

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

(21) **PI0619219-0 A2**

(22) Data de Depósito: 03/08/2006
(43) Data da Publicação: 20/09/2011
(RPI 2124)



(51) Int.Cl.:

A01N 31/08
A01N 35/02
A01N 31/16
A01N 31/02
A01N 35/06
A01N 49/00
A01N 25/28
A01P 3/00
A01P 7/02
A01P 5/00

(54) Título: MÉTODO PARA MATAR UM INSETO OU ARACNÍDEO, MÉTODO PARA TRATAR OU IMPEDIR A INFESTAÇÃO DE UMA PLANTA E USO DE UMA COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 30/11/2005 US 60/741.129

(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 GB2006002878 de
03/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/063267 de
07/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA MATAR UM INSETO OU ARACNÍDEO, MÉTODO PARA TRATAR OU IMPEDIR A INFESTAÇÃO DE UMA PLANTA E USO DE UMA COMPOSIÇÃO. A presente invenção refere-se a composições que compreendem terpenos e partículas de glucana ocas e partículas de parede celular e métodos para preparar tais composições. As composições aumentam a estabilidade e atividade de terpeno e propiciam um carreador adequado para os terpenos. A invenção também se refere a métodos para utilizar tais composições nos campos médico, veterinário e agrícola.

MÉTODO PARA MATAR UM INSETO OU ARACNÍDEO, MÉTODO PARA
TRATAR OU IMPEDIR A INFESTAÇÃO DE UMA PLANTA E USO DE UMA
COMPOSIÇÃO

A presente invenção refere-se a composições que
5 compreendem terpenos e partículas de glucana ocas ou
partículas de parede de célula e métodos para preparar tais
composições. As composições aumentam a estabilidade e
atividade de terpeno e propiciam um carreador adequado para
os terpenos. A invenção também se refere a métodos para
10 utilizar tais composições nos campos médico, veterinário e
agrícola.

Terpenos são compostos químicos que são bem
difundidos na natureza, principalmente em plantas como
constituíntes de óleos essenciais. Seu bloco de construção
15 é o isopreno de hidrocarbono $(C_5H_8)_n$. Exemplos de terpenos
incluem citral, pineno, nerol, b-ionone, geraniol,
carvacrol, eugenol, carvona, terpeniol, anetole, cânfora,
mentol, limoneno, nerolidol, famosol, fitol, caroteno
(vitamina A_1), esqualeno, timol, tocotrienol, álcool
20 perilílico, borneol, mirceno, simeno, careno, terpenono, e
linalol.

Terpenos são classificados como Normalmente
Reconhecidos como Seguros (GRAS) e têm sido utilizados por
muitos anos nas indústrias de sabor e aroma. O LD_{50} em
25 ratos de citral é de aproximadamente 5 g/kg, que é uma
indicação adicional da segurança relativa destes compostos.
Além disso, terpenos possuem um tempo de vida relativamente
curto de aproximadamente 28 dias uma vez expostos a
oxigênio (por exemplo, ar). Terpenos se decompõem em CO_2 e
30 água. Esta decomposição ou quebra de terpenos demonstra a

segurança e integração ambiental das composições e métodos da invenção.

Verificou-se que terpenos inibem o crescimento de células cancerígenas, diminuem o tamanho de tumor, diminuem
5 níveis de colesterol, e possuem um efeito biocida sobre microorganismos *in vitro*. Owawunmi, (Letters in Applied Microbiology, 1993, 9(3): 105-108), mostrou que os meios de crescimento com mais do que 0,01% de citral reduziu a concentração de *E. coli*, e que em 0,08% não houve efeito
10 bactericida. A Patente U.S. No. 5.673.468 descreve uma formulação de terpeno, com base em óleo de pinho, utilizada como um desinfetante ou limpador anti-séptico. A Patente U.S. No. 5.849.956 mostra que um terpeno encontrado em arroz possui atividade antifúngica. A Patente U.S. No. 5.939.050
15 descreve um produto antimicrobiano para higiene oral com uma combinação de 2 ou 3 terpenos que mostraram um efeito sinérgico. Diversas Patentes U.S. (Patente U.S. Nos. 5.547.677, 5.549.901, 5.618.840, 5.629.021, 5.662.957, 5.700.679, 5.730.989) mostram que certos tipos de emulsões
20 óleo-em-água possuem propriedades antimicrobianas, adjuvantes e de administração.

Verificou-se que terpenos são agentes antitumor alimentares não-tóxicos e eficazes, que atuam através de uma variedade de mecanismos de ação (Crowell e outros,
25 Crit. Rev. Oncog., 1994, 5(1): 1-22; Crowell e outros, Adv. Exp. Med. Biol., 1996, 401: 131-136). Os terpenos geraniol, tocotrienol, álcool perilílico, b-ionone, e d-limonene, suprimem a atividade redutora de HMG-CoA hepática, uma etapa limitante de taxa na síntese de colesterol, e
30 modestamente diminuem os níveis de colesterol em animais

(Elson e outros, J. Nutr., 1994, 124: 607-614). D-limonene e geraniol reduziram 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
 5 outros. Anticancer Drugs, 1996, 7(4): 422-429) e suprimiram o crescimento de tumores transplantados (Yu e outros, J. Agri. Food Chem., 1995, 43: 2144-2147).

Verificou-se também que terpenos inibem o crescimento *in vitro* de bactérias e fungos (Chaumont e outros), Ann.
 10 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). Verificou-se que geraniol
 15 inibe o crescimento de variedades de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* ao aumentar a taxa de vazamento de potássio e interromper a fluidez de membrana (Brad e outros, Lipids, 1998, 23(6): 534-538). B-ionone possui atividade antifúngica que foi determinada pela inibição de
 20 germinação de esporo, e inibição de crescimento em agar (Mikhlin e outros, A. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 1983, 19: 795-803; Salt e outros, Adam. Physiol. Molec. Plant Path, 1986, 28: 287-297). Teprenone (geranilgeranilacetona) possui um efeito bactericida sobre *H. pylori* (Ishii, Int.
 25 J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993, 280 (1-2): 239-243). Rosanol, um produto comercial com 1% de óleo de rosas, tem provado inibir o crescimento de diversas bactérias (*Pseudomonas*, *Estafilococos*, *E. coli*, e *H. pylori*). Geraniol é o componente ativo (75%) de óleo de
 30 rosas. Óleo de rosas e geraniol em uma concentração de 2

mg/L inibiram o crescimento de *H. pylori* *in vitro*. Alguns extratos provenientes de remédios herbicidas mostraram possuir um efeito inibidor em *H. pylori*, os mais eficazes sendo decursinol angelate, decursin, magnolol, berberine, 5 ácido cinâmico, decursinol, e ácido gálico (Bae e outros, Biol. Pharm. Bull., 1998, 21 (9) 990-992). Extratos provenientes de caju, ácido anacárdico, e (E)-2-hexenal mostraram efeito bactericida contra *H. pylori*.

Diterpenos, isto é, triclorabdol A (proveniente de *R. Trichocarpa*), 10 mostraram um efeito bacteriano muito forte contra *H. pylori* (Kadota e outros, Zentralbl. Bacteriol, 1997, 287(1): 63-67).

As soluções de 11 terpenos diferentes foram eficazes em inibir o crescimento de bactérias patogênicas em testes 15 *in vitro*; níveis variando entre 100 ppm e 1.000 ppm foram eficazes. Os terpenos foram diluídos em água com 1% de polissorbato 20 (Kim e outros, J. Agric. Food Chem., 1995, 43:2839-2845).

Podem existir modos diferentes de ação de terpenos 20 contra microorganismos; os mesmos podem (1) interferir com a camada dupla fosfolipídica da membrana celular, (2) conferir uma variedade de sistemas de enzima (HMG-redutase), e (3) destruir ou desativar material genético. Acredita-se que devido aos modos de ação dos terpenos serem 25 tão básicos, por exemplo, bloqueando o colesterol, que agentes infectantes não seriam capazes de construir uma resistência a terpenos.

Existem, entretanto, diversas desvantagens ao uso de terpenos.

30 Estas incluem:

- Terpenos são líquidos que podem torná-los difíceis de manusear e inadequados para certos fins.

- Terpenos não são miscíveis em água, e normalmente exigem o uso de detergentes, agentes tensoativos ou outros emulsificadores para preparar emulsões aquosas. Uma solução estável pode, entretanto, ser obtida ao misturar os terpenos sob cisalhamento elevado.

- Formulações de terpeno em pó seco normalmente apenas contêm uma percentagem baixa em peso de terpenos.

10 - Terpenos são propensos a oxidação em sistemas de emulsão aquosa, o que torna o armazenamento em longo prazo um problema.

Existem limitações às técnicas atuais de revestimento por pulverização, extrusão, co-acervação, encapsulação molecular, e secagem/esfriamento por pulverização para propiciar sistemas de administração de ingrediente.

15 As paredes celulares de levedura de Baker são derivadas de células de levedura de Baker e são compostas dos bio-polímeros insolúveis β -1,3-glucana, β -1,6-glucana, manana e quitina. Os mesmos normalmente possuem micro-esferas de 2-4 micra em diâmetro com uma parede de revestimento que possui apenas 0,2-0,3 micron de espessura que cerca uma cavidade aberta. Este material possui capacidade considerável de reter líquidos, absorvendo tipicamente 5-25 vezes o seu peso em líquido. O revestimento é poroso o suficiente para que cargas até 150.000 Daltons em tamanho possam passar através do revestimento externo e ser absorvidos na cavidade oca da partícula esférica. As paredes celulares de levedura de Baker possuem diversas propriedades únicas, que incluem

20

25

30

estabilidade de calor (por exemplo, até 121°C),
estabilidade de cisalhamento (por exemplo, pH de 2-12), e
em concentrações elevadas as mesmas não produzam
viscosidade significativa. Além de suas propriedades
5 físicas, esta composição contém fibras alimentares naturais
e saudáveis que administram benefícios de saúde
cardiovascular e de imuno-potencialização.

Paredes celulares de levedura são preparadas a partir
de células de levedura pela extração e purificação da
10 fração particulada insolúvel proveniente de componentes
solúveis da célula de levedura. As paredes celulares
fúngicas podem ser produzidas a partir do subproduto
insolúvel de fabricação de extração de levedura. Além
disso, as células de levedura podem ser tratadas com uma
15 solução de hidróxido aquosa, sem romper as paredes
celulares de levedura, que digere a proteína e a porção
intra-celular da célula, deixando o componente de parede
celular de levedura desprovido de contaminação de proteína
significativa, e possuindo substancialmente a estrutura de
20 parede de célula de glucanas ligados $\beta(1-6)$ e $\beta(1-3)$. Uma
descrição mais detalhada de partículas de glucana globais e
o processo de prepará-las é descrita por Jamas e outros na
Patente U.S. No. 4.810.646 e em Pedidos de Patente Co-
pendentes U.S. Nos. de Série 166.929, 297.752 e 297.982. A
25 Patente U.S. No. 6.242.594, atribuída a Novogen Research
Pty Ltd., descreve um método para preparar partículas de
glucana de levedura por extração de álcali, extração de
ácido e em seguida extração com um solvente orgânico e
finalmente secagem. A Patente U.S. No. 5.401.727, atribuída
30 a AS Biotech-Mackzymal, descreve os métodos para obter

partículas de glucana de levedura e métodos para utilizá-las para promover resistência em animais aquáticos e como um coadjuvante para vacinações. A Patente U.S. No. 5.607.677, atribuída a Alpha-Beta Technology Inc., descreve o uso de partículas de glucana completamente ocas como um invólucro de administração e adjuvante para administração de uma variedade de agentes farmacêuticos. Os ensinamentos das patentes acima mencionadas e aplicações são incorporados aqui mediante referência.

Outros tipos de células de fungos e de levedura possuem paredes celulares que não contêm glucana. As paredes celulares de tais leveduras e fungos podem ser isoladas por técnicas similares às aquelas mencionadas acima para obter partículas de parede celular.

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

Verificamos agora que terpenos podem ser compensados e encapsulados de forma estável dentro de partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular. A encapsulação de terpenos em tais partículas pode ser alcançada por incubação das partículas com o terpeno.

De acordo com a presente invenção, é propiciada uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou uma partícula de parede celular que encapsula um componente

terpênico.

O termo "partícula de glucana oca" conforme utilizado aqui inclui qualquer partícula oca que compreende glucana como um componente estrutural. Sendo assim, 5 especificamente, o termo inclui paredes celulares de levedura (em formas purificada ou crua) ou partículas de glucana completamente ocas. O termo "partícula de parede celular" refere-se a uma partícula que compreende a parede de uma célula (em uma forma purificada ou crua), em que 10 glucana não é um componente estrutural. Partículas adequadas incluem as paredes celulares de células de plantas, de algas, fúngicas, ou bacterianas. As partículas de parede celular normalmente retêm o formato da célula a partir das quais são derivadas, e sendo assim, como uma 15 partícula de glucana oca, propiciam uma cavidade central oca adequada para encapsular o componente terpênico.

Para a presente invenção é necessário que a partícula de glucana oca ou partícula de parede celular seja capaz de encapsular de forma estável o componente terpênico. Em 20 geral isto significa que a partícula de glucana oca ou partícula de parede celular deve ser capaz de manter sua estrutura durante incubação com o componente terpênico (normalmente o componente terpênico está em uma concentração relativamente elevada), e que o componente 25 terpênico deve ser capaz de migrar para dentro da partícula. Partículas de glucana ocas e partículas de parede celular são normalmente formadas a partir de materiais relativamente inertes e são porosas, e sendo assim pode presumir-se que, em geral, partículas de glucana 30 ocas e partículas de parede celular sejam capazes de

encapsular um componente terpênico.

Composições de acordo com a presente invenção são eficazes contra diversos agentes infecciosos que incluem bactérias, viroses, micoplasmas, fungos, artrópodes
5 nematóides e/ou aracnídeos.

As composições de acordo com a presente invenção podem propiciar as vantagens que se seguem:

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

Partículas de glucana ocas especificamente adequadas ou partículas de parede celular são paredes celulares fúngicas, de preferência paredes de células de levedura. Paredes celulares de levedura são preparações de células de
20 levedura que retêm a estrutura tridimensional da célula de levedura a partir da qual as mesmas são derivadas. Sendo assim as mesmas possuem uma estrutura oca que permite que o componente terpênico seja encapsulado dentro das paredes celulares de levedura. As paredes de levedura podem ser
25 adequadamente derivadas de células de levedura de Baker (disponível de Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). Partículas de paredes celulares de levedura com propriedades desejáveis podem ser obtidas de Biorigin (São Paulo, Brasil) sob o nome comercial de Nutricell MOS 55.
30 Estas partículas são um extrato seco em pulverização de S.

cerevisiae.

Partículas alternativas são aquelas conhecidas pelos nomes comerciais SAF-Mannan (SAF Agri, Mineapolis, MN) e Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, WI). Estas são
5 partículas de glucana ocas que estão na corrente de resíduo insolúvel proveniente do processo de fabricação de extração de levedura. Durante a produção de extratos de levedura os componentes solúveis de células de levedura parcialmente autolizadas são removidos e o resíduo insolúvel é um
10 material adequado para carga de terpeno. Estas partículas de glucana ocas compreendem aproximadamente 25-35% de beta 1,3-glucana em peso. Um atributo chave destes materiais é que os mesmos contêm mais do que 10% em lipídio em peso e são muito eficazes em absorver terpenos. Além disso, como
15 um produto de corrente de resíduo os mesmos são uma fonte relativamente barata de partículas de glucana ocas.

Partículas de glucana ocas alternativas que possuem pureza mais elevada são aquelas produzidas por Nutricepts (Nutricepts Inc., Burnsville, MN) e ASA Biotech. Estas
20 partículas foram extraídas a álcali, o qual remove componentes intracelulares adicionais bem como remove a camada de mana-proteína externa da parede celular que produz uma partícula de 50-65% de glucana em peso.

Partículas de glucana ocas de pureza mais elevada são
25 as partículas provenientes de Biopolymer Engineering. Estas partículas são extraídas a ácido, o qual remove componentes de levedura adicionais que produzem um produto de 75-85% de glucana em peso.

Partículas de glucana ocas de pureza muito elevada
30 são Adjuvax™ proveniente de Alpha-beta Technology, Inc.

(Worcester, MA) e glucana micro-particulada proveniente de Novogen (Stamford, CT). Estas partículas são extraídas a solvente orgânico, o qual remove lipídios residuais e deste modo as partículas compreendem mais do que 90% de glucana em peso.

Em algumas modalidades uma partícula de glucana de pureza elevada ou partícula de parede celular pode ser exigida, por exemplo onde controle restrito sobre possíveis contaminadores é exigido. Nestes casos as partículas de pureza mais elevada seriam preferidas sobre outros produtos menos puros. Para outras modalidades, as partículas menos puras seriam preferidas por razões econômicas; aquelas partículas também se mostraram mais eficazes em terpenos de absorção.

De preferência a partícula de glucana oca ou partícula de parede celular possui um conteúdo ligeiramente lipídico, tal como 1 ou 2% em peso de lipídio. Um conteúdo ligeiramente lipídico pode aumentar a capacidade da partícula em encapsular o componente terpênico. De preferência o conteúdo de lipídio da partícula de glucana oca ou partícula de parede celular é 5% em peso ou superior, mais preferivelmente 10% em peso ou superior.

Opcionalmente o componente terpênico da presente invenção pode ser associado com um agente tensoativo. O agente tensoativo pode ser não-iônico, catiônico, ou aniônico. Exemplos de agentes tensoativos adequados incluem sulfato de sódio lauril, polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster poligliceril, monoleato poligliceril, monocaprilato decagliceril, dicaprilato de glicol de propileno, monoestearato de

triglicerol, polioxietilenosorbitan, monooleato, Tween®, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 80, Brig 30 ou misturas destes. O agente tensoativo age para manter o componente terpênico em uma emulsão e também auxilia a encapsulação do
5 componente terpênico em partícula de glucana oca ou partícula de parede celular.

O componente terpênico da presente invenção pode compreender um terpeno único ou uma mistura de terpenos. Misturas de terpenos podem resultar em efeitos sinérgicos.

10 O termo "terpeno" conforme utilizado aqui se refere não apenas a terpenos de fórmula $(C_5H_8)_n$, mas também abrange derivados de terpeno, tais como aldeídos de terpeno ou polímeros de terpeno. Terpenos naturais e sintéticos estão incluídos, por exemplo, monoterpenos, sesquiterpenos,
15 diterpenos, triterpenos, e tetraterpenos. Além disso, a referência a um único nome de um composto abrangerá os diversos isômeros daquele composto. Por exemplo, o termo citral inclui o cis-isômero citral-a (ou geranial) e o trans-isômero citral-b (ou neral).

20 Deve-se observar que aqueles terpenos são também conhecidos pelos nomes do extrato ou óleo essencial que os contêm, por exemplo óleo de capim-limão (contém citral).

Os terpenos que são isentos de normas US e que são listados na norma EPA 40 C.F.R. Parte 152 (incorporados
25 aqui mediante referência em sua totalidade) são adequados para uso nesta invenção.

Terpenos especificamente adequados para uso na presente invenção incluem aqueles selecionados do grupo que consiste em citral, pineno, nerol, b-inone, geraniol,
30 carvacrol, eugenol, carvona (por exemplo, L-carvona),

terpeniol, anetole, cânfora, mentol, timol, limonene, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno (vitamina A₁), esqualeno, timol, tocotrienol, álcool perilílico, borneol, mirceno, simeno, careno, terpenono, linalol e misturas
5 destes.

De preferência os terpenos utilizados na presente invenção possuem a estrutura geral C₁₀H₁₆, na medida em que este subgrupo é normalmente mais eficaz contra agentes infecciosos.

10 Mais preferivelmente o componente terpênico compreende um terpeno selecionado do grupo que consiste em geraniol, timol, citral, carvona (por exemplo, L-carvona), eugenol e b-ionone.

O componente terpênico pode de forma adequada
15 compreender timol, na medida em que este terpeno mostrou ser especificamente eficaz no tratamento ou prevenção de infecções de plantas fúngicas.

Outro terpeno especificamente adequado é o citral que demonstrou eficácia específica contra diversos
20 microorganismos.

Uma combinação de geraniol, timol e eugenol demonstrou eficácia específica em combater infecções de plantas, e sendo assim é um componente terpênico especificamente adequado.

25 Citral sozinho ou uma combinação de timol, eugenol e citral demonstrou eficácia específica em combater infestações de ácaro, e são deste modo componentes terpênicos especificamente adequados.

Outras formulações de terpeno que mostraram
30 eficiência elevada em tratamento de infecções de plantas

incluem (percentagens são em peso):

- 100% timol;
- 50% geraniol e 50% timol;
- 50% eugenol e 50% timol;
- 5 - 33% geraniol, 33% eugenol e 33% timol;
- 33% eugenol, 33% timol e 33% citral;
- 25% geraniol, 25% eugenol, 25% timol e
- 25% citral;
- 20% geraniol, 20% eugenol, 20% citral, 20% timol e
- 10 20% L-carvona.

Conseqüentemente um componente terpênico que compreende qualquer das formulações é especificamente adequado para uso na presente invenção.

Em uma modalidade o componente terpênico inclui um ou
 15 mais terpenos que contêm oxigênio. Citral, por exemplo citral 95, é um terpeno $C_{10}H_{16}$ oxigenado, $C_{10}H_{16}O$ CAS No. 5392-40-5 (3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-al). Uma suspensão estável de citral pode ser formada até aproximadamente 2.500 ppm. O citral pode ser feito dentro de uma solução em
 20 até aproximadamente 500 ppm. Uma suspensão estável de partículas de glucana ocas que incorporam citral de 25 ppt citral pode ser feita.

A composição da invenção pode compreender 1 a 99% em volume de terpenos, 0 a 99% em volume de agente tensoativo
 25 e 1 a 99% de partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular. Mais especificamente a composição pode compreender aproximadamente 10% até aproximadamente 67% em peso de terpenos, aproximadamente 0,1-10% de agente tensoativo e aproximadamente 40-90% de partículas de
 30 glucana ocas ou partículas de parede celular.

De forma adequada uma composição da presente invenção compreende entre aproximadamente 500 e aproximadamente 10.000 ppm de partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular, onde as partículas contêm entre
5 aproximadamente 1 e aproximadamente 67% de componente terpênico. De preferência a composição compreende entre aproximadamente 1.000 e aproximadamente 2.000 ppm de partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular, onde as partículas contêm entre aproximadamente 10 e
10 aproximadamente 50% de componente terpênico.

Composições específicas podem incluir, por exemplo, para bactérias e fungos, partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular que encapsulam terpenos em água ou salmoura padrão a 0,9% com até 67% de L-carvona,
15 até 67% de eugenol, até 67% de citral, até 67% de timol e L-carvona, até 67% de geraniol, ou até 67% de citral e L-carvona e eugenol, e 1% de Tween®80; para mieldio, partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular que encapsulam terpenos em água ou salmoura padrão a 0,9%
20 com até 67% de citral e 1% de Tween®80; ou para mico-plasma, partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular que encapsulam terpenos em água ou salmoura padrão a 0,9% com até 67% de citral, até 67% de L-carvona e eugenol, até 67% de eugenol, até 67% de geraniol, ou até
25 67% de geraniol, timol e 1% de Tween®80.

