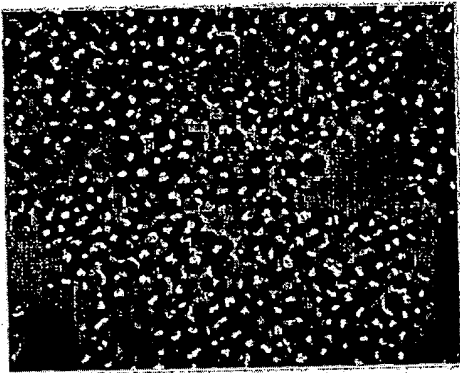


Fig. 6

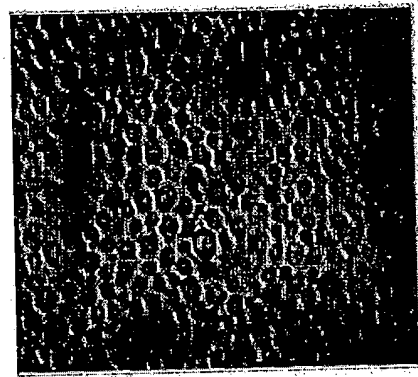


Fig. 7

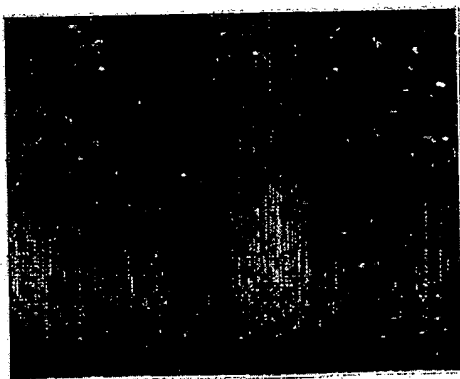


Fig. 8

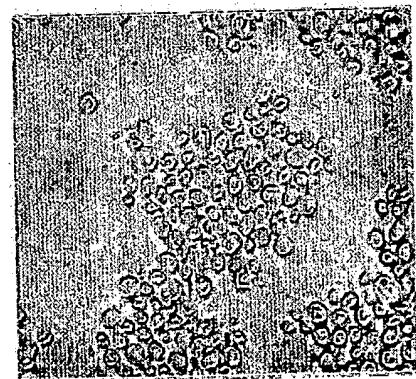


Fig. 9

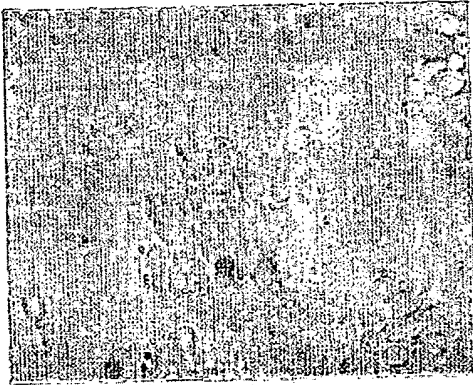


Fig. 10

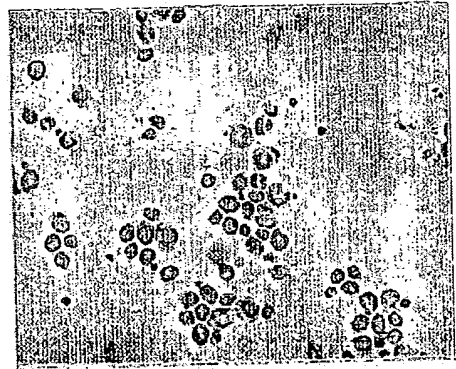


Fig. 11

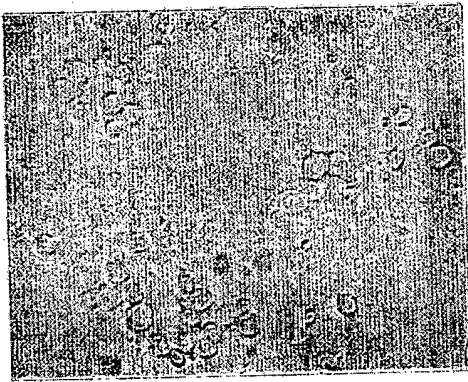