Concentrações de partículas de glucana ocas ou partículas de parede celular que encapsulam 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,
30 375, 400, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 675, 700, 725,

750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 975, 1.000, 1.100, 1.250, 1.375, 1.425, 1.500, 1.600, 1.750, ou 2.000 ppm podem ser utilizadas como concentrações eficazes nas composições e métodos da presente invenção. Mesmo
5 concentrações mais elevadas (até 25 ppt, isto é, partes por mil) podem ser feitas e podem ser úteis na invenção.

A composição da presente invenção pode compreender entre aproximadamente 1 ppm e aproximadamente 25 ppt (25.000 ppm) do componente terpênico, de preferência 100 a
10 200 ppm do componente terpênico, por exemplo, 250, 500, 1.000, 2.000 ppm destes.

Os terpenos, agentes tensoativos, e outros componentes da invenção podem ser prontamente adquiridos ou sintetizados utilizando técnicas normalmente conhecidas de
15 químicos sintéticos.

É altamente preferido que terpenos utilizados na presente invenção, por razões de segurança e regulação, sejam pelo menos terpenos de grau alimentar (conforme definido pelo FDA dos Estados Unidos ou corpo regulador
20 nacional equivalente fora dos EUA).

Opcionalmente a composição pode compreender outros compostos ativos de tipo-alimentar além do componente terpênico, por exemplo, outros agentes antimicrobianos, enzimas, ou similares.

25 Opcionalmente a composição pode compreender um agente ativo adicional além do componente terpênico, por exemplo, um agente antimicrobiano, um agente antifúngico, um agente inseticida, um agente antiinflamatório, um anestésico ou similar. Agentes adequados incluem:

30 - Antifúngico: hidrolases de parede celular

(presumindo-se que não degradem a partícula de glucana oca ou a partícula de parede celular), inibidores de síntese de parede celular, antifúngicos padrão.

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

- Inseticida: inseticidas naturais, quitinase.

A composição pode compreender um antioxidante para
reduzir a oxidação do terpeno. Um exemplo de tal
antioxidante pode ser o óleo de alecrim, vitamina C ou
10 vitamina E.

A composição da presente invenção pode estar na forma
de um pó seco. A composição pode ser propiciada em
combinação com um carreador agrícola, alimentar ou
farmaceuticamente aceitável ou excipiente em uma forma
15 líquida, sólida ou tipo gel.

Para composições sólidas, carreadores adequados
incluem tipos farmacêuticos de manitol, lactose, amido,
estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose,
glicose, sacarose, carbonato de magnésio, e similares. De
20 forma adequada a formulação está em forma de tablete ou
esfera. Como carreador adequado poderia ser também um
material de alimentação humana ou animal. Além disso,
carreadores agrícolas convencionais poderiam também ser
utilizados.

25 Uma forma de péletes, tablete ou outra forma sólida
da composição pode de preferência também conter um agente
dispersante que promove dispersão da composição quando
colocado dentro de um líquido, por exemplo, água. Agentes
dispersantes adequados incluem goma xantana, maltodextrina,
30 alginatos, ou similares.

Composições líquidas podem, por exemplo, ser preparadas por dispersão da composição em água, salmoura, dextrose aquosa, glicerol, etanol, ou similares, para formar uma solução ou suspensão. Se desejado, estas composições podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas tais como agentes umidificadores ou emulsificantes, agentes tampão de pH (por exemplo, acetato de sódio, monolaurato sorbitana, acetato de sódio de trietanolamina ou oleato de trietanolamina). Os métodos para preparar tais composições líquidas são conhecidos, ou ficarão evidentes, para aqueles versados nesta técnica; por exemplo vide Remington: A Ciência e Prática de Farmácia; Lippincott, Williams & Wilkins; (15 de dezembro de 2000) - que é incorporada aqui mediante referência. Novamente uma composição líquida poderia ser preparada ao dispersar a composição em um material de alimentação ou beberagem humana ou animal. Adicionalmente um excipiente agrícola líquido poderia ser utilizado.

Para administração oral, tabletes e grânulos são normalmente preferidos. Tabletes podem conter aglutinantes e lubrificantes. Pós finos ou grânulos podem conter agentes diluentes, dispersantes e/ou ativos de superfície e podem ser apresentados em água ou em um xarope. Cápsulas ou sachês pode convenientemente conter a composição em um estado seco. Soluções não aquosas ou suspensões da composição são também adequadas e podem conter agentes de suspensão. Onde for desejável ou necessário, agentes de sabor, preservação, suspensão, espessamento, ou emulsificação podem ser incluídos. É evidente que seria adequado utilizar um material alimentício ou de beberagem

como um método de administração oral.

A administração parental é normalmente caracterizada por injeção. Para injetáveis será observado que, em geral, todos os materiais utilizados na composição e qualquer
5 excipiente utilizado devem ser de tipo farmacêutico. Injetáveis podem ser preparados em formas convencionais, tanto como soluções líquidas, emulsões ou suspensões, formas sólidas adequadas para dissolução, suspensão em líquido antes de injeção, ou como emulsões. Uma abordagem
10 alternativa para administração parental envolve o uso de uma liberação lenta ou sistema de liberação sustentada, de modo que um nível constante de dosagem seja mantido. Vide, por exemplo, a Patente U.S. No. 3.710.795, que é incorporada aqui mediante referência. Preparações para
15 parenteral podem incluir também suspensões, diluentes e outros aditivos adequados. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais (tais como azeite de oliva), e ésteres orgânicos injetáveis (tais como etil oleato). Carreadores aquosos
20 incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões, ou suspensões, que incluem salmoura e meios suspensos. Outros veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, de Ringer lactado , ou óleos fixados. Veículos para uso intravenoso
25 incluem repositórios de fluido e de nutrientes, repositórios de eletrólitos (tais como aqueles à base de dextrose de Ringer) e similares. Preservativos e outros aditivos podem também ser apresentados tais como, por exemplo, anti-microbianos, anti-oxidantes, agentes de
30 quelação, gases inertes, e similares.

Para administração tópica líquidos, suspensão, loções, cremes, géis, ungüentos, gotas, supositórios, pulverizações e pós podem ser utilizados. Carreadores farmacêuticas convencionais, de bases aquosas, em pó ou
5 oleosas, espessadores, e similares podem ser utilizadas conforme necessário ou desejado.

A presente invenção propicia ainda um método para preparar uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico, o
10 referido método compreendendo as etapas de :

- a) propiciar um componente terpênico;
- b) propiciar uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular;
- c) incubar o componente terpênico com a partícula
15 de glucana oca ou partícula de parede celular sob condições adequadas para encapsulação de terpeno; e
- d) recuperar a partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula o componente terpênico.

20 Opcionalmente o método acima pode ainda compreender a etapa de secar as partículas que encapsulam o componente terpênico. A secagem pode ser conseguida de diversas formas e menção pode ser feita a secagem por congelamento, secagem de leito fluidizado, secagem a tambor ou secagem por
25 pulverização, todas as quais são processos bem conhecidos.

Na etapa a) do método acima, o componente terpênico é adequadamente propiciado como uma suspensão em um solvente aquoso, e opcionalmente na presença de um agente tensoativo. De forma adequada o solvente é água. Um agente
30 tensoativo adequado é Tween-80 (monooleato polioxietileno-

sorbitana), e de preferência o agente tensoativo está presente em uma concentração entre aproximadamente 0,1 e 10% em volume da mistura de reação total, mais preferivelmente aproximadamente 1%. De forma alternativa o
5 componente terpênico pode ser propiciado como uma solução verdadeira em um solvente, por exemplo, água. Uma solução verdadeira de terpeno em água pode ser obtida ao misturar o terpeno em água em cisalhamento elevado até uma solução verdadeira ser obtida. A Publicação No. WO 03/020024
10 propicia detalhes adicionais de formação de soluções verdadeiras de terpeno em água.

Na etapa b) do método acima, a partícula de glucana oca ou partícula de parede celular é adequadamente propiciada como uma suspensão em água ou outro líquido
15 adequado. De forma adequada a suspensão compreende aproximadamente 1 a 1.000 mg de partículas por ml, de preferência 200 a 400 mg/ml. De forma alternativa as partículas podem ser propiciadas como um pó seco e adicionadas à suspensão terpeno-agente tensoativo.

20 De forma alternativa as partículas são propiciadas em líquido suficiente para hidratar minimamente as partículas, mas não em excesso significativo. O termo "volume hidrodinâmico" (HV) é utilizado para descrever o volume de líquido exigido para hidratar minimamente as partículas.
25 Sendo assim, de forma adequada, as partículas são propiciadas com um volume que varia entre o HV e um volume de 1,5 vezes o HV (1,5HV). Isto torna a etapa de secagem subsequente mais eficiente. Além disso, onde um volume baixo de líquido é utilizado (isto é, em torno de HV até
30 1,5HV), é também possível extrudar o produto finalizado em

forma de esfera ou macarrão, que é conveniente para secagem de leito fluidizado.

Verificou-se que o componente terpênico pode tornar-se encapsulado pela partícula de glucana oca ou partícula de parede celular em temperatura ambiente. A taxa de encapsulação é, contudo, aumentada em 37°C, porém a temperatura deveria ser mantida abaixo do ponto de ebulição ou temperatura desnaturante de qualquer componente da composição. Condições adequadas para a etapa c) do método acima são, por conseguinte, pressão atmosférica em uma temperatura de 20 a 37°C. A otimização das condições para uma reação de encapsulação específica será uma questão de experimentação de rotina.

A presente invenção propicia ainda um método para matar um microorganismo, o referido método compreendendo a etapa de:

a) contatar o referido microorganismo com uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico.

Composições adequadas são aquelas definidas em maiores detalhes acima.

A presente invenção propicia ainda um método para impedir ou tratar uma infecção em um paciente, o referido método compreendendo a etapa de:

a) administrar ao referido paciente em uma dose terapeuticamente eficaz, uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico.

Composições adequadas são aquelas definidas em

maiores detalhes acima.

A infecção do paciente pode ser provocada por qualquer agente infeccioso. Exemplos destes agentes infecciosos incluem *Staphylococcus aureus*, *Aspergillius*
5 *fumigatus*, *Mycoplasma iowae*, *Penicillium sp.*, e *Mycoplasma pneumoniae*, mas não se restringem a estes.

Para administração interna a composição pode ser administrada por via oral, vaginal, retal, por inalação, ou por vias parenterais, por exemplo, por vias intradérmicas,
10 subcutâneas, intramusculares, intra-peritoniais, intra-retais, intra-arteriais, intralinfáticas, intravenosas, intra-tecais e intratraqueais. Formulações adequadas da composição para estas vias são discutidas acima.

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

A quantidade de terpeno administrada no método acima deveria ser claramente suficiente para alcançar o resultado desejado, isto é, prevenção e/ou tratamento da infecção,
20 porém não deveria estar em um nível que induzirá efeitos tóxicos sérios no paciente.

A quantidade de composição administrada aqui será, é evidente, dependente da maneira de administração, no paciente sendo tratado, isto é, seu peso, sua idade,
25 condição, sexo e extensão da doença no espécime e no julgamento do médico que prescreve. A dose, programação de doses, e via de administração podem ser variadas. Aquele versado na técnica seria prontamente capaz de determinar uma quantidade antiinfecciosa para uma aplicação
30 determinada com base no conhecimento geral na técnica e nos

procedimentos nos Exemplos fornecidos abaixo. Deve ser observado que o termo "paciente" como utilizado aqui se refere a qualquer indivíduo, tanto humano quanto animal, ao qual o tratamento é aplicado. Sendo assim, o paciente pode
5 ser um animal doméstico (por exemplo, gato, cachorro, etc.), carga viva (por exemplo, gado, cavalos, porcos, ovelhas, cabras, etc.), animais de laboratório (por exemplo, camundongos, coelhos, ratos, porquinhos-da-índia, etc.), aves e peixes. De forma adequada o espécime é um
10 mamífero e especialmente um primata, por exemplo um humano.

Em um aspecto adicional a presente invenção propicia um método para matar um inseto ou aracnídeo, o referido método compreendendo a etapa de:

a) administrar ao referido inseto ou aracnídeo em uma
15 dose eficaz uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico.

Insetos que podem ser mortos de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, formigas, cupins, piolhos,
20 pulgões, pulgas, gafanhotos, cigarras, tripes.

Aracnídeos que podem ser mortos de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, ácaros, aranhas e carrapatos.

Em uma modalidade a presente invenção propicia um
25 método para matar ácaros que infestam plantas, por exemplo ácaros de aranha de duas pintas. Composições incluindo somente citral ou uma combinação de eugenol, timol e citral são particularmente adequados para matar ácaros de aranha de duas pintas.

30 A administração pode ser adequadamente através de

pulverização ou de outra forma dispersão da composição sobre o inseto ou aracnídeo ou por pulverização sobre uma folha de planta que pode em seguida ser ingerida pelo inseto ou aracnídeo. De forma alternativa, um objeto
5 infestado com o inseto ou aracnídeo pode ser imerso na composição.

Onde um humano, animal é infestado com o inseto ou aracnídeo a composição pode ser administrada, por exemplo, na forma de um xampu ou similar.

10 Onde tecido, por exemplo roupas, está infestado com o inseto ou aracnídeo a composição pode ser administrada durante lavagem das roupas. Por exemplo a composição poderia ser administrada como parte de um detergente ou composição amaciante.

15 Em uma modalidade adicional a presente invenção propicia um método para tratar ou impedir infecção ou infestação de uma planta, o referido método compreendendo a etapa de:

a) administrar em uma dose terapeuticamente eficaz
20 uma composição que compreende partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico à planta ou ao solo próximo à planta.

Composições adequadas são aquelas definidas em maiores detalhes acima.

25 Foram mostrados terpenos para eliminar diversos patógenos de planta (vide WO 03/020024) e, conforme descrito no pedido de patente co-pendente U.S. No. 60/538.627, também efetivamente para matar nematóides que são parasitas de plantas significativos. Os terpenos
30 sozinhos em suspensão ou solução, entretanto, são algo

instáveis e degradam-se rapidamente em ambiente de solo, deste modo perdendo eficácia.

A incorporação de um componente terpênico em uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular
5 pode reduzir a taxa de liberação e degradação de terpeno, deste modo aumentando a duração de ação do terpeno no solo.

De forma adequada a infecção de uma planta que deve ser tratada ou impedida no método acima é infecção por nematóides.

10 Outras infecções de planta que possam ser tratadas ou impedidas incluem infecções de planta fúngicas, especialmente aquelas que afetam a superfície de uma planta. Tais infecções incluem míldio brando, míldio em pó ou botrytis bunch rot; estas infecções afetam
15 especificamente vinhedos.

Em uma modalidade, a infecção de planta pode ser provocada por um ou mais dos que se seguem:

Aspergillius fumigatus, *Sclerotinia homeocarpa*,
Rhizoctonia solani, *Colletotrichum graminicola*, *phytophthora*
20 *infestans* ou *Penicillium sp.*

Infestações de planta que podem ser impedidas ou tratadas incluem infestações por insetos ou aracnídeos. Exemplos de infestações de inseto que podem ser tratadas incluem aquelas por moscas, áfídios, formigas, gafanhotos,
25 cigarras e tripes. Exemplos de infestações de aracnídeos que podem ser impedidas ou tratadas incluem ácaros herbívoros (que incluem ácaros de aranha de duas pintas).

Composições de acordo com a presente invenção mostraram ser especialmente eficazes ao tratar infestações
30 de planta com ácaros, especificamente ácaros de aranha de

duas pintas. Composições que incluem citral sozinho ou uma combinação de eugenol, timol e citral são especificamente adequadas para matar ácaros de aranha de duas pintas.

Uma vantagem de um tratamento de plantas à base de terpenos é que o mesmo pode ser aplicado imediatamente antes da colheita.

Muitos tratamentos convencionais exigem um período estendido antes de re-entrar a área tratada (normalmente três semanas). Isto significa que uma epidemia de uma doença de planta brevemente antes da colheita não pode ser tratada com tratamentos convencionais, na medida em que não seria então possível colher a plantação no tempo desejado. As composições da presente invenção podem adequadamente ser aplicadas em qualquer momento 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.

Terpenos encapsulados mostraram eficácia específica ao tratar míldio brando, míldio em pó e botrytis bunch rot em uvas, e sendo assim a presente invenção propicia um método para tratar ou impedir estas doenças. Além disso, os terpenos encapsulados mostraram ser especificamente eficazes ao tratar infestação de ácaros de aranha de duas pintas, e sendo assim a presente invenção também propicia um método para tratar ou impedir tais infestações.

A prevenção de infecções de planta pode ser alcançada ao tratar plantas com os terpenos encapsulados regularmente como uma medida profilática.

De forma adequada a composição da presente invenção é aplicada por pulverização. Isto é especificamente adequado

para tratar uma doença de planta que afeta a superfície de uma planta. Para pulverização, uma preparação que utiliza 2 g/l da composição em água pode ser usada. Concentrações entre 2 e 4 g/l são especificamente eficazes, e concentrações maiores do que 4 g/l podem ser utilizadas conforme necessário. Obviamente é importante que a concentração da composição utilizada seja suficiente para matar ou inibir o agente causador da doença, porém não tão elevada para danificar a planta sem do tratada.

10 Ao pulverizar plantas, uma taxa de 50.000 L/Km² ou superior é adequada para cobrir as plantas. De preferência uma taxa de 90.000 L/Km² ou superior, mais preferivelmente 120.000 L/Km² ou superior é utilizada para garantir boa cobertura. Onde vinhedos estão sendo tratados, uma taxa de 15 120.000 L/Km² provou ser adequadamente eficaz.

A composição da presente invenção pode de forma alternativa ser aplicada através de irrigação. Isto é especificamente adequado para tratar nematóides ou outros patógenos ou parasitas existentes no solo.

20 Em outra modalidade a invenção propicia o uso de uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico como um inseticida ou como um aracnicida (isto é, uma composição capaz de matar aracnídeos), especificamente 25 como um acaricida.

Em uma modalidade adicional a invenção propicia o uso de uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico para a preparação de um inseticida ou 30 um aracnicida, especificamente um acaricida.

Em uma modalidade adicional a presente invenção também propicia uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico para uso na prevenção ou tratamento de uma infecção em um paciente ou uma planta. Composições adequadas são aquelas definidas em maiores detalhes acima.

Em uma modalidade adicional a presente invenção propicia o uso de uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico na fabricação de um medicamento para tratamento de infecção provocada por um microorganismo. Composições adequadas são aquelas definidas em maiores detalhes acima.

A presente invenção será agora ainda descrita mediante referência aos exemplos e figuras, não limitantes, que se seguem nos quais:

a Fig. 1 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura vazias;

a Fig. 2 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam L-carvona;

a Fig. 3 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam citral;

a Fig. 4 representa uma microfotografia de emulsão de terpeno;

a Fig. 5 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura em água de volume hidrodinâmico (HV);

a Fig. 6 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam terpeno em 5 vezes o volume hidrodinâmico (HV) de água;

a Fig. 7 representa uma microfotografia de paredes

celulares de levedura que encapsulam terpeno em HV de água;

a Fig. 8 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam terpeno em HV mais 5% de água;

5 a Fig. 9 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam terpeno em HV mais 10% de água;

a Fig. 10 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam terpeno em HV mais 20%
10 de água;

a Fig. 11 representa uma microfotografia de paredes celulares de levedura que encapsulam terpeno em HV mais 30% de água;

a Fig. 12 representa uma microfotografia de paredes
15 celulares de levedura que encapsulam terpeno em HV mais 40% de água;

a Fig. 13 representa uma microfotografia que mostra a dispersão de partículas de glucana ocas secas que encapsulam um componente terpênico e nenhuma goma de
20 xantana;

a Fig. 14 representa uma microfotografia como na Fig. 13 em que 0,07 g de goma de xantana a 1% é incluída;

a Fig. 15 representa uma microfotografia como na Fig. 13 em que 0,14 g de goma de xantana a 1% é incluída;

25 a Fig. 16 representa uma microfotografia como na Fig. 13 em que 0,28 g de goma de xantana a 1% é incluída;

a Fig. 17 representa uma microfotografia como na Fig. 13 em que 0,55 g de goma de xantana a 1% é incluída;

a Fig. 18 representa uma microfotografia como na Fig.
30 13 em que 1,1 g de goma de xantana a 1% são incluídas;

a Fig.19 representa uma microfotografia como na Fig.
13 em que 2,2 g de goma de xantana a 1% são incluídas;

a Fig.20 representa uma microfotografia como na Fig.
13 em que 4,4 g de goma de xantana a 1% são incluídas;

5 a Fig.21 mostra uma representação esquemática de
áreas de tratamento nos locais 18 e 20;

a Fig.22 mostra uma representação esquemática de
áreas de tratamento nos locais 18 e 20;

a Fig. 23 mostra uma representação esquemática das
10 áreas de tratamento no local 7;

a Fig. 24 mostra um gráfico que mostra comparação de
formulações de terpeno encapsuladas versus não-
encapsuladas;

a Fig. 25 mostra um gráfico que representa progressão
15 de doença fúngica em tomateiros;

a Fig. 26a-d mostra um gráfico que representa
variantes de doença de ácaro em 4 réplicas de tomateiros e

a Fig. 27 é uma fotografia que mostra uma comparação
entre uma planta tratada com YP-4 e um controle.

20 Os exemplos que se seguem são propiciados para
permitir ainda que aqueles versados na técnica façam ou
realizem a presente invenção. Os mesmos são puramente
exemplificativos e não se destinam a limitar o âmbito da
invenção. A não ser que de outra forma indicado, partes são
25 partes por volume ou partes por peso, conforme indicado,
temperatura está em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$) ou está em
temperatura ambiente, e pressão é ou está próxima da
atmosférica. Existem diversas variações e combinações das
composições e condições para produzir ou utilizá-las, por
30 exemplo, concentrações de componentes, solventes desejados,

misturas de solventes, temperaturas, pressões, e outras faixas e condições que podem se utilizadas para otimizar os resultados obtidos a partir das composições e métodos descritos. Apenas experimentação razoável e de rotina será exigida para otimizá-las.

Exemplo 1 - Demonstração de Carregamento de Terpeno em Partículas de levedura de Baker e Partículas de Glucana de levedura Purificadas

O protocolo que se segue foi realizado para demonstrar que terpenos seriam carregados em paredes celulares de levedura e outras partículas de glucana ocas.

Emulsões de citral e L-carvona foram preparadas ao misturar 150µl do terpeno com 100µl de Tween 80 a 10% em água e 250µl de água.

Partículas de levedura de Baker (YP) ou partículas de glucana de levedura de Levacan™ (YGP), disponíveis de Savory Systems International, Inc., Branchburg, NJ, foram misturadas com água para formar uma suspensão de 250 mg/ml.

500µl da suspensão de YP ou YGP e 250µl da emulsão de terpeno foram misturadas entre si e incubadas durante a noite sob agitação constante. 500µl de suspensão de YP ou YGP e 500µl de água foram utilizados como um controle. As partículas foram em seguida lavadas com água até liberarem-se da emulsão externa. As preparações de partículas foram em seguida congeladas e liofilizadas até secarem.

As partículas foram em seguida re-hidratadas e examinadas sob microscópio luminoso. Os resultados são mostrados nas Figs. 1 a 4.

A Fig. 1 mostra estruturas esféricas com uma área escura em seu centro, estas são partículas de glucana ocas

vazias. As Figs. 2 e 3 mostram estruturas esféricas com uma aparência intumescida com um interior colorido claro, estas são partículas com terpeno encapsulado na cavidade central - citral na Fig. 2 e L-carvona na Fig. 3. Nas Figs. 2 e 3 glóbulos pequenos de terpeno livre podem também ser vistos, por exemplo, na parte superior da Fig. 2, logo à esquerda do centro. A Fig. 4 mostra a emulsão de terpeno como bolhas pequenas de terpeno suspensos em água.

Exemplo 2 - Determinação de níveis de carregamento de citral e L-carvona máximos em Partículas de Parede Celular de Levedura de Baker (YP)

O protocolo que se segue foi realizado para determinar as quantidades máximas de terpenos que poderiam ser carregados em YP.

- Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas ao agitar 4,5 g do terpeno com 0,3 ml de água.

- A solução de Tween-80 a 10% foi preparada ao agitar 4,5 g de Tween-80 em 40,5 mls de água.

-A suspensão YP foi preparada ao misturar YP com água para formar 20 mg/ml de suspensão.

- Reações de encapsulação foram determinadas conforme descrito na Tabela 1.

A emulsão de citral ou L-carvona foi misturada com YP e agente tensoativo de Tween 80 durante a noite em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas em 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando sobre a camada aquosa foi anotado. Os resultados são mostrados na coluna da direita registrada terpeno livre da Tabela 1.

A expressão "terpeno livre" refere-se à presença

visível de terpeno na mistura de reação centrifugada. A ausência de terpeno livre indica absorção completa do terpeno pelas partículas. O volume mais elevado de terpeno absorvido pelas partículas, conforme evidenciado pela
 5 ausência de terpeno livre, foi registrado como volume máximo de emulsão de terpeno absorvida.

Tabela 1

<u>Tubo</u>	<u>20 mg/ml</u> <u>YP</u>	<u>Emulsão</u> <u>de</u> <u>Terpeno</u>	<u>Vol.</u>	<u>Tween-80</u> <u>a 10%</u>	<u>Terpeno</u> <u>Livre</u>
	ML		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	-	+

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

Exemplo 3 - Demonstração de carregamento de terpeno
aperfeiçoado com agente tensoativo e determinação de razão
Tween-80:Terpeno ideal.

O protocolo seguinte foi realizado para demonstrar
5 que a presença de tensoativo melhora o carregamento de
terpeno e para determinar o nível mínimo de tensoativo
Tween-80 requerido para a reação de carregamento de terpeno
YP.

- emulsões de L- carvona e citral foram preparadas
10 por sonicação de 4,5g do terpeno com 0,3ml de água.

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

- Suspensão de YP de Baker foi preparada por mistura
de YP com água para formar suspensão de 250mg/ml.

15 As reações de carregamento foram preparadas como
mostrado na tabela 2, abaixo.

A emulsão de citral ou L-carvona foi misturada com YP
com 0-10% em volume de agente tensoativo Tween 80 durante a
noite em temperatura ambiente. As amostras foram
20 centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento
de terpeno livre flutuando sobre a camada aquosa foi
marcada. Os resultados são mostrados na coluna da direita
registrada terpeno livre da Tabela 2.

A expressão "terpeno livre" refere-se à presença
25 visível de terpeno na mistura de reação centrifugada. A
ausência de terpeno livre indica absorção e encapsulação
completos do terpeno pelo YP. O volume mais elevado de
terpeno absorvido pelo YP, conforme evidenciado pela
ausência de terpeno livre, foi registrado como volume
30 máximo de emulsão de terpeno absorvida.

Tabela 2

<u>Tubo</u>	<u>250</u> <u>mg/ml</u> <u>YP</u>	<u>Emulsão</u> <u>de</u> <u>Terpeno</u>	<u>Vol.</u>	<u>Tween-80</u> <u>a 10%</u>	<u>Água</u>	<u>Terpeno</u> <u>Livre</u>
	ml		µl	ML	µl	
1	500	-	-	-	500	-
2	500	L-carvona	150	0	350	SI
3	500	L-carvona	150	5	345	SI
4	500	L-carvona	150	10	340	SI
5	500	L-carvona	150	33	317	SI
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	20µl 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	SI
19	500	Citral	113	100	287	SI
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	20µl 100%	230	+

SI=ligeiro

Como pode ser visto a partir dos resultados, uma concentração de Tween-80 de 1% (isto é, 100 µl de Tween-80 a 10% em 1.000 µl de mistura de reação) é suficiente para
5 permitir tomada completa do terpeno na reação acima. Um Tween-80 de 2% não provoca nenhum aperfeiçoamento em resultados, enquanto com uma concentração de 0,33% terpeno livre foi observado. Isto indica que:

10 Terpenos são absorvidos em partículas YP na ausência de um agente tensoativo, porém na presença de agente tensoativo aumenta significativamente a absorção de terpeno.

Uma concentração de Tween-80 de cerca de 1% é ideal para carregamento de YP na medida em que garante
15 carregamento adequado enquanto maximiza a carga de terpeno das partículas YP.

Exemplo 4 - Determinação de carregamento de terpeno máximo e encapsulação em níveis de Partículas de Parede Célula de levedura de Baker (YP)

20 O protocolo que se segue foi realizado para determinar as quantidades máximas de terpenos que poderiam ser carregados em níveis de YP e YP elevado.

- Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas ao agitar 4,5 g do terpeno com 3 ml de 1% de Tween.

25 - A solução de Tween-80 a 5% foi preparada ao agitar

0,5 g de Tween-80 em 9,5 mls de água.

-A suspensão YP foi preparada ao misturar YP com água para formar 250 mg/ml de suspensão.

5 - Reações de encapsulação foram determinadas conforme descrito na Tabela 3.

A emulsão de citral ou L-carvona foi misturada com YP e agente tensoativo de Tween 80 durante a noite em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas em 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre
10 flutuando sobre a camada aquosa foi marcada. Os resultados são mostrados na coluna da direita registrada terpeno livre da Tabela 3.

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

20 **Tabela 3**

<u>Tubo</u>	<u>250</u> <u>mg/ml YP</u>	<u>Emulsão</u> <u>de</u> <u>Terpeno</u>	<u>Vol.</u>	<u>Tween-80</u> <u>a 1%</u>	<u>Terpeno</u> <u>Livre</u>
	μ l		μ l	μ l	
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	SI+

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	SI+
13	500	Citral	150	350	+
14	500	Citral	225	275	+
15	500	Citral	450	50	+

Como pode ser visto a partir dos resultados na Tabela 3, o YP é capaz de absorver e encapsular terpenos em concentração YP elevada. O YP absorveu e encapsulou pelo menos 112,5 µl de emulsão de terpeno de L-carvona ou pelo menos 75 µl de emulsão de citral por 125 mg de YP. Isto demonstra que a reação de encapsulação de terpeno é independente de concentração de YP dentro das faixas testadas.

Exemplo 5 - Visão de partículas comercialmente disponíveis para absorção de terpeno

O protocolo que se segue foi realizado para analisar as propriedades de carregamento de tipos diferentes de partículas. As partículas estudadas foram Partículas de Parede Celular de levedura de Baker (Sigma Chemical Corp. , St. Louis, MO), Paredes Nutrex™ (Sensient Technologies, Milwaukee, WI), SAF-Mannan™ (SAF Agri, Minneapolis, MN), Nutricept Walls™ (Nutraceuticals Inc., Branchburg, NJ) e WGP™ (Alpha-beta Technologie, Inc. Worcester, MA).

Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas ao agitar 7g de terpeno + 3 ml de Tween-80 a 3,3%.

A Tabela 4 abaixo compara a pureza com o número de

partículas de levedura por mg e a razão peso/volume de sólidos embalados.

Tabela 4

<u>Partícula de</u> <u>levedura</u>	<u>% de pureza</u> <u>de Beta 1,3</u> <u>glucana</u>	<u>No. de</u> <u>partículas/mg</u>	<u>Mg de</u> <u>partículas/ml</u>
Baker's	11,2	4×10^7	250
Nutrex	24,5	$1,7 \times 10^8$	58,8
SAF Mannan	33,4	$2,4 \times 10^8$	41,7
Nutricepts	55,7	$5,2 \times 10^8$	37
Levacan	74,6	1×10^8	19,2
WGP	82,1	$3,5 \times 10^8$	10

A partir da Tabela 4 pode ser concluído que o número
5 de partículas por mg é inversamente proporcional à pureza.
Sendo assim o número de partículas por mg de WGP é quase 10
vezes mais elevado do que YP de Baker.

As suspensões de YP foram preparadas como se segue:

- A suspensão de partícula de parede celular de
10 levedura de Baker (YP) foi preparada ao misturar 250 mg
YP/ml Tween 80 a 1%.

- A suspensão de Nutrex foi preparada ao misturar 163
mg de Nutrex YGP/ml Tween 80 a 1%.

- A suspensão de Mannan SAF foi preparada ao misturar
15 234 mg de Biospringer YGP/ml Tween 80 a 1%.

- A suspensão de Nutricepts foi preparada ao misturar
99 mg de Nutricepts YGP/ ml Tween 80 a 1%.

- A suspensão de Lavacan foi preparada ao misturar
217 mg Lev YGP/ ml Tween 80 a 1%.

20 - A suspensão de WGP foi preparada ao misturar 121 mg
de WGP YGP/ ml Tween 80 a 1%.

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

Reações de carregamento foram estabelecidas conforme
 5 mostrado na Tabela 5 e deixadas para incubar durante a noite. As amostras foram centrifugadas em 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento do terpeno livre flutuando sobre a camada aquosa e a cor dos terpenos encapsulados na esfera foram marcadas. Os resultados são mostrados nas duas
 10 colunas da direita da Tabela 5. O volume mais elevado do terpeno absorvido pelas partículas conforme evidenciado pela ausência de terpeno livre foi registrado como o volume de emulsão de terpeno absorvido.

Tabela 5

<u>Tubo</u>	<u>Partícul</u> <u>a</u>	<u>Conc</u> <u>·</u> <u>Mg/m</u> <u>l</u>	<u>µl</u>	<u>Emulsão</u> <u>de</u> <u>Terpeno</u>	<u>Vol</u> <u>·</u> <u>µl</u>	<u>Twee</u> <u>n 80</u> <u>a 1%</u> <u>µl</u>	<u>Terpen</u> <u>o</u> <u>Livre</u>	<u>Cor</u>
1	Baker's	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	Nutricep ts	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	Baker's	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; si= ligeiro; int.= intermediário

A partir dos resultados, foram obtidas as conclusões que se seguem:

- Partículas purificadas com um teor de lipídio baixo foram menos eficientes em absorver terpenos.

- Menos partículas puras foram mais eficazes em absorver terpenos.

- O produto de degradação amarelo de citral não foi formado quando encapsulado em SAF-Mannan™.

- Com base no carregamento qualitativo em um nível de terpeno único testado, SAF-Mannan™ parece ser melhor, Nutrex™ em segundo e Baker em terceiro.

Exemplo 6 - Cinética de carregamento de terpeno em diversos tipos de partículas e temperaturas de incubação diferentes.

O protocolo que se segue foi adotado para comparar a cinética de carregamento de diversos tipos de partículas de levedura.

Emulsões de L-carvona e citral foram preparadas ao agitar 7 g de terpeno com 3 ml de Tween-80 a 3,3%.

Solução de Tween-80 a 1% foi preparada ao gitar 1 ml

de Tween-80 a 10% em 10 ml de água.

- YP de Baker foi preparado ao misturar 5 g de YP de Baker em 20 ml de Tween-80 a 1%.

- Suspensão de YGP de Nutrex™ foi preparada ao misturar 2g de YGP de Nutrex™ em 20 ml de Tween-80 a 1%.

- Suspensão de SAF Mannan™ foi preparada ao misturar 2 g de SAF Mannan™ em 20 ml de Tween-80 a 1%.

Reações de carregamento foram determinadas conforme mostrado na Tabela 6.

As reações foram incubadas por 1, 3, 6, 9 e 24 horas em temperatura ambiente ou 37°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas em 14.000 x g por 10 minutos e a aparência de terpeno livre flutuando sobre a camada aquosa foi marcada. Os resultados são mostrados nas duas colunas da direita da Tabela 6. O volume mais elevado de terpeno absorvido pelas partículas conforme evidenciado pela ausência de terpeno livre foi registrado como o volume de emulsão de terpeno absorvida. A cor da esfera encapsulada foi registrada após 24 horas.

Tabela 6

Tubo	T °C	Partíc ula	Conc. mg/ml	µl	Emulsão de Terpeno	Vol µl	1% de Tween -80	Terpeno livre (h)					cor
								1	3	6	9	24	
1	Rt	Baker 's	250	3500	L- carvona	1050	2450	+	-	-	-	-	W
2	37	Baker 's	250	3500	L- carvona	1050	2450	+	-	-	-	-	W
3	Rt	Nutrex	100	3500	L- carvona	1050	2450	<+	-	-	-	-	W
4	37	Nutrex	100	3500	L-	1050	2450	<+	-	-	-	-	W

		x			carvona								
5	Rt	SAF	100	3500	L- carvona	1050	2450	+	-	-	-	-	W
6	37	SAF	100	3500	L- carvona	1050	2450	+	-	-	-	-	W
7	Rt	Baker 's	250	3500	Citral	525	2975	+	-	-	-	-	Y
8	37	Baker 's	250	3500	Citral	525	2975	+	-	-	-	-	VY
9	Rt	Nutre x	100	3500	V	788	2712	+	-	-	-	-	Y
10	37	Nutre x	100	3500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	VY
11	Rt	SAF	100	3500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	W
12	37	SAF	100	3500	Citral	788	2712	+	-	-	-	-	W

Branco, W; Amarelo, Y; Muito amarelo, VY; Temperatura Ambiente, Rt.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 6 e outras observações, as conclusões que se seguem podem ser feitas:

- A reação de carregamento de terpeno ocorre entre 1 e 3 horas.

- O carregamento de terpeno ocorre mais rápido em 37°C do que em temperatura ambiente.

10 - SAF Mannan™ parece ser partículas preferíveis por duas razões:

- Tomada mais completa e mais rápida de ambos os terpenos.

15 - O citral permanece estável quando carregado conforme evidenciado pela ausência de cor amarela,

característica de degradação de citral, após 24 horas em 37°C.

Exemplo 7 - Visão de uma faixa de terpenos únicos e combinações de terpeno para carregamento de partícula

O protocolo que se segue foi adotado para comparar a eficiência de carregamento de YP de Baker versus SAF Mannan™.

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%.

- Mistura 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%.

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

- Mistura de citral/L-carvona/Eugenol (C/L/E) - 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%.

Razão de emulsões compostas de terpeno: água : agente tensoativo de 0,75:0,3:0,05 foram utilizadas para estes experimentos.

Volumes crescentes de emulsão de terpeno foram misturados com 250 mg/ml de YP de Baker ou 250 mg/ml de SAF Mannan™ durante a noite em temperatura ambiente conforme mostrado nas Tabelas 7 e 8. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e o aparecimento de terpeno livre flutuando sobre a camada aquosa foi marcado. O volume

mais elevado de emulsão de terpeno absorvido pelo YP de Baker ou SAF Mannan™ conforme evidenciado pela ausência de terpeno livre foi registrado como o volume de emulsão de terpeno absorvido. A cor de terpenos encapsulados na esfera
 5 foi registrada. Os resultados nas Tabelas 7 e 8 mostram que todos os terpenos simples e combinados foram eficientemente carregadas em partículas de YP de Baker ou SAF Mannan™.

Tabela 7- Avaliação de Carregamento de YP de Baker de Terpenos Diferentes e Misturas de Terpenos

<u>Tubo</u>	<u>Baker</u> <u>(µl)</u>	<u>Emulsão de</u> <u>Terpeno</u>	<u>Vol</u> <u>(µl)</u>	<u>Tween-80</u> <u>a 1% (µl)</u>	<u>Terpeno</u> <u>Livre</u>	<u>Cor</u>
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	+/-	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/L/E	15	485	-	Y
38	500	C/L/E	37,5	462,5	-	Y
39	500	C/L/E	75	425	-	Y
40	500	C/L/E	112,5	387,5	+/-	Y
41	500	C/L/E	150	350	+	Y
42	500	C/L/E	225	275	+	Y
43	500	C/L/E	450	50	+	Y

Tabela 8 - Avaliação de Carregamento de SAF Mannan de Terpenos Diferentes e Misturas de Terpenos.

<u>Tubo</u>	<u>SAF</u> <u>(µl)</u>	<u>Emulsão de</u> <u>Terpeno</u>	<u>Vol</u>	<u>Tween-80</u> <u>a 1% (µl)</u>	<u>Terpeno</u> <u>Livre</u>	<u>Cor</u>
-------------	---------------------------	-------------------------------------	------------	-------------------------------------	--------------------------------	------------

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 ul	425	-	W
12	500	Citral	112,5	387,5	+/- Invertido	W
13	500	Citral	150	350	+	W
14	500	Citral	225	275	+	W
15	500	Citral	450	50	-	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	- Invertido	W
36	500	Geraniol	450	50	+ Invertido	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

Invertido= fase invertida - sólidos flutuando sobre parte superior - sem óleo livre; W= branco; Y= amarelo.

A partir dos resultados as observações que se seguem foram feitas:

- 5 - Todos os terpenos pareceram carregar em YP de Baker e SAF Mannan.
- SAF Mannan possui uma capacidade de carregamento de terpeno mais elevada do que YP de Baker.
- As duas ou três formas de misturas de terpenos
10 também parecem carregar de forma eficiente.
- O Eugenol de terpeno parece possuir uma densidade

mais elevada do que as partículas e água como foi encontrado associado com a esfera.

- Para o SAF Mannan, os níveis de carga mais elevados e partículas mais leves resultaram em partículas carregadas que flutuam sobre a superfície da camada aquosa para citral e geraniol.

- Citral foi protegido de oxidação pelo SAF Mannan mas não pelo YP de Baker.

O carregamento máximo aproximado para cada tipo de partícula foi determinado e é mostrado nas Tabelas 9 e 10 abaixo. A percentagem carregada representa uma razão da quantidade de terpeno carregado para a quantidade de partícula presente (peso por peso).

Tabela 9 - Carregamento Máximo de Terpeno em YP de Baker.

<u>Terpeno</u>	<u>Vol. carregado µl</u>	<u>% carregada em peso/peso</u>
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

<u>Terpeno</u>	<u>Vol. carregado µl</u>	<u>% carregada em peso/peso</u>
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 de estabilidade de terpeno em emulsões aquosas e formulações de terpeno encapsuladas

A estabilidade de terpeno foi avaliada pela observação de formulações de citral para a formação de um produto de oxidação colorido de amarelo. Como se observa na
5 coluna da direita nas Tabelas 5-8, emulsões de citral e YP de Baker encapsulados de citral tornaram-se de uma cor amarela progressivamente crescente com o tempo. Contudo, o encapsulação de citral em SAF Mannan™ aumentou a
10 estabilidade de citral como 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 e encapsulação de
15 terpeno em YP poderiam ser realizados em um nível de sólidos de Partículas de Levedura muito elevado (YP) para permitir extrusão direta da formulação carregada em um secador de leite fluidizado. A quantidade mínima de água para hidratar completamente as partículas de SAF Mannan™
20 foi determinada como sendo 3,53 g de água por g de sólidos. Isto define o volume hidrodinâmico (HV) ou capacidade de absorção de água das partículas. Neste nível de água as partículas de água possuem uma consistência de uma massa rígida que é tixotrópica, isto é, afinamento de
25 cisalhamento tipo maionese. A adição de água até 40% acima

do HV resulta em uma pasta fluída espessa. A reação padrão que foi utilizada nos exemplos acima foi realizada em 3 x HV de água.

Uma série de reações de carregamento de terpeno (L-carvona) foi realizada mantendo a razão de partícula:terpeno:Tween (1:0,44:0,04) constante e variando a quantidade de água no sistema do HV (3,53 g) para HV + 40% de água (4,92 g). Os controles foram o sistema de carregamento padrão que usa 3 X HV de água, reações apenas de partículas e apenas de terpenos. A seguir a incubação durante a noite, partículas das misturas foram avaliadas microscopicamente para terpeno livre e evidência de tomada de terpeno em partículas e para características de fluxo de material ao acessar o fluxo em tubos invertidos durante 15 minutos. Além disso, a presença de óleo livre foi acessada ao hidratar a mistura de reação com 5 X HV, fazendo um vórtice para obter uma dispersão completa de partículas e centrifugação para sedimentar o terpeno encapsulado de partícula. Os resultados são mostrados na Tabela 11 e Figs. 7 a 12. As Figs. 7 a 12 mostram os resultados de carregamento dos tubos que se seguem:

FIG. 7 - Tubo 3

FIG. 8 - Tubo 5

FIG. 9 - Tubo 6

FIG. 10 - Tubo 8

FIG. 11 - Tubo 10

FIG. 12 - Tubo 11

Tabela 11

<u>Tubo</u>	<u>SAF</u>	<u>Emulsão de</u>	<u>Peso</u>	<u>Água</u>	<u>Terpeno</u>	<u>Fluxo</u>
	<u>g</u>	<u>terpeno</u>	<u>(g)</u>	<u>(g)</u>	<u>livre</u>	

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	0,36	-	-
7	1	L-carvona	4,64	0,52	-	SI
8	1	L-carvona	4,64	0,7	-	Mod.
9	1	L-carvona	4,64	0,87	-	Elev.
10	1	L-carvona	4,64	1,05	-	Elev.
11	1	L-carvona	4,64	1,39	-	Elev.

Os resultados na Tabela 11 e Figs. 7 a 12 demonstram que carregamento e encapsulação de terpenos em partículas ocorreram em todas as razões de água avaliadas. Surpreendentemente, carregamento equivalente ocorreu mesmo quando a reação de carregamento se realizou em uma redução com a consistência de uma massa rígida que utiliza a quantidade mínima de água para hidratar as partículas. A ausência de terpeno livre foi observada microscopicamente (Figs. 7 a 12) e no nível baixo de terpeno nos sobrenadantes, conforme evidenciado por uma redução marcada na turvação do sobrenadante comparada ao controle apenas de terpeno.

Estes resultados estendem nosso entendimento das condições para carregar terpenos dentro de partículas de glucana ocas. A flexibilidade para utilizar um volume mínimo de água para hidratar as partículas durante o processo de carregamento permitirá carregamento dos terpenos sob condições em que a mistura de reação é uma consistência tipo massa maleável que utiliza misturadores

de massa de superfície limpos do tipo alimentar padrão. A consistência da mistura carregada de terpeno de sólidos elevados final é adequada para extrusão direta para formar macarrões e esferas para secagem de leite fluidizado.

5 Falicitações adequadas para aumentar a produção desta maneira exigiriam:

Homogeneizador Gaulin, ou equivalente para produzir emulsão de terpeno estável.

Tanque de mistura de massa de superfície limpo.

10 Extrusador.

Secador de leite fluidizado.