Fig. 12

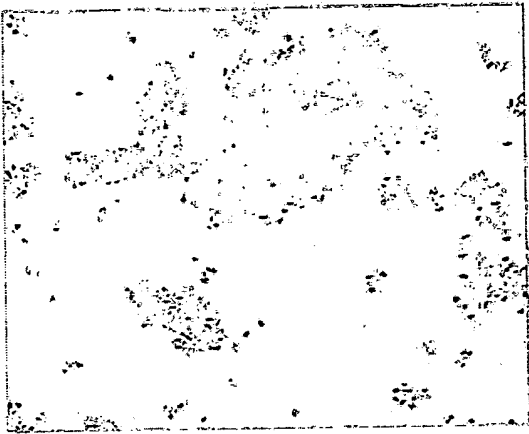


Fig. 13

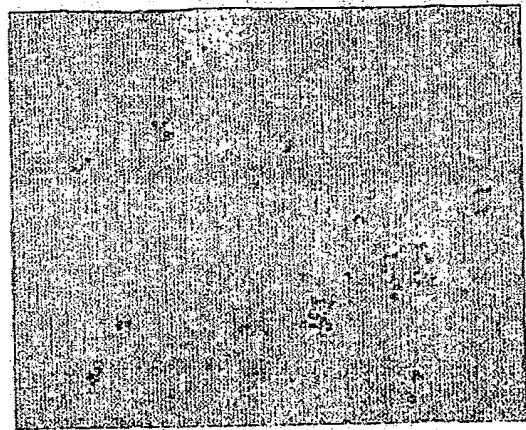


Fig. 14

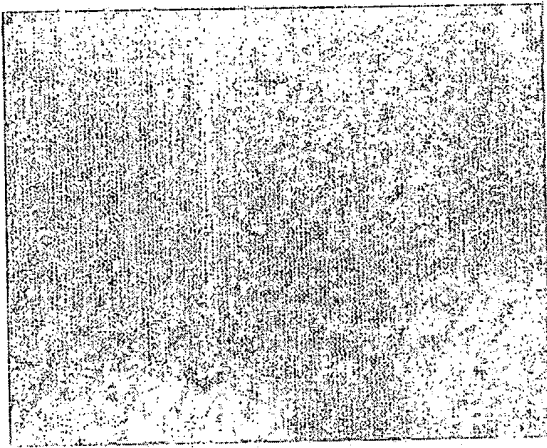


Fig. 15

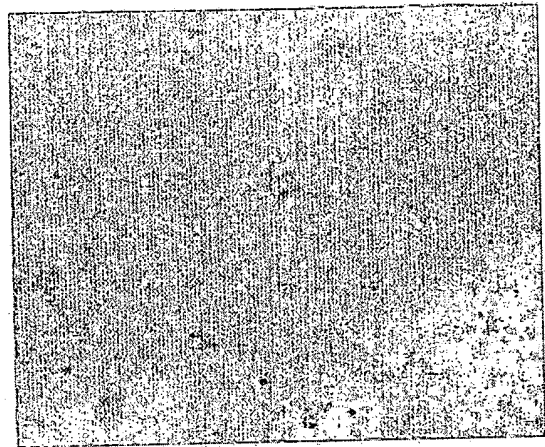


Fig. 16

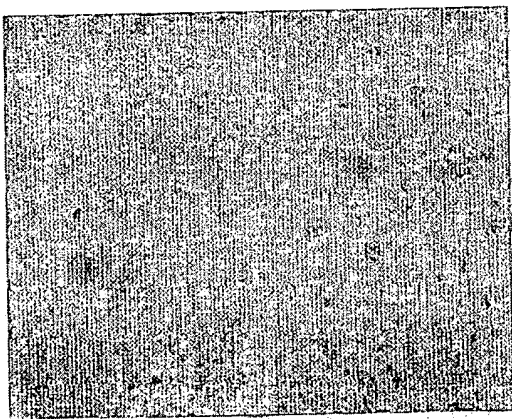


Fig. 17

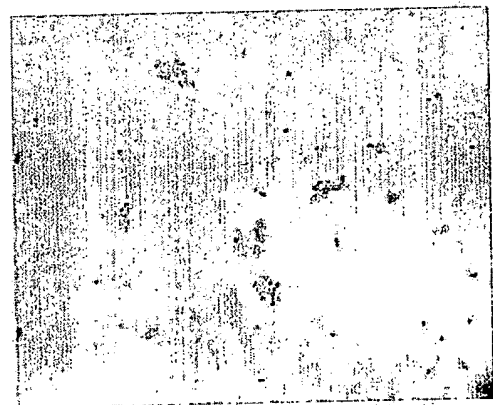


Fig. 18

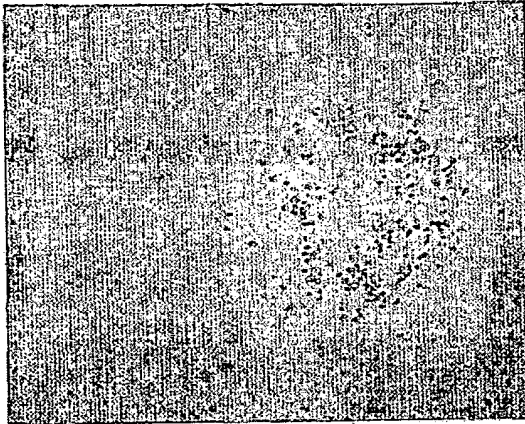


Fig 19

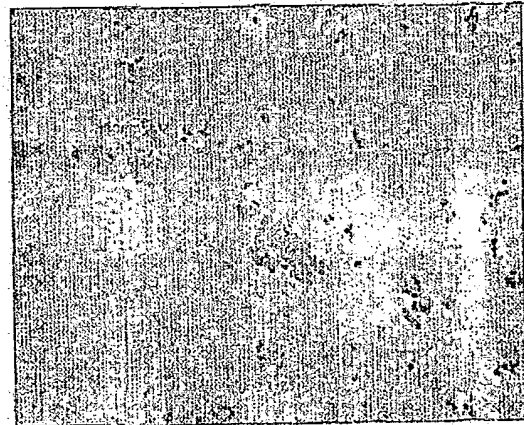


Fig 20

Sitio 18

Sitio 20

Tratamento convencional		Tratamento convencional
formulação líquida de YGP-GET 1 g/L		formulação em pó de YGP-GET 0.5 g/L
Nenhum tratamento		Nenhum tratamento
formulação líquida de YGP-GET 4 g/L		formulação em pó de YGP-GET 2 g/L