Exemplo 10 - Avaliação de um agente de hidrocolóide intersticial para auxiliar a dispersão em partículas de glucana ocas secas que encapsulam uma dispersão de
15 componente terpênico quando re-hidratado

O protocolo que se segue foi adotado para avaliar o efeito de um hidrocolóide intersticial para aumentar formulações de terpeno encapsulado de partícula de glucana oca seca para dispersar quando hidratado.

20 Partículas SAF Mannan™

Tween 80 a 0,1%

L-carvona

Goma xantana - 1% w/v em Tween 80 a 0,1%

O efeito de níveis de goma xantana sobre dispersão de
25 L-carvona encapsulado de partícula de glucana oca seca em água foi avaliado ao carregar L-carvona em SAF Mannan ao incubar 1,1 g de uma emulsão de L-carvona (razão de L-carvona:água: agente tensoativo de 0,75:0,3:0,05) com 1 g de SAF Mannan e 4,4 g de Tween 80 a 0,1% que contém 0-1% de
30 goma xantana conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12

<u>Tubo</u>	<u>SAF</u> <u>g</u>	<u>Emulsão de L-</u> <u>carvona (g)</u>	<u>Tween 80 a</u> <u>0,1% (g)</u>	<u>1% de</u> <u>xantana (g)</u>	<u>Observações</u> <u>visuais</u>
1	1	1,1	4,4	0	Caroços 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 Figs. 13 a 20 demonstram que a inclusão de um hidrocolóide de peso molecular elevado durante a secagem do terpeno de partícula encapsulada auxilia na hidratação e dispersão das micro-partículas em uma suspensão uniforme. Outros exemplos de tais agentes hidrocoloidais são maltodextrina, alginatos, ou similares.

Pode ser também válido incluir um revestimento de

esferas para aumentar a estabilidade dos terpenos carregados, e para propiciar uma liberação sustentada de terpeno.

Exemplo 11 - Avaliação de concentração inibitória mínima (MIC) de emulsões de terpeno, terpenos encapsulados de YP de Baker e SAF Mannan frescos e terpenos encapsulados de YP de Baker e SAF Mannan secos por congelamento contra *S. aureus*

Os resultados de um protocolo realizado para comparar a MIC de formulações de terpeno encapsuladas de partícula de glucana oca seca por congelamento versus fresca são mostrados abaixo na Tabela 13. Uma emulsão de terpeno única foi também testada e os resultados são mostrados para comparação.

Tabela 13 - MIC µg/ml Terpeno

Terpeno	Emulsão	Bakers		SAF Mannan	
		Fresco	Seco por congelamento	Fresco	Seco por congelamento
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 tiradas dos resultados acima foram:

o carregamento de terpeno para dentro de partículas

de glucana ocas parece alcançar a MIC de terpeno. Normalmente as emulsões de terpeno fresco são ~4 - 375 vezes menos potentes do que as formulações encapsuladas.

Os terpenos carregados em SAF Mannan™ têm desempenho ligeiramente melhor do que YP de Baker.

Composições de terpeno carregadas de forma fresca têm desempenho ligeiramente melhor do que composições secas por congelamento (pode haver alguma volatilização de terpenos provenientes de composições secas durante secagem por congelamento).

Terpenos em emulsões aquosas são estáveis por pelo menos 3 semanas.

Exemplo 12 - Eficácia de terpenos encapsulados em escala de planta piloto contra *S. aureus*.

Ensaaios antimicrobianos foram realizados com terpenos encapsulados e misturas produzidos nas escalas de planta piloto contra *S. aureus*. Ambas as amostras de terpeno encapsulado fresco e seco por congelamento contendo materiais demonstraram fortes atividades antimicrobianas. Os resultados são sumarizados na Tabela 14 abaixo.

Terpenos foram encapsulados em SAF Mannan™ em uma escala de 2,5 kg. Uma mistura de três terpenos (Geraniol, 275 g; Eugenol, 385 g; e timol, 440 gramas) foi dissolvida e homogeneizada com 100 g de Tween-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 tamanho de partícula e o homogeneizado foi incubado durante a noite em temperatura ambiente. Uma amostra do terpeno encapsulado foi removida e armazenada em temperatura ambiente. O terpeno encapsulado

restante foi em seguida congelado em bandejas e seco por congelamento. O pó de terpeno encapsulado seco por congelamento foi guardado e armazenado em temperatura ambiente.

5 **Tabela 14**

Material	MIC (ppm)
Ensaio de <i>Staphylococcus aureus</i>	
Controle de casca vazia de YGP	>2500
Planta piloto - fresca	100
Planta piloto - seca por congelamento	100

Na escala de planta piloto, ambas as amostras fresca e seca por congelamento foram igualmente potentes sobre uma base de terpeno em peso.

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

Exemplo 13 - Eficácia de terpenos encapsulados contra Micobactéria

15 Emulsões de terpeno foram preparadas como se segue:

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

c) L-carvona/eugenol - 2,25 g L-carvona e 2,25 g de Eugenol em 1,5 ml de Tween-80 a 3,3%.

20 d) Eugenol - 4,5 g de eugenol em 1,5 ml de Tween-80 a 3,3%.

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

f) Geraniol/mistura de timol - 2,25 g de geraniol e 2,25 g de timol em 1,5 ml de Tween-80 a 3,3%.

g) 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 durante a noite para encapsular os terpenos e misturas de terpeno. As formulações de terpeno encapsuladas foram congeladas e secas por congelamento e os pós triturados para um pó fino. Suspensões de terpenos encapsulados (25 mg/ml) e emulsões de terpeno não encapsuladas foram ensaiadas para atividade antibacteriana contra *Micobactéria*. Os resultados são estabelecidos na Tabela 15.

Tabela 15

Material	MIC (ppm)
<i>Ensaaios Micobacteriais</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 = (seco por congelamento)

15 Exemplo 14 - Atividade nematocidal de terpenos encapsulados

Preparações de paredes celulares de levedura que

encapsulam citral foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos acima. As partículas de glucana
 5 ocas continham 17,5% de citral, e as partículas estavam presentes nas preparações de teste em uma concentração de 1.000 ppm. Isto significa que terpenos estavam presentes de forma eficaz em uma concentração de 175 ppm.

1,0 ml de preparações de teste foi adicionado a 0,1 a 0,15 ml de água que contém nematóides root-knot. 1,0 de água foi adicionado aos nematóides como o controle.

10 Observações foram feitas conforme previamente descrito e a taxa de mortalidade avaliada (isto é, percentagem de morte) após 24 e 48 horas. Os resultados mostrados abaixo na Tabela 16 são uma média de 2 conjuntos de resultados.

15 **Tabela 16 - Atividade nematicídica de solução de terpeno encapsulado (17,5 % de citral a 1.000ppm).**

Tempo	Taxa de mortalidade	
	Teste	Controle
24h	45	17
48h	56	21

Os resultados demonstraram que partículas de glucana
 20 ocas que encapsulam terpenos são eficazes em matar nematóides *root-knot* (de nó de raiz) em uma concentração de partícula de 1.000 ppm, que corresponde a uma concentração de citral de apenas 175 ppm.

Sendo assim, partículas de glucana ocas que encapsulam terpenos parecem ser tão eficazes quanto terpenos em solução ou com agente tensoativo como
 25 nematicidas. A atividade nematicídica é retida apesar do terpeno sendo encapsulado dentro da partícula. Espera-se

que concentrações mais elevadas de terpenos dentro das partículas de glucana ocas, ou concentrações mais elevadas das partículas resultariam em uma taxa de mortalidade ainda mais elevada, como é o caso para terpenos em solução ou com
5 agente tensoativo.

Exemplo 15 - Propriedades fungicidas de terpenos encapsulados e não encapsulados

Os protocolos que se seguem foram realizados para avaliar as propriedades fungicidas de diversas combinações
10 de terpeno, e para comparar a eficácia de composições encapsuladas e não encapsuladas.

Avaliação de propriedades antifúngicas de formulação de terpeno diferente

Um ensaio de placa de micro-titulação foi utilizado
15 para avaliar a concentração inibidora mínima (MIC) de uma faixa de compostos de terpeno contra organismos patogênicos diferentes. O ensaio utilizado para cada organismo é descrito em detalhes posteriormente, porém características gerais importantes são como se segue.

20 O ensaio utiliza dois períodos de incubação para distinguir entre atividades estáticas (inibição de crescimento) e cídicas (mortalidade). O primeiro período de incubação permite avaliação de inibição de crescimento, porém não pode distinguir entre meramente prevenção de
25 crescimento e mortalidade das células. O propósito do segundo período de incubação é permitir tempo e nutrientes suficientes para que quaisquer células adormecidas e inabitadas que sobrevivem à exposição de terpeno proliferem. Quaisquer células que estiveram inabitadas por
30 efeitos fúngicos deveriam responder e crescer durante o

segundo período de incubação, embora células que foram mortas por exposição a terpenos não crescerão no meio fresco.

Experimentos de verificação iniciais foram realizados utilizando um total de 31 formulações de terpeno diferentes (Tabela 17). Estes experimentos foram repetidos utilizando um sub-conjunto de formulações de terpeno fortemente ativas (Tabela 18).

Uma combinação dos terpenos geraniol, eugenol e timol em uma razão de 2:1:2 encapsulados dentro de partículas de glucana foi também testada; esta amostra é denominada como YP_GET. Uma combinação de geraniol, eugenol e timol não encapsulados na mesma razão foi também testada para comparação com a forma encapsulada.

15 Ensaio MIC que utiliza *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae (5×10^5 células/ml em meio de crescimento YPD) foram adicionadas a cada poço de uma placa de micro-titulação 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 a estes poços. Alíquotas (100 µL) de formulações de terpeno diferente foram adicionadas à primeira fileira das colunas restantes e diluições de duas vezes em série foram realizadas ao transferir 100 µL de uma fileira para a próxima um total de 7 vezes. Finalmente, 100 µL foram descartados da última fileira a fim de garantir que todos os poços continham o mesmo volume. Placas de micro-titulação foram incubadas estaticamente durante a noite a 30°C.

30 Seguindo a incubação, placas foram marcadas para

inibição de crescimento (evidenciada por uma falta de turvação). A inibição de crescimento ($\geq 75\%$) foi visualmente confirmada por microscópio.

Uma vez que o MIC foi determinado para cada
5 formulação, as placas de micro-titulação foram centrifugadas e o meio gasto foi removido dos poços não turvos. As células foram suspensas novamente em meio fresco (100 μL) e as placas foram re-incubadas durante a noite a 30°C . Avaliação de inibição de crescimento foi realizada
10 conforme anteriormente.

Ensaio MIC que utiliza um inoculo misturado

As formulações de terpeno diferentes foram seriamente diluídas na placa de micro-titulação de 96 poços conforme descrito para *S. cerevisiae*. Agar de YPD fundido foi em
15 seguida adicionado aos poços, junto com 5 μL de inoculo misturado (preparado a partir de folhas de uva mofadas para uma concentração de 5×10^4 células/mL). As placas foram incubadas estaticamente por 24 horas em temperatura ambiente e o crescimento de esporos foi visualmente
20 avaliado por microscópio.

Devido ao uso de meio sólido, o segundo período de incubação em meio fresco não poderia ser realizado.

Ensaio de MIC que utiliza *Colletotrichum graminicola*

As formulações de terpenos diferentes foram
25 seriamente diluídas na placa de micro-titulação de 96 poços conforme descrito para *S. cerevisia*. *C. graminicola* (300 poços/esporos) foram adicionados aos terpenos diluídos e as placas foram incubadas estaticamente por 48 horas em temperatura ambiente. Germinação e crescimento de esporo
30 foram visualmente avaliados por microscópio.

Uma vez que o MIC foi determinado para cada formulação, as placas de micro-titulação foram centrifugadas e o meio gasto foi removido dos poços de crescimento inibidos. Os esporos foram re-suspensos em meio fresco (100 µL) e as placas foram re-incubadas durante a noite em temperatura ambiente. Avaliação de inibição de crescimento foi realizada conforme anteriormente.

Tabela 17 - MIC e valores de MIC fungicida Obtidos de verificação inicial de formulações de terpeno 31

	Formulação de Terpeno ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Micróbios Misturados		<i>Colletotrichum Graminicola</i>	
		MIC	MIC Cidal	MIC	MIC Cidal	MIC	MIC Cidal
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 ©	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	≤8	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	1000	≤12	NT	94	94
24	ECL	500	1000	≤12	NT	188	188
25	TCL	500	1000	23	NT	94	375
26	GETC	500	1000	125	NT	250	500
27	ETCL	500	1000	63	NT	125	125
28	GTCL	500	1000	125	NT	250	250
29	GECL	500	1000	≤16	NT	500	500
30	GETL	1000	1000	125	NT	500	250
31	GECTL	1000	1000	78	NT	625	625
	GET (razão de 2:1:2 em peso)	NT	NT	98	NT	78	156
	YP-GET (razão de G:E:T de 2:1:2 em peso) ^b	98	391	98	NT	20	20

NT, não testado; YP_GET, formulação de GET de levedura encapsulada.

^a combinações de terpeno foram misturadas em uma razão de 1:1 (w/w) a não ser que de outra forma indicado.

5 ^b MICs calculados por teor de terpeno.

Tabela 18 - Ensaio repetido para determinar MIC e valores de MIC fungicidas

Formulação de terpeno ^a (por N°.)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Micróbios misturados isolados provenientes de folhas de uva mofadas ^b		<i>Colletotrichum graminicola</i>	
	MIC	MIC Cidal	MIC	MIC Cidal	MIC	MIC Cidal
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 de 2:1:2, w/w) ^c	98	195	NT	NT	39	156

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

NOTA: as amostras foram ensaiadas em duplicata. Se valores diferentes foram obtidos entre amostras duplicadas, o valor mais elevado foi apresentado. Nenhuma amostra duplicada
5 diferiu mais do que uma diluição de 2 vezes.

^a Combinações de terpeno foram misturadas em uma razão de 1:1 (em peso) a não ser que de outra forma indicada.

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

10 ^c MICs calculados por teor de terpeno.

Inóculo misturado

Utilizar um inóculo misturado apresenta diversos problemas. A variabilidade em teor de esporos entre as preparações resulta em capacidade de reprodução de
15 interensaio insuficiente, e o crescimento de organismos de contaminação impede o registro de germinação de esporos. Espécies de levedura unicelulares são especificamente problemáticas em mascarar crescimento de esporos. Embora dados precisos não pudessem ser obtidos a partir deste
20 ensaio, um efeito inibidor de terpenos foi observado.

A identificação de esporos foi mais fácil durante registro do ensaio repetido do que durante o ensaio de registro inicial na medida em que um número maior de esporos foi utilizado (aproximadamente 50/poço versus
25 aproximadamente 10/poço). Por conseguinte, dados obtidos durante o ensaio repetido podem propiciar uma estimativa mais confiável de MIC.

Colletotrichum graminicola

Os valores de MIC normalmente mais elevados obtidos a
30 partir do ensaio repetido comparados ao ensaio de registro

inicial podem ser devidos a:

- uso de soluções de terpeno com uma semana
- uso de esporos preparados de forma fresca, que possuíam uma viabilidade mais elevada do que aqueles utilizados no ensaio de registro inicial e podem por conseguinte ser mais difíceis de matar.

Comparação de formulações de terpeno como emulsões livres com as mesmas formulações de terpeno quando encapsulados em partículas de glucana ocas: ensaios de MIC de *Saccharomyces cerevisiae*

O meio de crescimentos de YPD (100 µL) foi adicionado a cada poço de uma placa de micro-titulação de 96 poços e alíquotas de formulações de terpeno diferentes foram adicionadas à primeira fileira, fornecendo um volume total de 200 µL nesta fileira. Uma coluna foi designada como um controle apenas de célula e nenhum terpeno foi adicionado a estes poços. Diluições de 2 vezes em série foram realizadas ao transferir 100 µL de uma fileira para a próxima um total de 7 vezes. Finalmente, 100 µL foram descartados da última fileira a fim de garantir que os poços contivessem o mesmo volume. *S. cerevisiae* (5×10^5 células/mL em meio de crescimento de YPD) foi em seguida adicionado a cada poço em alíquotas de 100 µL, e a absorção em 620 nm (A_{620}) foi medida para cada poço que utiliza um leitor de placa de micro-titulação. Placas de micro-titulação foram incubadas estaticamente durante a noite a 30°C.

A seguir à incubação, o A_{620} foi medido novamente e as placas foram registradas por inibição de crescimento ($\geq 75\%$). A inibição de crescimento foi visualmente

confirmada por microscópio.

Para as emulsões de terpeno livre, uma vez que o MIC tenha sido determinado para cada formulação, as placas de micro-titulação foram centrifugadas e o meio gasto foi
5 removido dos poços de crescimento inibido. As células foram re-suspensas em meio fresco (100 µL) e as placas foram re-incubadas durante a noite a 30°C. Avaliação de inibição de crescimento foi realizada conforme anteriormente.

Os resultados de MIC e MIC fungicida estão resumidos
10 na Tabela 19.

Resultados

Tabela 19 - Valores de MIC e MIC fungicidas obtidos do registro de 31 formulações de terpeno contra *Saccharomyces cerevisiae*.

Formulações de terpeno ^a (No. de Referência)	Formulações de levedura encapsulada ^{b,c}		Emulsões de terpeno livre	
	MIC	MIC Cidal	MIC	MIC Cidal
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
GECL (29)	125	NT	125	125
GETL (30)	122	NT	125	250
GECTL (31)	120	NT	125	250
		NT		
GET (razão de 2:1:2, em volume)	125 ^d	NT	125	250
YP-GET (razão de G:E:T de 2:1:2, em volume)	125	NT	125 ^c	250 ^c
YP-ETC (razão de E:T:C de 2:1:2, em volume)	125	NT	125 ^c	250 ^c

NT, não testado; YP-GET, formulação de GET de levedura

encapsulada; YP-ETC, formulação ETC de levedura encapsulada.

^a Combinações de terpeno foram misturadas em uma razão de 1:1 (w/w) a não ser que de outra forma indicada.

5 ^b formulações de levedura encapsulada a não ser que de outra forma indicada.

^c MICs calculados por teor de terpeno.

^d formulação de emulsão não encapsulada.

10 Para ambas as emulsões de terpeno e terpenos de levedura encapsulados, MICs foram normalmente ≤ 125 ppm, com as formulações mais ativas que inibem crescimento a ~ 60 ppm. Valores de MIC obtidos para emulsões de terpeno foram similares àqueles obtidos para suas formulações de levedura encapsuladas respectivas. Quando valores diferentes foram
15 obtidos, os mesmos apenas diferiram por aproximadamente uma diluição de 2 vezes.

Muitas das emulsões de terpenos livres foram fungicida no MIC inibidor de crescimento, com a maioria mostrando atividade fungicida em uma concentração de 2
20 vezes mais elevada.

Estes resultados demonstraram que terpenos encapsulados em partículas de glucana são pelo menos tão eficazes em matar fungos quanto formas não encapsuladas.

Além disso as composições encapsuladas utilizadas
25 poderiam ter reduzido potência devido a terem sido armazenadas por 45 dias a 4°C e terem um teor de terpeno ideal de $\sim 4\%$ em volume.

O ensaio para determinar atividade fungicida envolve uma etapa de centrifugação, que tenta separar as células
30 microbianas de qualquer terpeno residual no meio de

crescimento ao produzir uma esfera de células na parte inferior do poço. Esta esfera é em seguida re-suspensa em meios frescos e incubada por uma segunda vez na ausência de terpeno. Contudo, a etapa de centrifugação não pode
5 discriminar entre células microbianas e partículas de levedura, por conseguinte quando são utilizados terpenos de levedura não encapsulados, a esfera de células também conterá partículas de levedura carregadas em terpeno. Como resultado, ambas as partículas de levedura e as células
10 microbianas são em seguida re-suspensas no meio fresco.

Não se considera que esta questão de metodologia afete os resultados obtidos nos experimentos descritos acima pelas razões que se seguem.

Em experimentos anteriores, emulsões de terpeno foram
15 utilizadas ao invés de partículas de levedura carregadas com terpeno e atividade fungicida foi claramente mostrada.

Terpenos encapsulados são liberados por difusão, e em equilíbrio constante entre a concentração de terpenos encapsulados e a concentração de terpenos liberados no meio
20 circundante é rapidamente alcançado. Sendo assim, seguindo a centrifugação e re-suspensão em meio fresco, a concentração de terpeno liberado no meio de crescimento provavelmente está bem abaixo daquela exigida para atividade inibidora de crescimento.

25 Não houve crescimento quando os conteúdos do poço de MIC fungicida foram colocados sobre meio de crescimento de Agar sólido. Quando colocado sobre meio de crescimento sólido, a difusão de qualquer terpeno residual através do grande volume da placa de Agar resulta em uma concentração
30 de terpeno local que é muito baixa para provocar inibição

de crescimento. A falta de crescimento dos conteúdos do poço MIC fungicida por conseguinte deve ser devido à atividade fungicida inicial. Em contraste, quando um MIC foi obtido que fosse inferior ao MIC fungicida e os conteúdos do poço MIC foram colocados sobre meio de crescimento de Agar sólido, foi observado crescimento, indicando um efeito fungicida.

Exemplo 16 - Preparação de composições de terpeno encapsulado para testes de campo

10 O propósito do protocolo que se segue foi encapsular uma composição de terpeno dentro de partículas de glucana ocas para testes de campo subseqüentes.

Materiais:

Timol (fornecido por Corporação Alpha-Gamma)
 15 Eugenol (fornecido por Corporação Alpha-Gamma)
 Geraniol (fornecido por Corporação Alpha-Gamma)
 1% de Tween-80 (fornecido por Corporação Alpha-Gamma)
 Partículas de Parede Celular de Levedura
 Goma Xantana.

20 As partículas de parede celular de levedura foram obtidas por Biorigin (São Paulo, Brasil) sob o nome comercial de Nutricell MOS 55, e foram fabricadas por Açucareira Quatá S.A., Usina Quatá, Quatá - São Paulo - Brasil - CEP 19780-000. As partículas são um extrato de
 25 parede celular seco de pulverização de *S. cerevisiae* e são um pó que flui livre de cor bege claro até uma cor bronzeada.

Protocolo: o protocolo que se segue foi adequado para 1 kg de partículas, porém pode ser simplesmente escalado
 30 até para maior produção.

- Preparar a mistura de terpeno - misturar 375 gramas de Geraniol + 525 gramas de Eugenol + 600 gramas de timol e agitar em um frasco de vidro.

5 - Preparar 6,2 L de 1% de Tween 80 ao misturar 62 gramas de Tween 80 em 6,2 L de água em balde branco de 2 galões. Misturar para formar solução.

- Adicionar 6,2 gramas de Goma Xantana à solução de Tween e agitar para dissolver.

10 - Preparar emulsão de terpeno ao misturar 1,5 kg de mistura de terpeno + 6,2 L de 1% de Tween 80/0,1% de Goma Xantana em balde branco utilizando misturador politron.

- Adicionar 1.000 gramas de partículas de parede celular de levedura - misturar utilizando misturador de tinta para formar suspensão uniforme.

15 - Adicionar a emulsão de terpeno da etapa 4 às partículas de parede celular de levedura enquanto mistura para formar uma fina consistência tipo maionese.

- Despejar a mistura de terpeno dentro de latas e incubar durante a noite.

20 **Resultados:** geraniol, eugenol e timol encapsulados em partículas de glucana ocas foram obtidos como uma pasta. A pasta foi facilmente convertida em um pó seco por técnicas de secagem de pulverização convencionais. A pasta é a composição "líquida" mencionada nos protocolos que se
25 seguem, e o "pó" é a forma seca de pulverização.

Exemplo 17 - Testes de campo de Composição de Terpeno encapsulado sobre Míldio brando

Em uvas, míldio brando é provocado pelo fungo *Plasmopara viticola*, que infecta vinhedos globalmente e
30 pode provocar perdas devastadoras para vinicultores em

termos de produção de plantação e qualidade de vinho. O fungo ataca as frutas e partes todas verdes da vinha, fazendo com que as folhas murchem e as flores e frutos apodreçam. A doença se manifesta como manchas amarelo-esverdeadas ou amarelo-pálido sobre a superfície superior de folhas, com crescimento de fungos tipo algodão, branco-acizentados, densos que cobrem o lado inferior das lesões da folha. Os frutos também podem ser cobertos com o míldio brando e, dependendo do tempo de infecção, podem tornar-se marrons e macios ou podem não amaciar de forma alguma. Míldio brando é espalhado através da dispersão de esporos pelo vento e chuva, e exige condições úmidas para infecção. É especificamente problemático em ambientes com unidade elevada. Medidas preventivas são recomendadas para manutenção da doença, com aplicações mais cedo de fungicidas seguidas por aplicações repetidas em intervalos adequados. A resistência surgiu a alguns tratamentos, e embora o desenvolvimento de resistência possa ser minimizado ao alternar o uso de fungicidas diferentes, a mesma permanece um problema.

O propósito deste teste era investigar a eficácia da formulação de terpeno encapsulado do Exemplo 16 (YGP-GET) fornecido como um líquido ou formulação em pó (pulverização seca), para a prevenção de míldio brando em uvas.

Quatro blocos adjacentes, cada um cobrindo 1.000m², foram identificados no local 20 no vinhedo Kir-Yianni.

Kir-Yianni é um vinhedo de 350.000m² em uma elevação de 300 m. É limitado por uma floresta de carvalhos mista no norte e oeste, e pomares de mirantes e vinhedos ao sul e este.

Todos os quatro blocos foram tratados com produtos múltiplos antes da aplicação da formulação de terpeno. Em 26 de junho de 2004, dois destes quatro blocos foram pulverizados com a formulação de pó de terpeno em uma dose tanto de 0,5 g/L quanto 2 g/L (vide ilustração esquemática na Figura 21). Um terceiro bloco foi tratado com mistura de Bordeaux convencional mais enxofre passível de ser umedecido, e o bloco restante foi deixado não tratado. As vinhas em cada bloco foram monitoradas por sinais de míldio brando durante a semana seguinte.

Quatro blocos adjacentes adicionais cada um cobrindo 1.000m², foram identificados no local 18 no vinhedo de Kir-Yianni. Todos os quatro blocos foram tratados com produtos múltiplos antes da aplicação da formulação de terpeno. Em 26 de junho de 2004, dois dos quatro blocos foram pulverizados com a formulação líquida de terpeno em uma dose tanto de 1 g/L quanto 4 g/L (Figura 21) (nota: 1 g da formulação líquida de terpeno possui um volume de 1 ml). Dos dois blocos restantes, um foi deixado não tratado e um foi pulverizado com Mikal®, um tratamento convencional para míldio brando, em 28 de junho de 2004. As vinhas em cada bloco foram monitoradas por sinais de míldio brando durante a semana seguinte.

Para ambos os locais, o produto de terpeno foi aplicado em uma taxa de 120.000 L/km².

Os estágios de crescimento que se seguem das uvas foram registrados:

- surgimento de botões, 26 de março de 2004
- floração, 1 de junho de 2004
- mudança de cor, 6 de agosto de 2004

As aplicações de estudo assumiram lugar pré-mudança de cor.

A estação de crescimento de 2004 foi excepcionalmente tardia e foi completamente úmida. A pressão de doença de míldio brando foi extremamente elevada, níveis *botrytis* foram elevados, e a pressão de míldio em pó foi moderada. Tanto as formulações de YGP-GET em pó quanto líquidas foram armazenadas em temperatura ambiente. Nenhuma condição de armazenamento especial foi utilizada.

Detalhes de Produtos Comparativos

Teste de formulação em pó: mistura de Bordeaux, fabricado por Manica Spa, Itália, embalado na Grécia por Moscholios Chemicals SA; enxofre passível de umedecimento.

Teste de formulação líquida: Mikal® (fosetyl-al 50%, folpet 25%), fabricado por Bayer CropScience, distribuído na Grécia por Bayer Hellas AS.

Os produtos comparadores foram aplicados como se segue:

Uma aplicação antes de surgimento de botões em uma dosagem de 15 g/L seguida por mais duas aplicações por ano em uma dosagem de 6,5 g/L. Uma taxa de pulverização de 100.000 L/km² foi utilizada para todos as três aplicações.

Teste de formulação em pó: mistura de Bordeaux (2 g/L) e enxofre passível de umedecimento (2,2 g/L) foram aplicados em 26 de junho de 2004.

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

As vinhas foram visualmente examinadas para sintomas de míldio brando. O ataque da doença foi marcado por uma média de dois lugares oleosos por folha. Tratamentos que

impedem o aparecimento de lugares adicionais foram considerados para propiciar proteção eficaz contra míldio brando.

Resultados

5 Formulação de pó de YGP-GET (pulverização seca)

O tratamento convencional de mistura de Bordeaux propiciou boa proteção contra míldio brando. Sintomas suaves de míldio brando foram observados na vinhas de controle. A concentração de produto de terpeno de 0,5 g/L
10 não propiciou proteção, e a concentração de produto de terpeno de 2 g/L propiciou apenas proteção ligeiramente melhor do que o controle. Nota: a pressão de doença neste local foi muito baixa por causa do tratamento pesticida recente.

15 Foram encontradas dificuldades em dissolver a formulação em pó na medida em que a mesma era muito fina, resultando em dispersão no ar. Isto pode ter afetado adversamente a eficácia do produto.

Formulação líquida de YGP-GET

20 Quando administrado em uma dose de 4 g/L, o produto de terpeno propiciou excelente proteção contra míldio brando em dossel exposto. Nenhuma proteção foi propiciada pela dosagem de 1 g/L. Sintomas sérios de míldio brando foram observados no bloco de controle.

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

Discussão

Míldio brando pode provocar perdas devastadoras para vinicultores por causa de seu efeito sobre produção de
30 plantação e qualidade de vinho. A manutenção da doença

incide na prevenção porque, uma vez estabelecida, a infecção pode rapidamente se espalhar. No local pulverizado com a formulação em pó, YGP-GET não exibiu eficácia em dosagem inferior (0,5 g/L), e a dose de 2 g/L foi menos
5 eficaz do que o tratamento convencional. Neste local, as aplicações de pesticidas recentes resultaram em pressão de doença baixa, que pode ter limitado a eficácia aparente do tratamento de terpeno. Contudo, foi considerado que uma dosagem inferior a 2 g/L do produto de terpeno foi
10 inadequada.

No local pulverizado com a formulação líquida, proteção excelente do dossel exposto foi propiciada pelo nível de dose mais elevada de 4 g/L. Crescimento vegetativo excessivo neste local resultou em tratamento mais eficaz
15 dos ramos mais externos, mais novos comparado com o crescimento dos mais velhos no dossel interno. Cobertura foliar completa pelo produto de terpeno é útil, na medida em que o tratamento não é sistemático. Estimou-se que um aumento de aproximadamente 30% sobre o volume utilizado para
20 tratamentos sistemáticos convencionais alcançaria boa cobertura que utiliza o tratamento de terpeno.

Conclusões:

A aplicação foliar de formulação líquida de YGP-GET foi altamente eficaz em controlar míldio brando em uma
25 concentração de 4 g/L. As concentrações inferiores a 0,5 g/L de pó e 1 g/L de líquido não foram eficazes.

Exemplo 18 - Testes de Campo de Composição de Terpeno Encapsulado em Míldio em pó

Míldio em pó de uvas é provocado pelo fungo *Uncinula*
30 *necator*, e provoca reduções em crescimento de vinha,

qualidade de fruta e endurecimento de inverno de vinhas. Em uvas para vinho, um nível de infecção de apenas 3% de frutos pode afetar a qualidade do vinho. A doença é caracterizada por chumaços branco-acinzentados pequenos de crescimento de fungo que se alarga em um revestimento em pó, branco sobre as folhas. O crescimento de fungo pode também ocorrer sobre os frutos, que podem se partir. Em contraste com míldio brando, que exige condições de umidade quente, míldio em pó pode ser um problema em estações de crescimento mais secas, na medida em que o mesmo favorece áreas sombreadas com umidade, porém não condições de clima chuvoso. Medidas preventivas são recomendadas para manutenção de míldio em pó, com aplicações precoces de fungicidas seguidas por aplicações repetidas em intervalos apropriados.

Este estudo objetiva investigar a eficácia de aplicação da composição de YGP-GET para a prevenção de míldio em pó em uvas.

Três blocos adjacentes, cada um cobrindo 1.000m², foram identificados no local 18 no vinhedo de Kir-Yianni. Em 19 de julho de 2004, um dos três blocos foi pulverizado com a formulação líquida de YGP-GET em uma dose de 2 m/L e um foi deixado sem tratar. O bloco restante foi pulverizado com o tratamento convencional de Equesion (2,5 g/L), Alliete (0,9 g/L) e Punch (0,075 mL/L) (vide Fig. 22). As vinhas em cada bloco foram monitoradas para sinais de míldio em pó durante a semana seguinte.

Três blocos adjacentes, cada um cobrindo 1.000m², foram identificados no local 20 no vinhedo de Kir-Yianni. Em 20 de julho de 2004, um dos três blocos foi pulverizado

com a formulação líquida YGP-GET em uma dose de 2 mL/L e os dois blocos restantes foram deixados não tratados (vide Fig. 22). As vinhas em cada bloco foram monitoradas para sinais de míldio em pó durante a semana seguinte.

5 Em ambos os locais, os locais tinham sido previamente tratados com produtos múltiplos, incluindo uma aplicação anterior de produto de terpeno.

Todos os tratamentos de terpeno foram aplicados em uma taxa de 120.000 L/km² para garantir cobertura completa.

10 Os estágios de crescimento das uvas que se segue foram registrados

- surgimento de botões, 26 de março de 2004
- floração, 1 de junho de 2004
- mudança de cor, 6 de agosto de 2004

15 As aplicações de estudo assumiram lugar pré-mudança de cor.

A estação de crescimento de 2004 foi excepcionalmente tardia e foi completamente úmida. A pressão de doença de míldio brando foi extremamente elevada, níveis *botrytis* foram elevados, e a pressão de míldio em pó foi moderada.

Detalhes de produtos comparativos

Nenhum produto comparativo foi utilizado no local 20. O tratamento comparativo no local 18 é detalhado abaixo.

Punch® (flu silazole 40%), DuPont.

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

Detalhes de produtos adicionais

Nenhum produto adicional foi utilizado no local 20.

30 Os produtos adicionais utilizados no local 18 são

detalhados abaixo.

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

Alliete (fosetyl-al 80%)

5 Em 19 de julho de 2004, Equesion (2,5 g/L) e Alliete (90,9 g/L) foram aplicados como tratamentos preventivos para míldio brando. A dose foi determinada de acordo com as instruções do fabricante.

10 Os produtos comparativos e adicionais representam tratamentos convencionais no calendário de manutenção de pestes integrado.

Vinhas foram visualmente examinadas para sintomas de míldio em pó.

Resultados:

15 Local 18

Aproximadamente 20% dos pedúnculos e galhos no bloco de controle ficaram negros, indicando infecção moderada por míldio em pó. Em ambos o bloco de tratamento convencional e o bloco tratado por terpeno, todos os galhos e arbustos 20 ficaram verdes, indicando que foi propiciada proteção adequada.

Local 20

Não foi observada nenhuma evidência de infecção por míldio em pó em qualquer dos blocos.

25 Observações adicionais

No final da estação de crescimento, os blocos nos locais 18 e 20 normalmente mostraram menos tensão devido à doença do que o resto do vinhedo.

30 Infecções por míldio em pó podem provocar perdas consideráveis para cultivadores através da redução em

crescimento de vinha, qualidade de fruta e endurecimento de inverno de vinhas. Além disso, a qualidade do vinho pode ser afetada por um nível de infecção tão pequeno quanto 3% dos frutos. A manutenção da doença foca-se na prevenção porque, uma vez estabelecida, a infecção pode ser espalhar rapidamente. Neste estudo, a aplicação de produto de terpeno YGP-GET no local 18 efetivamente impediu infecção por míldio em pó, e o nível de controle exibido pelo produto de terpeno foi comparável àquele propiciado pelo tratamento convencional. Os resultados do local 20 são inconclusivos, entretanto, devido à falta de infecção por míldio em pó. Esta falta de infecção provavelmente é devida à aplicação extensiva de pesticidas antes do estudo, que resulta em pressão de doença baixa.

O nível inferior de tensão devido à doença nos locais 18 e 20 sugere que o tratamento de terpeno precoce aplicado nestes locais pode ter sido benéfico em controle de infecção em longo prazo.

Conclusões:

YGP-GET efetivamente impediu a infecção por míldio em pó, com um nível comparável de controle por aquele propiciado pelo tratamento convencional.

Exemplo 18 - Testes de Campo adicionais de composição de terpeno encapsulado em míldio em pó

O estudo objetivou investigar ainda a eficácia de YGP-GET para o tratamento de míldio em pó em uvas de mesa Sem Sementes Grimson.

Um lote de 1.000m² no vinhedo de Tsigaras (aproximadamente 80 km ao sul do vinhedo de Kir-Yianni) foi inadvertidamente deixado sem tratamento durante uma

aplicação de Cisteína em 1 de julho de 2004. As vinhas neste lote subseqüentemente mostraram sintomas severos de míldio em pó nas folhas, galhos e uvas. Em 12 de julho de 2004, o lote não tratado foi pulverizado com 3 ml/L de
5 formulação de YGP-GET líquida em uma taxa de 120.000 l/km², e o resto do vinhedo foi pulverizado com o produto comparador Rogana. As vinhas foram avaliadas para sintomas de míldio em pó após 24 horas.

As vinhas foram treinadas em um sistema de treliça de
10 lira elevado.

Detalhes de Produto Comparador

Rogana (fenbuconazol 5%, binocap 16%), fabricado por BASF (BASF Agro Hellas S.A., Atenas, Grécia)

Em 12 de julho de 2004, Rogana foi aplicado ao
15 vinhedo de Tsigaras como um tratamento para míldio em pó. A dose foi determinada de acordo com as instruções do fabricante.

As vinhas foram visualmente examinadas para sintomas de míldio em pó.

Resultados

Sintomas severos de míldio em pó ficaram evidentes ante da aplicação de YGP-GET. Apenas 24 horas após a aplicação de YGP-GET, a floração branca do míldio em pó tornou-se preta, indicando atividade antifúngica efetiva.
25 Como a doença foi efetivamente interrompida neste momento, nenhum tratamento adicional foi aplicado. YGP-GET mostrou eficácia comparável ao tratamento adicional.

Discussão:

Neste estudo, uma infecção por míldio em pó
30 estabelecida foi tratada rápida e efetivamente utilizando

YGP- GET. Apenas 24 horas após a aplicação, a infecção por míldio em pó anteriormente severa foi interrompida por aplicação do produto de terpeno, com eficácia comparável ao tratamento convencional.

5 Os dados preliminares obtidos a partir deste estudo sugerem que o YGP-GET pode ser eficaz ao tratar infecções fúngicas estabelecidas além de mostrar capacidade preventiva.

Exemplo 19 - Testes de campo adicionais de composição

10 de terpeno encapsulado sobre míldio em pó

Fundamentos e Racionalização

No teste atual, o uso de YGP-GET foi investigado como parte de um programa experimental do vinhedo da Tasmânia (vinhedo Frogmore Creek, Hathaway Trading Pty Ltd., caixa 15 postal 187, Richmond TAS 7025, Austrália) para controlar míldio em pó utilizando produtos orgânicos. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia em curto prazo da aplicação de YGP-GET no controle orgânico de míldio em pó em vinhedos de Chardonnay.

20 Neste teste vinhedos (variedade Chardonnay) foram tanto tratados com produto de terpeno YGP-GET quanto deixados não tratados (controle) em 7 de fevereiro de 2005. Embora suprimido por diversos tratamentos orgânicos anteriores, a severidade pré-teste de míldio em pó estava 25 em um nível considerado comercialmente não aceitável e foi equivalente nos 6 lotes de tratamento ativo e 6 lotes de controle. O estágio da plantação foi de aproximadamente E-L 33-34 (pré-mudança de cor).

YGP-GET (4 mL/L) (formulação líquida) foi 30 pulverizado sobre 6 lotes de Chardonnay, que tinham sido

tratados anteriormente com leite. Seis lotes de Chardonnay serviram como controles não tratados, porém os mesmos tinham sido tratados anteriormente com óleo/soro de leite. O número de vinhas por lote foi normalmente 7.

- 5 Detalhes da composição do YGP-GET utilizado neste protocolo são fornecidos na Tabela 20.

Tabela 20 - Formulação de Lotes Utilizados no Presente Estudo

Detalhes de mistura de material cru	Peso em kgs.	% em peso
Geraniol	146,55	6,88
Eugenol	73,28	3,44
Timol	146,55	6,88
Partículas de levedura	327,12	15,35
Xantana	1,44	0,07
Polisorbato	1,44	0,07
Água	1.434,48	67,32
TOTAL	2.130,86	100,00

- 10 A severidade de míldio em pó foi avaliada 3 dias antes do tratamento de terpeno e novamente 3 dias pós-tratamento. Em cada lote, 20 punhados de uvas foram selecionados aleatoriamente (10 punhados por lado de painel), e a severidade da doença foi estimada como a área de percentagem dos punhados cobertos com colônias de míldio
- 15 ativas. Nenhuma avaliação adicional foi possível porque o cultivador pulverizou subsequente a área de teste inteira com enxofre e um adjuvante de pulverização à base de óleo vegetal (Óleo Synertrol Horti).

Área/número de plantas a serem tratadas

Produto de teste: YGP-GET (4 mL/L) a ser aplicado a 6 lotes de Chardonnay (total de aproximadamente 42 vinhas), que tinham sido tratados previamente com leite.

- 5 Controle: nenhum tratamento foi aplicado a 6 lotes de Chardonnay (total de aproximadamente 42 vinhas) a serem utilizados como controle, porém os mesmos tinham sido tratados anteriormente com óleo/soro de leite.

Métodos de cultivo

- 10 Vinhas de *Vitis vinifera* (Chardonnay) no bloco B2; posicionamento de esguicho vertical com latas arqueadas.

Arranjo de cultivo

- 15 Espaçamento: distância de 2,5 m entre fileiras e 1,25 m entre vinhas (dentro da fileira), com 3.200 vinhas por hectare. A orientação da fileira foi norte para sul.

Densidade de dossel

- 20 O método de ponto-quadrado foi utilizado para caracterizar a densidade de dossel pré-teste das vinhas de Chardonnay (Tabela 21). Foram tomadas medições em 13 de janeiro de 2005 ao selecionar seções representativas do dossel dentro dos lotes de Chardonnay que anteriormente tinham sido tanto tratados com enxofre quanto deixados não tratados. Dez medições foram feitas em cada um dos 6 lotes de cada tratamento anterior (isto é, um total de 60
- 25 medições para os lotes tratados com enxofre e 60 medições para os lotes de controle não tratados). Além disso, o comprimento e número de nós sobre 3 esguichos superiores (por lote) foram medidos.

Tabela 21 - Densidade de dossel pré-teste das vinhas de
30 Chardonnay

Tratamento anterior	Espaços (%)	Número de camada de folhas (LLN)	Folhas interiores (%)	cachos interiores (%)	Número médio de nós	Comprimento médio de esgui cho (cm)
Não-tratado	12	1,5	22	26	21	110
Enxofre	5	2,0	27	40	21	104
Valores ideais	20-40%	≤1,0-1,5%	<10%	<40%	NA	NA

NA, não aplicável.

Condições gerais

O tratamento anterior dos lotes com materiais experimentais suprimiu míldio em pó em comparação ao controle não tratado. Contudo, o nível de míldio em pó foi considerado comercialmente inaceitável, embora equivalente nos lotes tratados tanto com leite como com óleo/soro de leite.

Método de aplicação, dose e regime

O tratamento de YGP-GET (4mL/L) foi aplicado em 7 de fevereiro de 2005 com uma pistola manual conectada a um carretel de mangueira e bomba montados sobre a bandeja plana de um veículo utilitário. A pulverização foi propagada com uma pressão de bomba de 1.500-1.600 kPa (200-230 psi), que administra aproximadamente 63 mL/segundo. O volume de pulverização padrão para tratamentos convencionais (aproximadamente 90.000 L/km²) foi utilizado.

A severidade de míldio em pó, estimada como a área

(%) dos punhados de uva cobertos com colônias de míldio ativas, foi avaliada para 20 punhados selecionados aleatoriamente dentro de cada lote (10 punhados por painel lateral). A severidade da doença foi avaliada em 4 de fevereiro de 2005, 3 dias antes da aplicação do tratamento de TGP-GET, e novamente em 10 de fevereiro de 2005, 3 dias após aplicação de terpeno.

Dados foram transformados utilizando transformação de arco-seno para obter separações médias.

10 Resultados

Antes do tratamento, a severidade média de míldio em pó sobre punhados de uva Chardonnay nos 6 lotes a serem tratados com terpeno (20,4%) foi similar àquela nos 6 lotes de controle (23,2%, Tabela 22). Análise estatística baseada em transformação arco-seno destes dados verificou que não houve nenhuma diferença significativa em severidade de doença antes do tratamento (Tabela 23).

Três dias após tratamento, a severidade de meio de míldio em pó foi de 23,8% sobre os punhados tratados com YGP-GET versus 37,8% sobre os controles (Tabela 22). A transformação arco-seno destes dados mostrou uma diferença estatisticamente significativa em favor dos punhados de uva tratados com terpeno, que possuíam uma área menor coberta com colônias de míldio ativo ($p = 0,058$; Tabela 23).

25 Tabela 22- Severidade média de míldio em pó (%) sobre punhados de Chardonnay antes e depois de tratamento com YGP-GET.

Tratamento	Severidade média	
	Em 4 de fevereiro de 2005	Em 10 de fevereiro de 2005
aplicado em 7 de fevereiro de 2005		

YGP-GET	20,4	23,8
Nenhum	23,2	37,8

Tabela 23 - Separação estatística de tratamentos que segue transformação arco-seno de dados

Tratamento aplicado em 7 de fevereiro de 2005	Severidade média (SEM)	
	Em 4 de fevereiro de 2005	Em 10 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 df= 10 p=0,726 Teste de dois lados: diferença não significativa	t= 1,72 df= 10 p=0,058 Teste de um lado: não tratado > tratado

Discussão:

Infecção de vinhedos com míldio em pó pode provocar
 5 perdas consideráveis a cultivadores através de efeitos
 prejudiciais sobre crescimento e endurecimento de vinhas,
 bem como sobre a qualidade da fruta e do vinho. Em vinhedos
 organicamente administrados, cultivadores estão procurando
 por alternativas para tratamentos tais como enxofre
 10 elementar.