Fig 21

Site 18

Tratamento convencional
Nenhum tratamento
formulação líquida de YGP-GET 2 mL/L

Site 20

Tratamento convencional
formulação em pó de YGP-GET 2 mL/L
Nenhum tratamento

Fig 22

formulação líquida de YGP-GET 4 mL/L
Nenhum tratamento

Fig 23

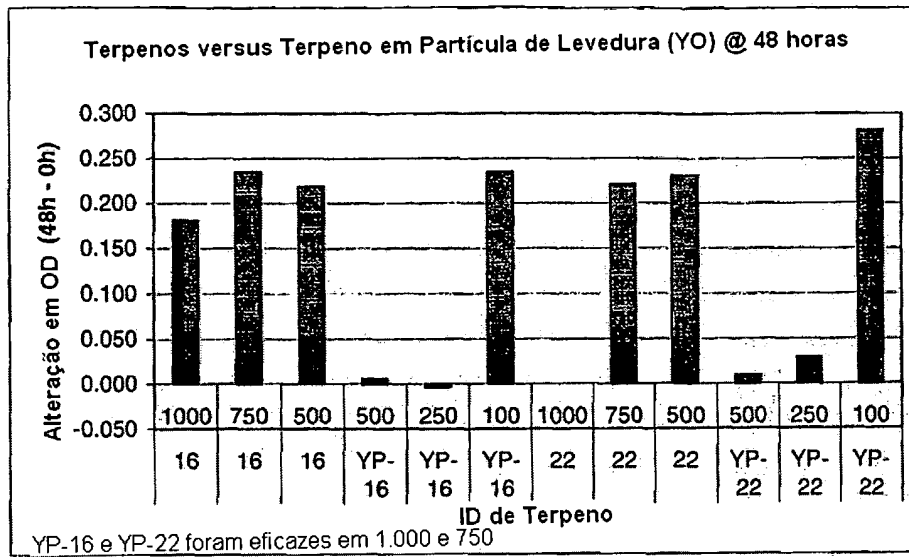


Fig. 24

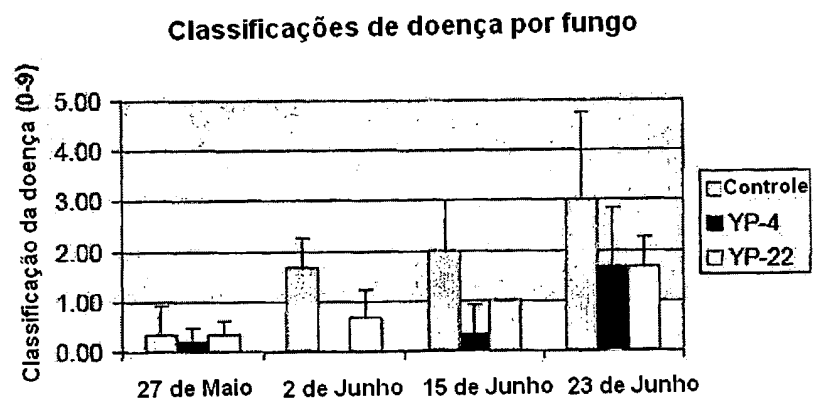


Fig. 25

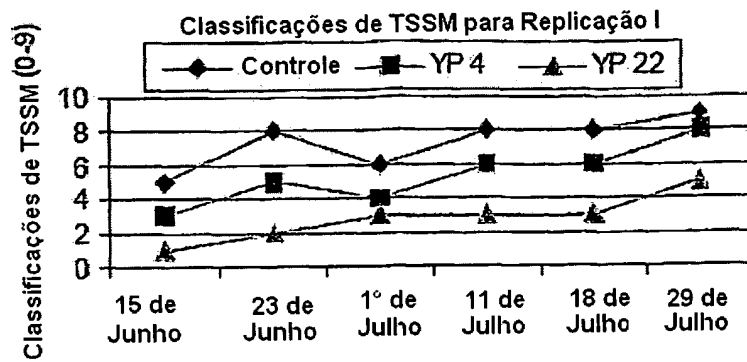


Fig. 26a

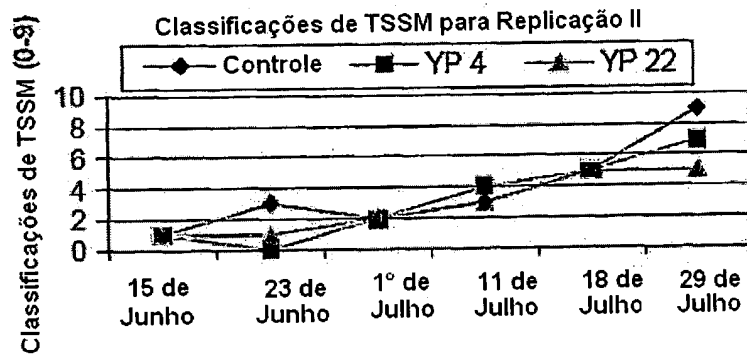


Fig. 26b

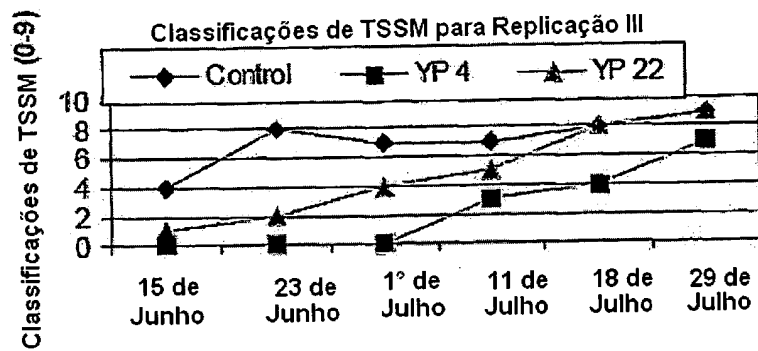
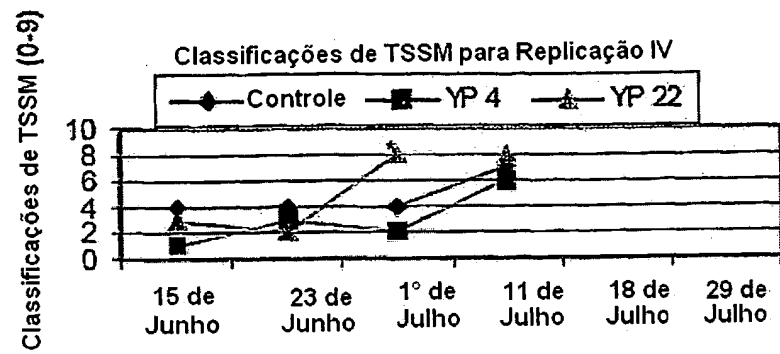


Fig. 26c



** Plantas na replicação IV foram removidas.

Fig. 26d

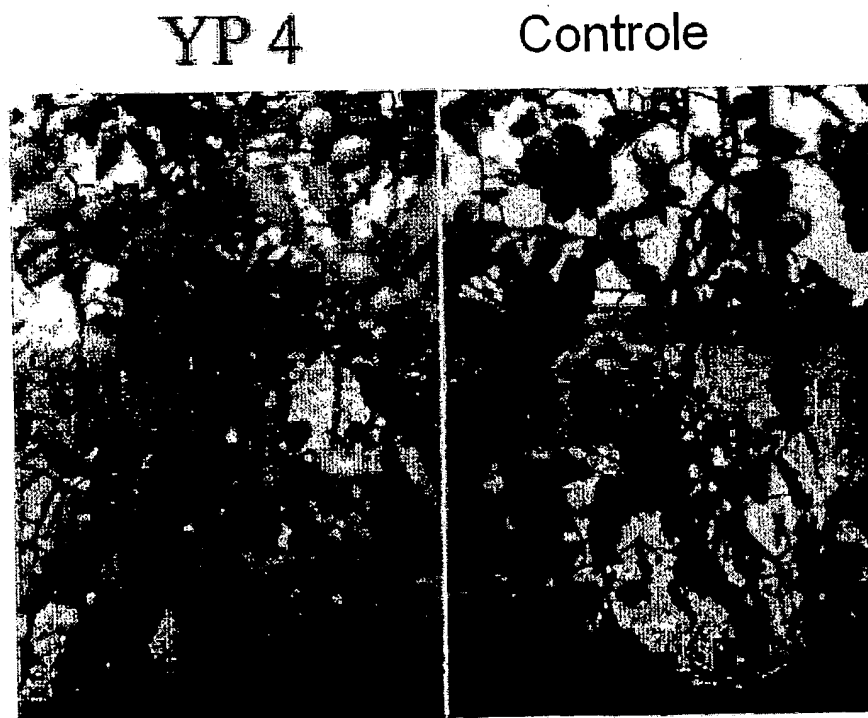


Fig. 27

P-0619383-8

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS COMPREENDENDO TERPENOS OU MISTURAS DE
TERPENOS SELECIONADAS DE TIMOL, EUGENOL, GERANIOL, CITRAL E
L-CARVONA

A presente invenção se refere às composições
5 compreendendo terpenos que são especificamente apropriados
para tratamento de infecções em plantas, aos métodos para
fabricação de tais composições e aos métodos de emprego das
mesmas. A presente invenção também se refere às composições
compreendendo terpenos e partículas ocas de glicano ou
10 partículas de parede celular e aos métodos para fabricação
de tais composições; tais composições aumentam a
estabilidade e atividade do terpeno e fornecem um veículo
apropriado para os terpenos. A invenção também se refere
aos métodos de uso de tais composições nos campos médico,
15 veterinário e agrícola. Especificamente, os terpenos
revelados são timol, eugenol, geraniol, citral e L-carvona.