Este estudo investigou a eficácia de formulações de
 terpeno encapsulado (4 mL/L) como uma formulação líquida em
 controlar míldio em pó em um vinhedo orgânico na Tasmânia,
 Austrália. Enquanto outros tratamentos experimentais foram
 15 utilizados tão pouco quanto 3 semanas antes da aplicação de

terpeno, o nível de infecção de míldio em pó ainda era comercialmente inaceitável. Três dias após tratamento de vinhas de Chardonnay com YGP-GET, a severidade de míldio em pó em uvas tratadas foi significativamente inferior àquela em controles não tratados. Enquanto a severidade de infecção em controles não tratados piorou durante os 6 dias entre pré- e pós-avaliações de tratamento, permaneceu estacionária em vinhas tratadas. Por conseguinte, YGP-GET pareceu ter desacelerado a taxa de aumento de doença em punhados de uvas que possuíam colônias bem estabelecidas de míldio em pó esporulado antes do tratamento. Presumivelmente, a expansão da colônia foi inibida, embora colônias existentes continuaram a esporulação em algum grau. Mais avaliações de eficácia em longo prazo não foram possíveis porque o cultivador pulverizou subsequente a área de teste inteira com enxofre.

Estes resultados encorajadores demonstraram a eficácia de YGP-GET em controlar míldio em pó em vinhedos.

Exemplo 20 - Testes de campo de composição de terpeno encapsulado sobre Botrytis

Apodrecimento de punhado de Botrytis de uvas é provocado por *Botrytis cinerea*, um fungo comum que pode provocar sérias perdas em produção de frutas. Os frutos são o local predominante de infecção, embora a doença possa também afetar floração e folhas. Inicialmente, frutos infectados parecem macios e aguados, e podem tornar-se cobertos com fungo cinza que cresce em condições de umidade e hidratação elevadas. Com o tempo, os frutos infectados murcham e caem. O botrytus favorece condições de umidade com circulação de ar insuficiente, e frutos

partidos ou danificados são especificamente suscetíveis à disseminação da infecção. Estratégias de manutenção para botrytis incluem a promoção de boa circulação de ar, prevenção de machucados e aplicação de fungicidas em
5 períodos adequados durante a estação de crescimento.

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia de YGp-GET no tratamento de infecção por botrytis em uvas.

O surgimento de botrytis no vinhedo de Kir-Yianni em meados de outubro de 2004 (3 semanas após uma aplicação de
10 Teldor®) poderia não ser tratado com agro-químicos convencionais porque as restrições de tempo de re-entrada associadas impediriam a colheita planejada. Dois lotes de 1.000m² adjacentes foram, por conseguinte identificados no local 7 do vinhedo e, em 12 de outubro de 2004, um destes
15 lotes foi tratado com 4 mL/L de formulação líquida de YGP-GET e o outro foi deixado não tratado (vide fig. 23). A plantação foi colhida 3 dias após, e a proporção de frutos infectados foi determinada para cada lote (percentagem de peso de produção total). Frutos não infectados de ambos os
20 lotes tratados e não tratados foram em seguida misturados no tanque de fermentação.

O local 7 foi tratado com produtos múltiplos antes da aplicação da formulação de terpeno, porém ainda mostrou infecção por botrytis.

25 Foi fornecida às vinhas uma única aplicação de 4 mL/L de formulação líquida de YGP-GET em uma taxa de 120.000 l/km².

Os estágios de crescimento das uvas que se seguem foram registrados:

30 - surgimento de botões, 26 de março de 2004

- floração, 1 de junho de 2004
- mudança de cor, 6 de agosto de 2004
- colheita, 15 de outubro de 2004

As aplicações de estudo assumiram lugar 3 dias antes
5 da colheita.

A estação de crescimento de 2004 foi excepcionalmente tardia e foi completamente úmida. A pressão de doença de míldio brando foi extremamente elevada, a pressão de míldio em pó foi moderada e os níveis de botrytis foram elevados.

10 YGP-GET foi aplicado neste momento para avaliar seu potencial de eficácia contra uma infecção de botrytis que poderia não ter sido tratada de outra forma por causa das restrições de tempo de pesticida antes da colheita.

Avaliação visual do local antes da aplicação de
15 produto de terpeno revelou evidência de infecção de botrytis. Após a colheita, os frutos foram expostos em uma correia transportadora e frutos infectados foram manualmente separados dos frutos não infectados antes de esmagamento. A proporção de frutos infectados foi calculada
20 como uma percentagem da produção total (em peso) para cada lote.

Resultados

Avaliação visual do local antes da aplicação de YGP-GET revelou evidência de infecção por botrytis. Seguindo a
25 colheita (3 dias após a aplicação de YGP-GET), as proporções de frutos infectados foi 13% e 23% nos lotes tratados e não tratados, respectivamente. As áreas testadas não foram suficientes para avaliar significância estatística; contudo, o tratamento com YGP-GET mostrou
30 claramente a progressão da doença.

A fermentação não foi afetada pela mistura de frutos não infectados provenientes de lotes tratados com terpeno e não tratados.

Discussão

5 Tratamentos convencionais para botrytis devem ser interrompidos 3 semanas antes da colheita, deixando tempo para dano considerável para produção de plantaço e qualidade ocorrerem. O desenvolvimento de um tratamento que poderia ser utilizado até a colheita, poderia resultar em
10 melhorias significativas em produção de plantaço e qualidade de vinho, e seriam de benefício considerável a cultivadores. Neste estudo, o tratamento com o produto de terpeno de YGP-GET visivelmente desacelerou a progressão de uma infecção de botrytis estabelecida apenas 3 dias antes
15 da colheita, resultando em uma proporção inferior de frutos infectados no lote tratado com terpeno do que no lote não tratado. Além disso, apesar do uso de YGP-GET próximo à colheita, a fermentação não foi afetada pela combinação de uvas tratadas e não tratadas.

20 Estes resultados sugerem que YGP-GET é eficaz em reduzir o impacto de infecções de botrytis estabelecidas e pode ser utilizado próximo à colheita sem efeitos danosos na fermentação subsequente.

Exemplo 21 - Avaliação de terpenos encapsulados para o tratamento de Míldio brando estabelecido e avaliação subsequente da qualidade da uva

Uma teste de YGP-GET foi realizada em 25/08/04 aplicando a composição em uma taxa de 1.000 g por 250 litros.

30 Um vinhedo de Cabernet Sauvignon que foi 100%

infectado e sofrendo de perda de folha substancial devido a míldio brando foi pulverizado. Quaisquer folhas restantes estavam infectadas com manchas de míldio brando conforme evidenciado pela mancha amarela na parte superior da folha e o crescimento de penugem na parte inferior da folha; a
 5 indicação clássica de Míldio brando. Muitas das folhas estavam quase inteiramente amarelas indicando infecção substancial. Esta perda de folhas e a infecção em geral atrasam a maturidade das uvas e em muitos casos as uvas
 10 nunca amadurecem completamente para fins de fabricação de vinho.

A observação de punhados não totalmente maduros (isto é, frutos verde-escuros duros ~1 cm de diâmetro e formato oval) ocasionalmente nas vinhas indicou que as vinhas
 15 estavam provavelmente infectadas antes da mudança de cor, e provavelmente em floração ou antes. Nenhuma aplicação de cobre anterior (Bordeaux ou sulfato de Cobre básico) foi utilizada. Este vinhedo foi maciçamente infectado na colheita anterior até o ponto em que nenhuma plantação foi
 20 produzida a partir do Cabernet Sauvignon. A perda de folha no ano anterior foi de 100% apesar do tratamento com Bicarbonato de Potássio em uma tentativa de matar o míldio brando, seguido pela aplicação de Stilbourin para proteção sistemática em longo prazo.

25 Em 19/09/04 as uvas tratadas nesta teste foram colhidas e esmagadas e as observações que se seguem foram feitas no mosto (Tabela 24):

Tabela 24

	Controle	Tratado	Desejável
pH	3,28	3,30	3,3-3,5

TA	0,92	0,85	0,7-0,075
Brix	17,4	18,7	20-22

Estes resultados indicam que as uvas das vinhas tratadas são mais maduras do que aquelas das vinhas não tratadas. A observação das próprias uvas indicou que as uvas não tratadas foram, em média, mais claras em cor, algumas com uma cor verde-roxa-rosada transparente, indicativa de uvas que acabaram de passar por mudança de cor, embora as uvas tratadas fossem roxo escuro na média e opacas, típico de uvas completamente ou quase completamente maduras.

O sabor destas uvas revelou que as uvas tratadas possuíam um sabor mais completamente frutado típico de Cabernet Sauvignon maduro, embora as uvas não tratadas não possuíssem o sabor frutado completo. As uvas não tratadas possuíam um sabor azedo de maçã-verde que indica provavelmente uma razão málica/tartárica inadequada para a boa fabricação de vinho.

Estas uvas foram esmagadas e desmembradas na preparação para produzir um vinho a partir destas uvas para demonstrar a diferença nestas uvas e para demonstrar a adequação das uvas tratadas para a fabricação de vinho. O vinicultor foi avisado de que este tratamento poderia afetar o sabor do vinho, embora na minha sugestão o mesmo tenha provado uvas tratadas no dia após a aplicação de YGP-GET e não tenha encontrado nenhum sabor ou aroma residual.

A diferença nas uvas tratadas e não tratadas é ainda demonstrada na cor do musgo. O suco das uvas não tratadas era sem cor/esverdeado claro (algo como um musgo de vinho branco) embora o musgo das uvas tratadas fosse uma cor

rosada típica de uvas de Cabernet Sauvignon maduras imediatamente após esmagamento.

Estes resultados indicam que YGP-GET é eficaz em tratamento de vinhedos do final de verão ao matar e
5 interromper a re-infecção por míldio brando, pelo menos em curto prazo.

Pesquisa adicional na eficácia em longo prazo do YGP-GET em controlar míldio brando seria útil, porém os resultados apresentados mostram que YGP-GET é um tratamento
10 útil.

Ataque posterior de Míldio Brando poderia arruinar completamente uma plantação e não existe atualmente nenhum tratamento eficaz que possa ser aplicado brevemente antes da colheita e que retenha sua capacidade de propiciar
15 proteção. A grande força de YGP-GET é a capacidade de propiciar uma mortalidade rápida e manter sua eficácia durante um tempo mais longo do que outros fungicidas de contato.

Existem diversos antifúngicos neste mercado que
20 possuem um registro de rastreamento estabelecido contra míldio brando, porém todos precisam de algum tempo após a aplicação antes da plantação poder ser colhida. Alguns tratamentos (como produtos contendo enxofre) não podem ser utilizados se a temperatura se eleva acima de 29,4°C. A
25 fitotoxicidade dos fungicidas que contêm cobre é também significativa dependendo da variedade da uva. Fungicidas de contato não possuem um efeito em longo prazo pelo que uma segunda aplicação de um fungicida ativo por mais tempo é freqüentemente necessária, porém pode ser restrita por
30 regulação relevante (por exemplo, PHI ou REI).

Muitos tratamentos convencionais para míldio brando possuem uma re-entrada restrita (REI e/ou PHI) que significa que o cultivador não pode aplicar o tratamento por medo de que o mesmo aplicará algo como Maconzeb, que possui um PHI de 66 dias; o cultivador poderia então ser incapaz de colher suas uvas no pico de maturidade.

Míldio brando é apontado como a causa principal dos muitos vinhos de baixa qualidade sendo produzidos a leste do Mississippi. YGP-GET poderia permitir que uvas afetadas amadurecessem adequadamente e fossem colhidas no pico de maturidade nesta indústria de crescimento rápido.

De forma vantajosa o YGP-GET poderia ser eleito para aprovação pelos diversos comitês "orgânicos" (muitos autodesignados) que este produto é adequado para uso em cultivo de uvas sob condutas "orgânicas". Isto abre outro nicho em um segmento de mercado que cresce rapidamente nos Estados Unidos e no mundo.

Exemplo 22 - Determinação in vitro das propriedades fungicidas dos terpenos encapsulados e não encapsulados

Testes adicionais foram conduzidos para avaliar as 31 preparações de terpeno não encapsulado estabelecidas no Exemplo 15 e preparações 16 e 22 encapsuladas em partículas de glucana.

Para conduzir estes ensaios, 20.000 esporos foram colocados em caldo de dextrose de tomate (PDB) com 1/3 de concentração e quantidades suficientes de formulações de terpeno selecionadas foram adicionados a concentrações fornecidas que variam entre 10 e 1.000 ppm. Estes materiais de teste foram colocados em tubos Eppendorf cobertos estéreis separados com esporos de *Botrytis cinerea* (B.c.),

incubados por 24 horas, em seguida os esporos foram recobertos por centrifugação, e as soluções de terpeno foram descartadas. Os esporos/biomassa foram enxaguados com água estéril, centrifugados novamente e em seguida levados de volta em 300 µl de PDB com 1/3 de concentração e transferidos para placas de 96 poços. A densidade ótica dos esporos sobreviventes crescendo para dentro de micélio foi medida com o tempo. A atividade fungicida é definida como uma mortandade total de 20.000 esporos após 24 horas de exposição de terpeno, conforme evidenciado pela ausência de crescimento de micélio.

Os resultados sugerem que certas formulações não foram fungicidas em um nível estatisticamente significativo sob as presentes condições de teste (resultados não mostrados). Estes foram:

1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30. Fazer referência ao exemplo (Tabela 17) para detalhes das composições.

A concentração inibidora mínima para os compostos mais eficazes é estabelecida na Tabela 26.

Tabela 25

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

* Em testes diferentes, a concentração mais baixa que não

forneceu nenhum crescimento foi tanto 500 quanto 750 ppm.

Teste comparativo de compostos em água e encapsulados em partículas de glucana ocas

Amostras de formulações 16 (geraniol, eugenol e timol) e 22 (eugenol, timol e citral) encapsuladas em partículas de glucana ocas foram preparadas de acordo com técnicas previamente descritas. As propriedades fungicidas foram em seguida avaliadas para formulações encapsuladas e não encapsuladas que utilizam o protocolo previamente descrito para as formulações não encapsuladas.

Os resultados foram muito diferentes com formulações de terpeno encapsulado se comparadas com os terpenos suspensos em água, conforme mostrado na Fig. 24.

A concentração eficaz mínima é mostrada abaixo na Tabela 26.

Tabela 26

Material	MIC em suspensão	MIC em partículas de levedura
16	<1.000; >750	<1.000; >250
22	<750; >500	<500, >250

Sendo assim, os resultados com materiais 16 e 22 são bem diferentes quando em suspensão aquosa e quando testados encapsulados em partículas de glucana. (Nota: conforme mencionado anteriormente, houve alguma variabilidade nos resultados com terpenos suspensos em água, o experimento observado acima é um exemplo disto). Os valores de MIC são composições provenientes de diversas testes. De forma importante, os resultados com formulações de terpeno encapsulado não sofrem de problemas de variabilidade associados com suspensões de terpeno aquosas. Houve cinco

testes separados de terpenos suspensos em água e três com os YPs.

Formulações de terpeno encapsulado são prontamente miscíveis com água e propiciam uma formulação de terpeno de liberação lenta no meio aquoso. Isto resulta em um tempo de exposição mais longo dos esporos aos terpenos.

Foram encontrados problemas ao monitorar formulações de terpeno não encapsulados em suspensão nos meios de teste que podem ter afetado os resultados nesta correlação.

10 Exemplo 23 - Eficácia de composições encapsuladas contra ácaros

Ácaros de aranha de duas pintas, que se alimentam de uma variedade de plantas que incluem tomates foram utilizados nestes estudos. O propósito do presente estudo foi conduzir preliminarmente experimentos *in planta* em uma estufa comercial para determinar a eficácia de duas misturas de YP-terpeno contra ácaros de aranha de duas pintas (TSSM, *Tetranychus urticae*) e doenças de folha (botrytis) de tomate. Populações que ocorrem naturalmente de ácaros de aranha de duas pintas foram utilizadas.

YP- 4 (citral) e YP- 22 (timol, eugenol e citral) (formulações de terpeno de 16%) foram utilizados.

Em 28 de março, uma fileira dupla de 68 pés de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Trust) foi transplantada no estágio de 6 folhas reais sobre cobertura de plástico preto que cobre o solo nativo; o teste foi conduzido utilizando "Trust" como a variedade de tomate - esta variedade é mais suscetível a TSSM do que outras variedades tais como "Boa". O espaçamento de planta foi de 30,5 cm em fileira, deslocada. O cultivador cooperador podou e entrelaçou as

plantas verticalmente para um ponto de crescimento único. Blocos de duas plantas por tratamento foram marcados e colocados de forma aleatória na fileira dupla com 4 réplicas. Duas plantas não tratadas separaram todos os
5 blocos. Formulações de terpeno YP-4 e YP-22 foram aplicadas em uma taxa de 4 ml/L à unidade de folha nos seguintes dias: 11 de maio (Nota: todas as datas neste exemplo são em 2005), 2 e 15 de junho, e 1 e 18 de julho. Tratamentos de controle foram tratados com água até umedecer a folha nas
10 mesmas datas.

Dados de produção (números e pesos de frutas), incidência de doença e percentual de dano à folhagem por TSSM foram registrados a cada 1-2 semanas começando em 27 de maio até a conclusão de teste em 29 de julho.

15 Números de ácaros por centímetro quadrado foram também medidos em 25 de julho. Amostras de folha foram tomadas de cada planta aproximadamente a 1,5 metro do chão (inferior) e aproximadamente a 2,5 metros do chão (superior). As folhas foram colocadas em sacos de papel
20 úmidos para evitar desidratação. A parte de baixo de cada folha foi examinada microscopicamente e foram feitas contagens. Números totais de ácaros vivos (movendo-se ativamente e imóveis) foram determinados. Os ácaros em uma fase imóvel fazem uma pose característica que é facilmente
25 distinguível dos ácaros mortos. Não foi feita nenhuma distinção entre fêmeas e machos ou entre adultos e jovens.

Este teste foi em alguns aspectos complicado por dois fatores. Primeiro, na maior parte da produção de estufa de tomates, folhas envelhecidas mais velhas são
30 removidas à medida que as plantas crescem. Isto reduz as

populações de ácaros uma vez que uma quantidade substancial dos ácaros é removida junto com aquelas folhas velhas. Estas folhas velhas foram intencionalmente deixadas sobre a planta como uma medida para aumentar a severidade do teste.

5 Segundo, uma planta no teste, que foi uma das plantas tratadas com YP-22 na quarta réplica, tornou-se infectada com um vírus que provocou malformação severa da planta. Também teve o resultado surpreendente de ser extremamente atrativa para ácaros e proveitosa para replicação de
10 ácaros. Isto conduziu a uma tremenda explosão de população de ácaros que circundou esta planta. A planta foi removida do teste aproximadamente em 25 de junho, porém o nível muito elevado de ácaros que derivou desta planta infectada com vírus espalhou-se para lotes adjacentes com o tempo e
15 desviou os resultados.

Esta população muito elevada de ácaros poderia não ter sido controlada por qualquer produto. Populações de ácaros, mesmo se dizimadas, voltam muito rapidamente. Por esta razão, os dados relatados aqui mostram resultados ao
20 longo do tempo em uma base réplica-por-réplica.

Doença fúngica precoce

Cedo nos testes, pareceu existir um nível baixo de doenças fúngicas que ocorreram, provavelmente *Botrytis cinerea*. Esta doença foi taxada até o dano por ácaros
25 tornar-se tão sobrecarregado que não foi possível nenhuma taxação adicional. Os resultados são mostrados abaixo na Figura 25.

Taxações de dano de ácaros

Dadas as questões de planta de vírus, esta discussão
30 focar-se-á em resultados por réplicas individuais, com um

resumo a seguir. Os resultados da avaliação de dano por ácaros são mostrados nas Figuras 26a-d. A réplica 1 (Figura 26a) forneceu resultados muito como era esperado, com YP-22 reduzindo substancialmente taxações de dano de ácaros de aranha de duas pintas (TSSM) ao longo do curso inteiro do experimento. Os tratamentos começaram em 11 de maio, pelo que as diferenças nas primeiras taxações de TSSM em 15 de junho são razoáveis. A réplica 2 (Figura 26b) seguiu um tempo de curso similar exceto para o fato de que o dano por TSSM no princípio do experimento foi bem baixo. A réplica 4 (Figura 26d) será discutida a seguir; seus resultados afetam a réplica 3 (Figura 26c). Até 23 de junho, as taxações de TSSM foram consistentes com as outras réplicas, porém aumentaram tremendamente em 1 de julho e foi a maior com YP-22. Isto sem dúvida ocorreu porque a planta infectada com vírus foi uma que foi tratada com YP-22. Esta infecção por vírus aumentou dramaticamente as populações de ácaros, tanto porque foi muito atrativa quanto porque permitiu proliferação de ácaros violenta, ou ambos. Em qualquer taxa, as populações de ácaros tornaram-se muito elevadas. A população de ácaros rapidamente se espalhou da planta infectada com vírus tratada por YP-22 para outras plantas nesta réplica, e assim em 11 de julho todas as taxações de TSM foram muito elevadas na réplica 4. Para evitar infestação do resto da estufa e experimento, as plantas na réplica 4 foram descartadas após este período. Na réplica 3, em 1 de julho as taxações de TSSM começaram a aumentar e após isto começaram a aumentar rapidamente. Sendo assim, não há dúvida de que a réplica 3 recebeu pressão elevada crescente dos ácaros que começaram com uma

única planta na réplica 4. É improvável que qualquer tratamento pudesse ter contido o crescimento de população explosivo que surgiu da planta infectada por vírus.

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

Números de ácaros

Ácaros foram enumerados microscopicamente a partir dos lados de baixo de folhas tiradas de cada planta aproximadamente a 1,5 metro (inferior) do solo e aproximadamente a 2,5 metros (superior) do solo. Os resultados são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27 - comparação de infestação de ácaros entre plantas tratadas e de controle

Tratamento	Localização da planta	Ácaros médios/m ²	Desvio Padrão	# Max.	# Mín.
Controle	Inferior	10,86	11,06	27,55	0,00
YP-4	Inferior	3,38	1,28	4,68	1,06
YP-22	Inferior	0,36	0,34	0,84	0,04
Controle	Superior	9,59	22,11	54,71	0,00
YP-4	Superior	1,14	0,98	2,91	0,17
YP-22	Superior	0,85	1,35	3,21	0,00

Estes dados indicam controle de ácaros bom. Existe uma grande variação nos números de ácaros/folha nas plantas de controle, como seria esperado para esta peste. Contudo, os números máximos com ambos os tratamentos, especialmente o tratamento YP-22, é substancialmente inferior ao controle.

Ácaros foram controlados neste estudo espacialmente por YP-22. Contudo, onde pressões de ácaro muito elevadas ocorreram, YP-22 foi insuficiente em propiciar controle adequado. É provável que nenhum acaricida propiciasse bom
5 controle devido às populações de ácaros muito elevadas em parte deste estudo. Também é válido notar-se que se aplicaram materiais a cada duas semanas e uma vez que ácaros possuem boas capacidades de volta, os materiais de teste de YP possuíam atividade residual; isto foi quase
10 certamente propiciado como um resultado de encapsulação.

Os resultados são extremamente encorajadores, uma vez que as formulações a serem utilizadas, a taxa de aplicação e a frequência de aplicação não foram otimizadas. Seria sem dúvida possível aperfeiçoar a eficácia ao otimizar misturas
15 de terpeno, taxas de aplicação e frequência de aplicação. Tal otimização seria uma questão de teste e erro para alcançar.

Além disso, existem pelo menos dois tipos de adjuvantes que podem ser utilizados para aumentar a
20 eficácia. Silwet é um agente tensoativo de organo-silicone que é adicionado a pesticidas como uma mistura de tanque. Bons dados indicam que este material aumenta a atividade de acaricidas (referência disponível sob solicitação). Pode ser utilizado em plantas e está prontamente disponível.
25 Possuímos dados que indicam também que materiais similares aumentam a eficácia de controle de doença fúngica com agentes de biocontrole. De forma alternativa, Stirrup é um produto de feromônio que atrai ácaros para depósitos de pesticidas e aumenta o uso do material.

encapsulados para controle de míldio em pó

O presente estudo foi conduzido para determinar as misturas de terpeno mais eficazes e os níveis nos quais os mesmos estão ativos em relação a míldio em pó.

5 31 terpenos ou misturas de terpenos encapsulados em paredes celulares de levedura (YP- terpenos) foram avaliados; os códigos utilizados em relação às composições específicas são apresentados na Tabela 17 do Exemplo 15.

10 O desenvolvimento de protocolo foi guiado pela biologia básica do organismo. O fungo é um patógeno obrigatório e assim não pode sofrer cultura a não ser nas folhas de uvas. Por conseguinte, inocularam-se plantas (mudas de "Rieslin") e colheu conídias ao lavar folhas infectadas com esporulação copiosa.

15 Uma variação do método utilizado por Reuveni (2001; Can. J. Pathol. 23:52-59) foi empregada. Uma de duas folhas infectada com *Uncinula necator* foi colocada em um tubo plástico de 50 mL estéril. Foi adicionado Tween-20 (7,5 mL, 0,0005%) ao tubo e as folhas foram vigorosamente mexidas em
20 redemoinho por 30 segundos. Conídias foram encontradas utilizando uma câmara de contagem Petroff-Hauser e ajustadas para $1-2 \times 10^5$ conídias/mL.

Terpenos-YP foram diluídos a soluções de trabalho de 4.000 ppm. Reações assumiram lugar em tubos de eppendorf
25 siliconados de 600 µL e o volume de reação final foi de 60 µL. Terpenos 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 conídias foi adicionado a cada tubo e cada tubo foi ligeiramente agitado com
30 redemoinho. Foram incluídos água e material de teste 32

(apenas partículas, nenhum terpeno) como controles. Os materiais de teste e conídias foram incubados por 1-1,5 h para propiciar tempo de contato suficiente para a inibição dos esporos sem afetar de forma adversa germinação de esporo na ausência dos terpenos. Esta breve imersão foi essencial a fim de permitir tempo de contato adequado com terpenos, uma vez que as misturas de terpeno sobre a superfície de Agar foram rapidamente volatilizadas ou foram absorvidas na água.

Lâminas de microscópio de vidro foram revestidos com 750 µL de Agar a 1,5% em água. As lâminas de vidro foram colocadas em caixas de germinação cada uma contendo um mata-borrão úmido. Quando foram feitas testes para colocar diretamente misturas de conídias e terpeno diretamente sobre o Agar, houve uns poucos efeitos dos terpenos, provavelmente por causa de tempo de contato inadequado. Tampas foram colocadas sobre cada caixa e permitiu-se que os materiais incubassem por 48 h em temperatura ambiente na bancada. Em alguns experimentos, lâminas com níveis diferentes de terpenos foram contidos dentro da mesma caixa. Verificou-se que esta técnica permite resultados errôneos, uma vez que os voláteis das lâminas com níveis elevados de terpenos inibiam conídias sobre lâminas com níveis inferiores dos materiais. Por conseguinte os dados finais foram tomados das lâminas em caixas que contêm apenas um ou dois níveis do mesmo material de teste.

Após 48 h as lâminas foram examinadas utilizando um microscópio luminoso. Diversos ajustes de fase-contraste foram utilizados para obter um perfil afiado de cada conídia. Os YPs são muitas vezes menores do que as conídias

e os dois foram fáceis de diferenciar. Pelo menos 100 esporos foram avaliados para germinação por lote; se o número de esporos observável era inferior a 100, cada esporo encontrado era contado. Comprimentos de tubo de
5 germes de pelo menos 10 conídias germinadas foram medidos também, embora estes dados não fossem por fim verificados como muito úteis.

Verificou-se também que uma pequena percentagem de conídias já estava germinada quando as mesmas foram lavadas
10 das folhas. Isto é esperado uma vez que as conídias de míldio em pó não precisam de água livre para germinar e por conseguinte podem germinar a qualquer momento. Estabeleceu-se por conseguinte um máximo de 4% de germinação como nosso corte para atividade fúngica, uma vez que este foi o nível
15 freqüentemente observado nos controles de água de momento 0. A idade da infecção por míldio em pó também resultou em alguma variabilidade. Infecções mais velhas do que 3 semanas propiciaram um nível mais baixo de germinação global nos controles (36% em controles de água sobre
20 lâminas de Agar) enquanto infecções mais jovens forneceram níveis de germinação muito mais elevados (em torno de 70%). Observaram-se todos os materiais de teste diversas vezes, com dados sendo coletados em níveis em que a inibição ocorreu. 3 réplicas por teste foram utilizadas.

25 **Resultados:**

Concentrações de materiais que variaram entre 100 e 1.000 ppm de terpeno. Cada material de teste foi fungicida pelo menos na concentração mais elevada testada. Quatro classes de eficácia fungicida foram estabelecidas para as
30 31 formulações. As formulações de terpeno e seu

agrupamento, com base na dose inibidora mínima (fungicida), são propiciados abaixo.

Grupo A (>100ppm, <250ppm): 7, 10, 22 e 30

Grupo B (>250, <500): 1, 2, 3, 7, 8, 13, 14, 16, 19,
5 20, 23-29 e 31

Grupo C (>500, <750): 4, 6, 9, 11, 15, 18 e 21

Grupo D (>750, <1000): 5, 12 e 17

A dose fungicida foi calculada com base na germinação de conídias de míldio em pó 48 h após reação, conforme
10 determinado por observação microscópica. Uma vez que as conídias de míldio em pó germinam dentro de 24 h no controle, se a germinação não ocorreu dentro de 48 h, considerou-se que os esporos foram mortos. Em uns poucos casos, continuou-se a observar por 72 h ou mais, porém
15 nenhuma informação adicional foi obtida.

Exemplo 25 - Avaliação in vitro de terpenos encapsulados para controle de míldio brando

O presente estudo foi conduzido para determinar as misturas de terpeno mais eficientes e os níveis nos quais
20 as mesmas estão ativas em relação a míldio brando.

Plasmopara viticola, o agente causal de míldio brando em uvas, *in vitro*, foi utilizado em todos os estudos. Este foi uma cepa patogênica do tipo selvagem obtida dos associados em Cornell. O organismo foi mantido sobre folhas
25 de mudas obtidas de sementes de "Reisling".

O desenvolvimento de protocolo foi conduzido pela biologia básica do organismo. O fungo é um patógeno obrigatório e assim não pode ser feita cultura de outra forma além das folhas de uvas. Por conseguinte, inocularam-se
30 se plantas (mudas de "Riesling") e colheram-se esporângios

ao lavar gentilmente folhas infectadas com água. Originalmente tentou-se conduzir os ensaios ao observar esporângios em lâminas de vidro com capas de cobertura. Contudo, desejou-se observar as lâminas com o tempo e este
5 método simplesmente não permitiu isto. Os volumes utilizados foram muito pequenos para avaliação adequada, os esporângios freqüentemente se desintegrariam a partir da pressão da capa de cobertura e os zoósporos iriam enquistar-se muito rapidamente após liberação. Uma variação
10 do método utilizado por Reuveni (2001; Can. J. Plant. Pathol. 23:52-59) que utiliza lâminas de depressão foi utilizada. Estes lâminas não exigem capas de cobertura, os zoósporos permanecem móveis por muitas horas e os volumes utilizados permitiram avaliações múltiplas com o tempo.

15 Para todos os experimentos, esporângios de 1-3 folhas infectados com *Plasmopara viticola* foram gentilmente lavados com água estéril para dentro de um béquer e contados utilizando uma câmara de contagem Petroff-Hauser. A concentração de esporângios foi de pelo menos $1 \times 10^5/\text{ml}$.

20 YP-terpenos foram diluídos para soluções de trabalho de 4.000 ppm. As reações realizaram-se em tubos de eppendorf siliconizados de 600µL e o volume de reação final foi de 100µL. YP-terpenos foram diluídos no tubo para fornecer concentrações finais de 10, 50, 100, 250 e 500 ppm
25 de terpeno. Setenta e cinco µL da suspensão de esporângios foram adicionados a cada tubo e gentilmente misturados ao pipetar a suspensão para cima e para baixo. Água e material de teste 32 (YP apenas, nenhum terpeno) foram incluídos como controles.

30 **Ensaio #1 - Tubos fechados**

Uma avaliação preliminar foi feita para todos os 31 materiais de teste em 10, 50 e 100 ppm de terpeno para estimar a faixa correta de eficácia (isto é, nenhum zoósporo móvel observado durante as 8 horas subseqüentes).

5 Logo que foi observada a germinação de esporângios e foram observados zoósporos nos controles (0,5-1 horas mais tarde), 15 µL foram transferidos para um lâmina de depressão de vidro do tubo um de cada vez e imediatamente observados utilizando um microscópio luminoso. Se zoósporos
10 móveis foram vistos esta concentração não foi observada mais. A lâmina foi limpa. A cada 2-3 horas, o processo foi repetido com novo material de teste proveniente do tubo. No final de 8 horas, a germinação percentual dos primeiros 100 esporângios foi determinada. As amostras foram deixadas em
15 temperatura ambiente e observadas novamente no dia seguinte. Os critérios para atividade cidal foram (a) nenhuma germinação de esporângios maior do que em controles de tempo (não mais do que 10%) e (b) nenhum zoósporo móvel. As percentagens de germinação de esporângios nas
20 doses eficazes variaram entre 1,8% a 6,7% comparadas aos controles de água (87%) e YP-32 (76%).

Neste ensaio, os esporângios estiveram em contato constante com os materiais de teste em um recipiente selecionado.

25 **Ensaio #2 - Incubação de uma hora**

O sistema de ensaio descrito acima pode não propiciar dados acurados em concentrações de cidal (isto é, letais) uma vez que a ausência de germinação de esporângios e zoósporos móveis estão na presença dos materiais em tubos
30 fechados e os materiais de teste são continuamente imersos

nas soluções de teste. Não podemos remover as células dos materiais sem solução porque a centrifugação é letal aos esporângios e zoósporos. Por conseguinte, após 1 h de incubação em tubos de Eppendorf fechados, as mistura de teste (40 µL) foram transferidas para lâminas de depressão. Nesta camada fina, os terpenos são esperados para volatilizar em ar e por conseguinte concentrações cidaais mais precisamente determinadas.

As lâminas foram armazenadas em caixas de germinação cada uma contendo um mata-borrão úmido. A cada 2 horas as lâminas foram inspecionadas para zoósporos móveis. A concentração na qual não foi observado nenhum zoósporo após 24 horas foi considerada a MIC neste ensaio.

Resultados:

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

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

Ensaio #1 - MICs - Tubos fechados (imersão constante em suspensões de terpeno)

Grupo A (<50ppm): 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

Ensaio #2 - MICs- Incubação de uma hora (terpenos dissipados por volatilização das camadas finas)

Grupo A (<100ppm): 4

Grupo B (>100, <250): 3, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19,
5 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 YP-terpeno foram avaliados por suas capacidades em inibir a liberação de zoósporos móveis provenientes de esporângios de *Plamopara*
10 viticola. Dois ensaios foram conduzidos. No primeiro teste examinou-se tanto a germinação de esporângios quanto a mobilidade de zoósporo de materiais incubados em tubos fechados; no segundo teste avaliou-se apenas a mobilidade de zoósporo em lâminas de depressão após incubação nos
15 tubos fechados por apenas uma hora.

A ausência de zoósporos móveis é a forma mais clara de determinar eficácia dos materiais de teste e por conseguinte foi utilizada como o critério definitivo. A mobilidade de zoósporo é crítica para infecção por este
20 patógeno. A inibição de germinação de esporângios é a primeira etapa na direção do controle da doença de míldio brando; se os esporângios permanecem intactos, então os zoósporos não serão liberados. Nossos dados em germinação de esporângios sustentam as MICs acima mesmo se a
25 germinação nunca fosse 0%. Alguns esporângios já tinham sido germinados quando os mesmos foram colhidos das folhas. O percentual de germinação em 0h (nenhum zoósporo observado) variou entre 6% e 16%.

No primeiro ensaio, os terpenos controlaram a
30 liberação de zoósporos sob condições de teste ideais. De

forma inequívoca, os materiais de teste possuem um efeito cidal sobre o patógeno de míldio brando. Contudo, o Ensaio #2 propicia um teste melhor de letalidade sem situações, que também ocorrerão sobre folhas de plantas, onde os terpenos se dissiparam por volatilidade. Vistos juntos, os dois ensaios propiciam uma avaliação completadas capacidades in vitro dos materiais de YP-terpeno para controlar o patógeno de míldio brando de uvas.

Exemplo 26 - Avaliação in vitro de terpenos encapsulados para controle de Botrytis cinerea

15 terpenos ou misturas de terpenos encapsulados em paredes celulares de levedura foram avaliados. As formulações testadas não continham L-carvona. *Botrytis cinerea* foi utilizado em todos os estudos. A identificação de cepa é B36 e foi obtida por Universidade de Cornell. O organismo foi mantido sobre Agar V8 a 25°C.

O protocolo para este estudo combina aspectos de um ensaio de resazurina (Alamar Azul) com outro protocolo previamente utilizado com *B. cinerea*. A presença do resazurina permite medir níveis cidaís dos terpenos na presença das partículas de terpeno.

Esporos de *Botrytis cinerea* foram colhidos em água e ajustados para uma concentração de 1×10^5 esporos/mL. Terpenos YP foram diluídos em concentrações finais de 100, 250 ou 500 ppm em tubos de eppendorf de 1,5 mL estéreis. 50 µL da suspensão de esporos e 375 µL de PDB com 1/3 de concentração foram adicionados aos tubos. As suspensões foram ligeiramente misturadas com redemoinho e incubadas em temperatura ambiente por 24 h. A parte interior de cada tubo foi em seguida desfeita utilizando um palito de dentes

estéril para liberar resíduos das paredes.

Ensaio fungistático:

Após 24 h, duas amostras separadas de 50 µL das suspensões de teste foram removidas e colocadas em poços de placa de micro-titulação junto com 30 µL de PDB com 1/3 de concentração e 20 µL de 250 ppm de resarzurina. Estas misturas foram incubadas durante a noite por 16-20 horas. Observações visuais foram então feitas. Aquelas concentrações de YP e suspensões de esporos em que as misturas de teste permaneceram roxas foram consideradas como sendo funguistáticas. Suspensões de Resarzurina são roxas, porém se reduzidas por atividade biológica as soluções tornam-se rosa e em seguida claras.

Ensaio fungicida:

Após as duas amostras das suspensões de teste terem sido removidas, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado, que continha YPs, esporos de botrytis e qualquer resíduos germinados, foi lavado com 400 µL de água. Os tubos foram centrifugados novamente e a esfera foi re-suspensa em 400 µL de PDB com 1/3 de concentração estéril. Para cada tubo, 150 µL de 250 ppm de resarzurina foram adicionados. Os tubos foram agitados com redemoinho e incubados em temperatura ambiente durante a noite por 16-20 horas. Foram feitas avaliações visuais e aquelas concentrações de YP e suspensões de esporos em que as misturas de teste permaneceram roxas foram consideradas como sendo fungicidas.

Após 72 horas, avaliações visuais dos tubos foram feitas novamente e amostras roxas foram consideradas como

sendo fungicidas.

A cada poço ou tubo foi atribuída uma classificação de cor. Nenhuma alteração de cor foi classificada como 4; poços claros foram classificados como 0. Uma classificação de 3 ou superior foi considerada estática (pouca ou nenhuma alteração de cor) e apenas uma classificação de 4 (nenhum alteração) foi considerada cidal.

Três réplicas de cada material de teste em cada concentração foram utilizadas para cada experimento e cada experimento foi feito duas vezes.

Resultados:

Testes funguistáticos - Cada material de teste foi funguistático pelo menos na concentração mais elevada testada. O critério para eficácia foi de pelo menos 75% de inibição de crescimento relativo ao controle. Taxas de eficácia foram estabelecidas para os 15 terpenos e são propiciadas abaixo.

Grupo A (<100ppm): 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 de alteração de cor para testes fungicidas foi medida duas vezes: uma após 16-20 h e outra novamente após 72 h. Após 20h, todos os materiais de teste estavam funguistáticos pelo menos na concentração mais elevada testada. Contudo, após apenas 72 h umas poucas amostras foram ainda consideradas fungicidas. As faixas de eficácia para cada terpeno em cada ponto de tempo são propiciadas abaixo.

Após 16-20 horas:

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

e 26

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

Após 72 horas:

Grupo A (>100, <250): 7

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

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

Marcações de composição

A cada faixa de eficácia foi atribuída uma
classificação (Grupo A=1, B=2 e C=3). As tabelas que se
10 seguem (Tabelas 28 a 30) mostram as classificações para
cada teste e as classificações globais para cada terpeno de
YP. Quanto menor o número, melhor a eficiência.

Tabela 28 - Faixas de Eficácia e Marcações para Cada teste

No.	CÓD E	Estático	Classifi- cação	16-20h Cidal	Classifi- cação	72h cidal	Classifi- cação
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, <500	3	>250, <500	2	>500	3
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
				>100, <250		>250, <500	

10	ET	<100	1	<250	1	<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	>100, <250	2	>100, <250	1	>250, <500	2
26	GET C	<100	1	>100, <250	1	>250, <500	2

Tabela 29 - Classificações para Cada Teste e Placares de Composição

No.	COD E	Estático	16-20h Cidal	72h Cidal	Composição
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	GETC	1	1	2	4

Tabela 30 - Classificações de Terpenos de YP de Mais Eficaz para Menos Eficaz

NO.	Código	Composição
7	GT	3
3	T	4
10	ET	4
16	GET	4
19	GTC	4
26	GETC	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 8 materiais de teste mais eficazes possuem timol (T) tanto sozinho quanto como um componente de mistura.

5

Discussão:

Em estudos in vitro anteriores, materiais de teste de terpeno de YP que continham L-carvona propiciaram

efetividade mínima ao controlar patógenos de planta importantes. Os 16 materiais de teste que continham este componente foram, por conseguinte, excluídos.

Resarzurina foi incluída como uma tinta indicadora. À medida que *Botrytis* degrada resarzurina uma alteração de cor de roxo para rosa para claro ocorre. Para os ensaios fungistáticos, as amostras foram transferidas para placas de micro-titulação de 96 poços e reagidas com resarzurina por 16-20 h antes de avaliação visual de alteração de cor. Após centrifugação e lavagem, o material restante nos tubos foi reagido com resarzurina para propiciar avaliações fungicidas.

YP-7 de material de teste foi a amostra mais eficaz em cada teste. YP-7 é o material mais eficaz em controlar míldio em pó, também in vitro.

Conclusões:

Todos os materiais de teste de YP foram funguistáticos contra *Botrytis cinerea* pelo menos em 500 ppm. Após 16-20 h, todos os materiais foram considerados como sendo fungicidas pelo menos a 500 ppm. Contudo, após 72 h, apenas 10 materiais de teste ainda foram considerados como sendo fungicidas.

Os mais eficazes foram fungicidas entre 250 e 500 ppm.

Exemplo 27 - Avaliação in vitro de terpenos encapsulados para controle de bactérias de plantações lenhosas

Todas as três bactérias testadas são Proteobactérias e são Gram-negativas. As mesmas possuem uma membrana externa principalmente composta de lipopolissacarídeos.

Erwinia amylova está na família Enterobacteriaceae. Outras bactérias nesta família incluem *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, e *Serratia marcescens*. *Pseudomonas syringae* está na família Pseudomonadaceae. Outros membros importantes desta família incluem *Pseudomonas aeruginosa* (um patógeno oportunista). Intimamente relacionada a *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* estão diversos pathovars importantes que incluem aqueles que infectam arroz e cenoura. *Pseudomonas* e *Xanthomonas* são intimamente relacionados.

Durante o século 20, introduções de material de planta infestado serviram para estabelecer *E. amylovora* na Europa, no Meio Oeste, e na Nova Zelândia. *E. amylovora* provoca "fogo bacteriano" em maçãs e em pêras. Em 1995, "fogo bacteriano" foi primeiro observado no vale Rio Pó do norte da Itália, que é a maior área de produção de pêras no mundo. Desde 1995, o governo da Itália destruiu 500.000 pereiras em uma tentativa de erradicar *E. amylovora* (<http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/FireBlight/HISTORY.HTM>).

Pulgões de feijões e halo comuns são umas das doenças mais economicamente importantes e difundidas de feijões secos e snap. Os Estados Unidos, Canadá e Colômbia são alguns dos maiores plantadores destes feijões. A maior parte das estratégias de manutenção envolve plantar apenas sementes isentas de patógenos certificadas, fazer rotação de plantio e promover pulverizações químicas semanalmente (<http://www.ipgenetics.com/commonbean.asp>).

Metodologia:

Erwinia amylovora (cepa Ea273; fogo bacteriano de

maçã), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (cepa Pph MF; pulgão halo de feijão) e *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* (cepa Xph XPW; pulgão comum de feijão) foram utilizados neste estudo. Estas cepas foram obtidas a partir da Universidade de Cornell.

Culturas - Todas as três bactérias foram cultivadas em placas LB (Luria-Bertani) (Sambrook e outros, 1989) a 28°C. Culturas iniciais (50mL de caldo LB) foram inoculadas a partir das placas e cresceram durante a noite (170rpm, 28°C). Um mL de cultura inicial foi transferido para um novo frasco de caldo de 50mL LB e cresceu sob as mesmas condições até a fase estacionária ser alcançada. As culturas foram lidas a 620nm para densidade ótica (OD) e em seguida diluídas com caldo LB para fornecer 10⁵-10⁶ células/mL. Este material diluído foi utilizado para inocular as paredes nos ensaios de placa de microtitulação.

Ensaio Bacterioestáticos:

Os ensaios de placa foram conduzidos utilizando caldo LB como o meio de crescimento. Materiais de teste de YP-terpeno foram diluídos na placa para determinar uma faixa entre 7,8 e 1.000ppm (terpeno Al). As bactérias diluídas foram adicionadas a cada poço para determinar um volume de poço final de 200 uL. Poços de controle não continham qualquer YP-terpeno. As placas foram lidas a 620nm para medições iniciais (OD inicial) e incubadas a 28°C por dois dias.

Após dois dias, as placas foram lidas novamente a 620nm (OD final). O OD final menos o OD inicial (delta OD) fornece a alteração em crescimento durante o tempo. O

critério para eficácia foi de pelo menos 75% de inibição de crescimento relativo ao controle. Por conseguinte, O delta OD em poços de teste tinha de ser inferior a 25% do crescimento nos poços de controle a serem considerados
5 eficazes em controlar as bactérias.

Ensaio Bactericidas:

Após os ensaios bacterioestáticos estarem finalizados, as placas foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e 100 µL de caldo
10 LB fresco foram adicionados a cada poço. As placas foram lidas a 620nm (OD final). Concentrações efetivas propiciaram pelo menos 75% de inibição de crescimento relativo ao controle.

Duas réplicas foram utilizadas para cada YP-terpeno e
15 ambos os ensaios (estático e cidal) foram conduzidos três vezes para cada bactéria.

Resultados:

Ensaio Bacterioestático - Para todas as três bactérias, cada material de teste foi bacterioestático pelo
20 menos na mais elevada concentração testada. O ensaio durou 48 horas. O critério para eficácia foi de pelo menos 75% de inibição de crescimento relativo ao controle. Faixas de eficácia foram estabelecidas para os 31 terpenos e são propiciadas abaixo.

25 **Tabela 31 - Resultados Bacterioestáticos**

Patógeno	MIC estático (ppm)	YP-terpeno
<i>Erwinia amylovora</i>	>15,625, <31,25	3,7,13,16,19,20,22,24,27
	>31,24, <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, <1.000	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 em matar as bactérias na concentração mais elevada testada. Faixas de eficácia foram estabelecidas para os 31 terpenos e são propiciadas abaixo na Tabela 32.

Tabela 32 - Resultados de ensaio bactericida

Patógeno	MIC Cidal (ppm)	YP-terpeno
<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 patógeno mais sensível às

formulações de YP-terpeno seguido por *Xanthomona* e em seguida *Pseudomonas*.

Classificações foram associadas a cada YP-terpeno para cada ensaio para cada bactéria. Quanto mais baixo o número da classificação, melhor a eficácia do material de teste. As classificações estática e cidal foram multiplicadas para fornecer um placar de combinação. Este número indica quão bem o YP-terpeno controlou cada bactéria. Os três placares de combinação (um para cada bactéria) foram adicionados para determinar um placar de composição, que indica a eficácia de YP-terpeno através das três bactérias. A Tabela 33 lista os YP-terpenos em ordem de eficácia com base no placar de composição (global) junto com a composição de cada material de teste.

15 Tabela 33 - Placares de composição de controle de bactéria global

Código YP	Placar de composição	Terpenos	Código YP	Placar de composição	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 8 melhores formulações de YP-terpeno para controlar estas bactérias individualmente contêm timol. A maior parte das combinações que contém L-carvona é muito
5 insuficiente em controlar estas bactérias.

Resumo de Resultados de Exemplos 24 a 27

Certas combinações de terpenos encapsulados mostraram eficácia específica contra certos tipos de patógenos de planta. Estas combinações foram observadas como sendo:

10 - Para todos os organismos, as composições mais eficazes são 7 (Geraniol e Timol), com 10 (Eugenol e Timol), e 13 (Timol e Citral) um segundo próximo.

- 7 (Geraniol e Timol) é a mais eficaz de todas para controle de fungos/oomicetes.

15 - 13 (Timol e Citral) é a mais eficaz de todas para bactérias.

- A combinação 10 (Eugenol e Timol) é altamente eficaz contra ambos fungos e bactérias.

20 - No grupo de eficácia seguinte estão 3 (timol), 19 (Geraniol, Timol e Citral), e 22 (Eugenol, Timol & Citral).

- O quarto grupo marcado consiste em 16 (Geraniol, Eugenol & Timol) e 26 (Geraniol, Eugenol, Timol & Citral).

25 - Para míldio brando especificamente, 4 (C) é altamente eficaz, porém não está na marcação superior para nada mais.

Estes resultados indicam que quatro terpenos citral,

eugenol, geraniol e timol sozinhos ou em combinação, especialmente quando encapsulados em partículas de glucana de levedura, exibem forte atividade anti-bacteriana e antifúngica. Na maior parte dos casos a presença de timol é

5 significativa.

As tabelas 34 a 36 resumem as marcações do desempenho das diversas formulações.

Tabela 34 - Resumo de Fungo/oomicete

No.	Teor	B.c.*	Em pó	Fofo	Composição	Marcação
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	GETC	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	2	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

*Baseado em dados de cidal de 72h

10 **Tabela 35 - Resumo Bacteriano**

No.	Teor	E.a. cidal	Os.P.cidal	X.cp. cidal	Resumo	Marcação
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	GETC	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 36 - Marcação de combinação de fungos e bactérias

No.	Teor	Marcação de fungo/Oomicete	Marcação de bactérias	Marcação de composição
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	GETC	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	9

REIVINDICAÇÕES

1. Método para matar um inseto ou aracnídeo caracterizado pelo fato de compreender a etapa de:

5 a) administrar ao referido inseto ou aracnídeo em uma dose eficaz uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do inseto ser selecionado a partir
10 do grupo que consiste em formigas, cupins, piolhos, afídios, pulgas, gafanhotos, cigarras e tripes.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do aracnídeo ser selecionado a partir do grupo que consiste em ácaros, aranhas e
15 carrapatos.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada ao ácaro ou insetos que infestam plantas.

20 5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato dos ácaros serem ácaros de aranha de duas pintas.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato do
25 componente terpênico compreender citral sozinho ou uma combinação de eugenol, timol e citral.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato da composição ser administrada por pulverização ou qualquer
30 outra forma de dispersão da composição sobre o inseto ou

aracnídeo.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato da composição ser administrada por pulverização ou qualquer outra forma de dispersão sobre uma folha de planta que possa em seguida ser ingerida pelo inseto ou aracnídeo.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato da composição ser administrada a um objeto por imersão do objeto infestado com o inseto ou aracnídeo na composição.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, caracterizado pelo fato da composição ser administrada na forma de um xampu ou similar.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato da composição ser administrada a um tecido.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da composição ser administrada durante lavagem do tecido.

13. Método para tratar ou impedir a infestação de uma planta caracterizado pelo fato de compreender a etapa de:

a) administrar em uma dose terapeuticamente eficaz uma composição que compreende uma partícula de glucana oca ou uma partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico à planta ou ao solo em proximidade à planta.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13,

caracterizado pelo fato da infestação ser por um inseto ou aracnídeo.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato do aracnídeo ser um ácaro herbívoro.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato do ácaro herbívoro ser um ácaro de aranha de duas pintas.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato do inseto ser selecionado a partir do grupo que consiste em moscas, afídeos, formigas, gafanhotos, cigarras e tripes.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato do componente terpênico consistir em citral.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato do componente terpênico compreender uma combinação de eugenol, timol e citral.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado pelo fato da composição ser aplicada imediatamente antes da colheita da planta.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato da composição ser aplicada 21 dias ou menos antes da colheita.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, caracterizado pelo fato da composição ser aplicada regularmente como uma medida profilática.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizado pelo fato da composição ser aplicada por pulverização.

5 24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizado pelo fato da composição ser aplicada por irrigação.

10 25. Uso de uma composição caracterizada por compreender uma partícula de glucana oca ou uma partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico como um inseticida ou como um aracnicida.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de ser como um acaricida.

15 27. Uso de uma composição caracterizado pelo fato de que compreende uma partícula de glucana oca ou uma partícula de parede celular que encapsula um componente terpênico na preparação de um inseticida ou um aracnicida.

20 28. Uso da uma composição, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um acaricida.

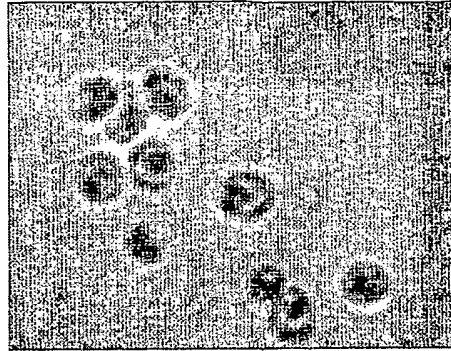


Fig. 1

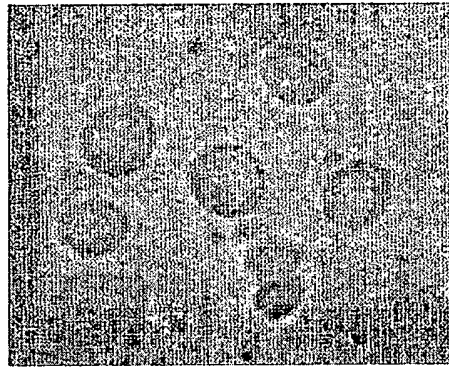


Fig. 2

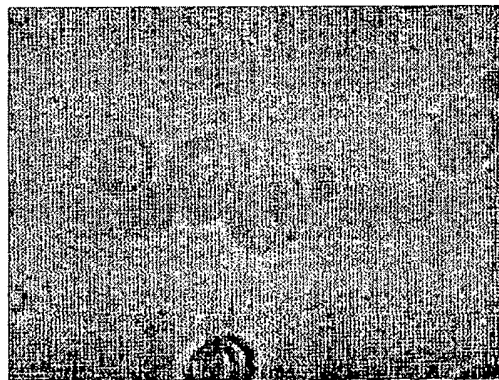


Fig. 3

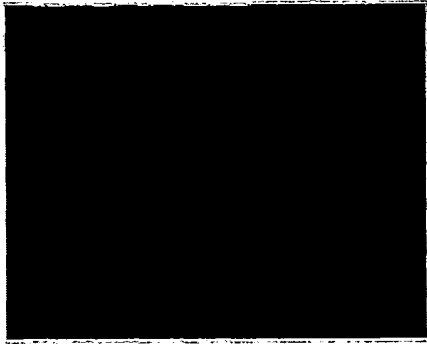


Fig. 4

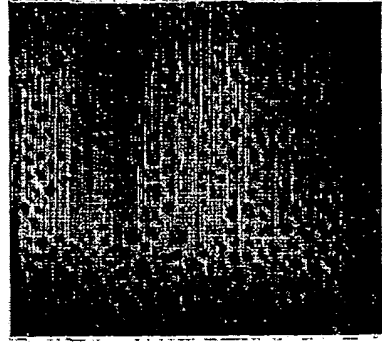


Fig. 5

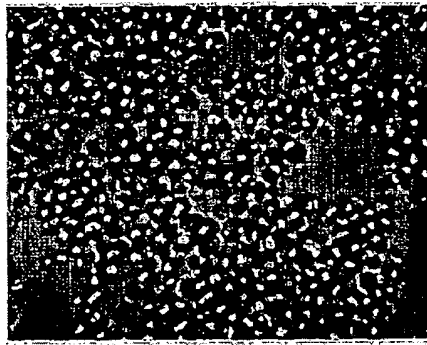


Fig. 6

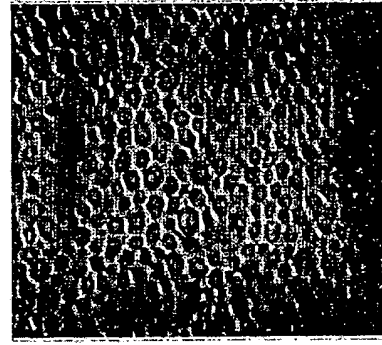


Fig. 7

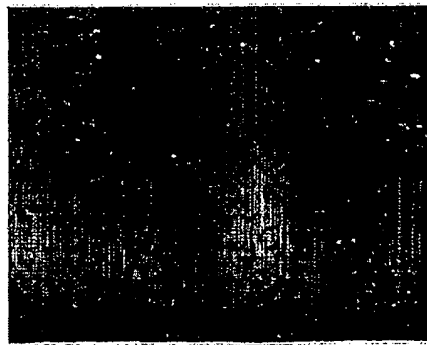


Fig. 8

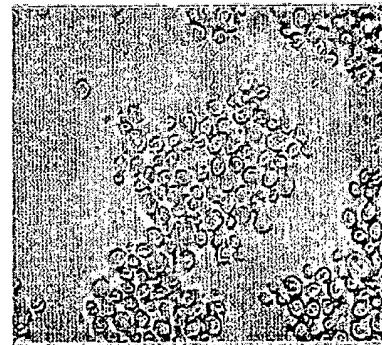


Fig. 9

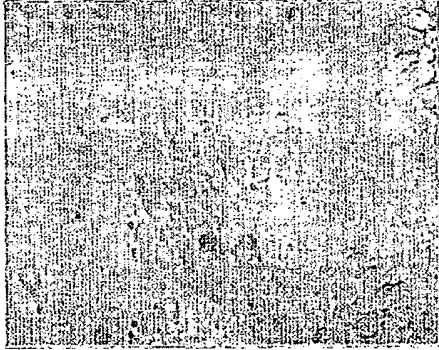


Fig. 10

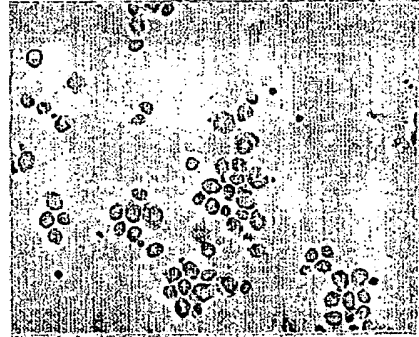


Fig. 11

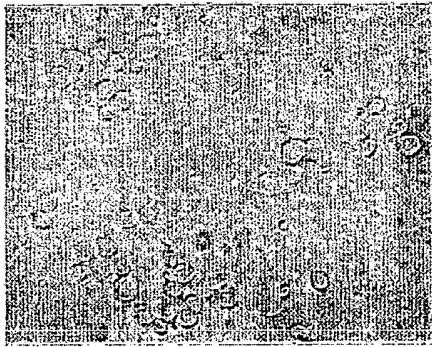


Fig. 12

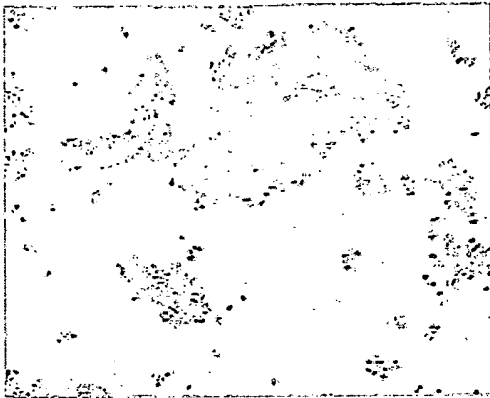


Fig. 13

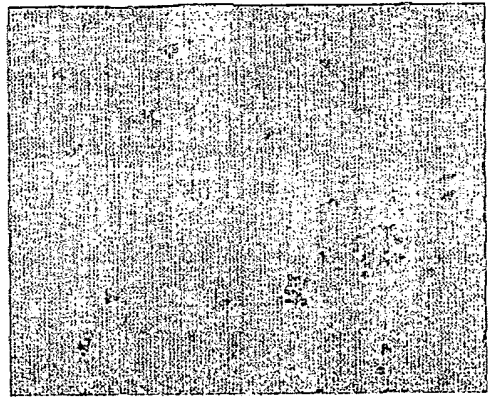


Fig. 14

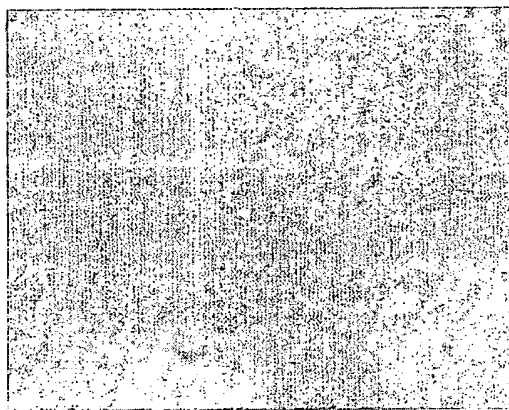


Fig. 15

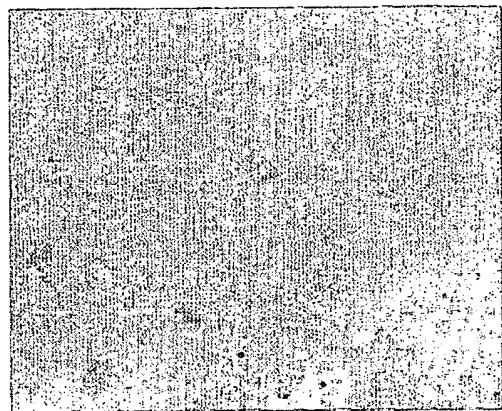


Fig. 16

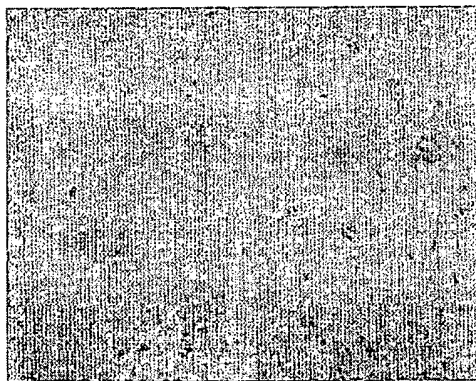


Fig. 17

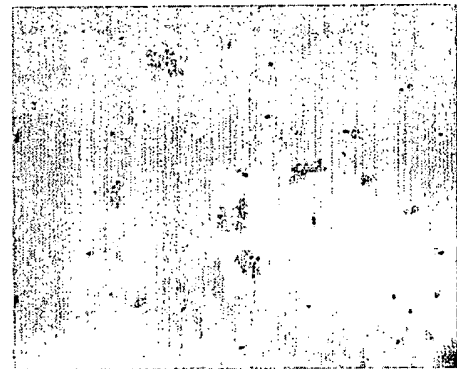


Fig. 18

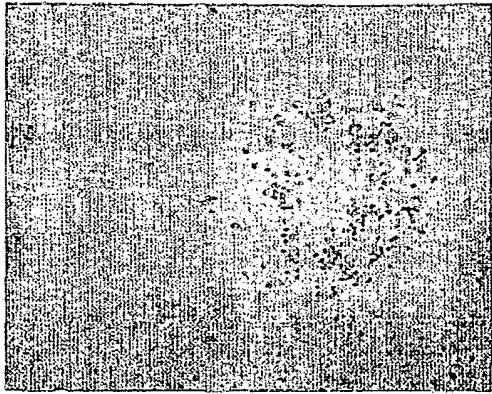


Fig 19

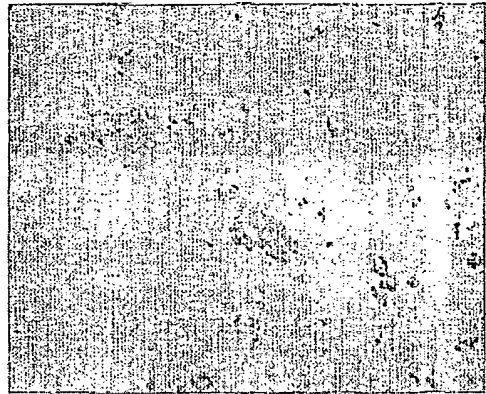


Fig 20

Local 18		Local 20	
Tratamento convencional		Tratamento convencional	
1 g/L de formulação líquida de YGP-GET		1 g/L de formulação em pó de YGP-GET	
Sem tratamento		Sem tratamento	
4 g/L de formulação líquida de YGP-GET		2 g/L de formulação em pó de YGP-GET	

Fig 21

Local 18

Tratamento convencional
Sem tratamento
2 g/L de formulação líquida de YGP-GET

Local 20

Sem tratamento
2 g/L de formulação líquida de YGP-GET
Sem tratamento

Fig 22

4 g/L de formulação líquida de YGP-GET
Sem tratamento

Fig 23

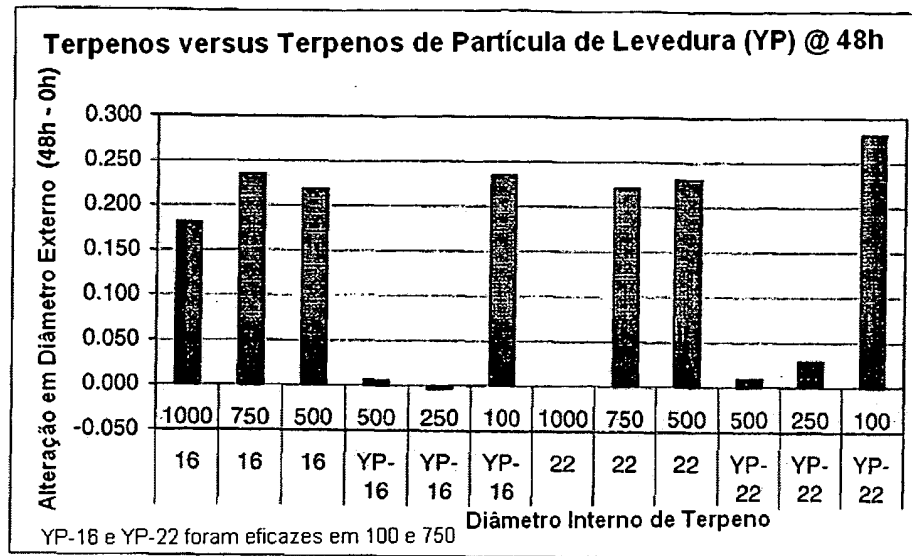


Fig. 24

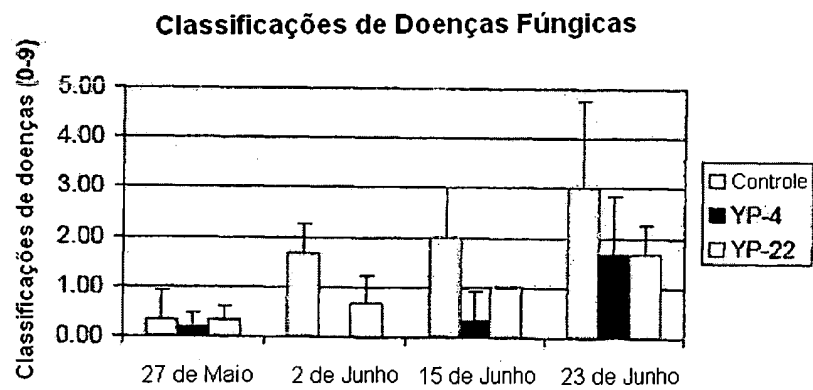


Fig. 25

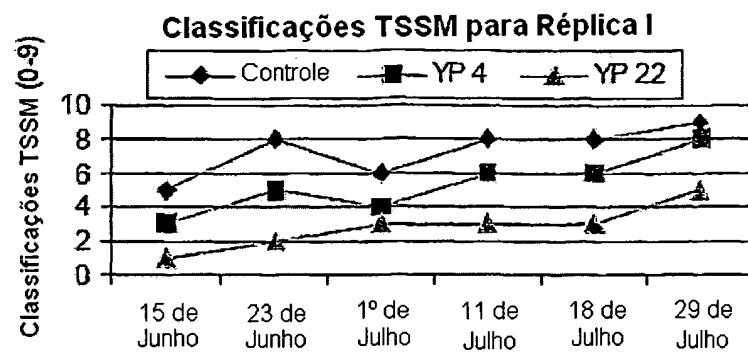


Fig. 26a

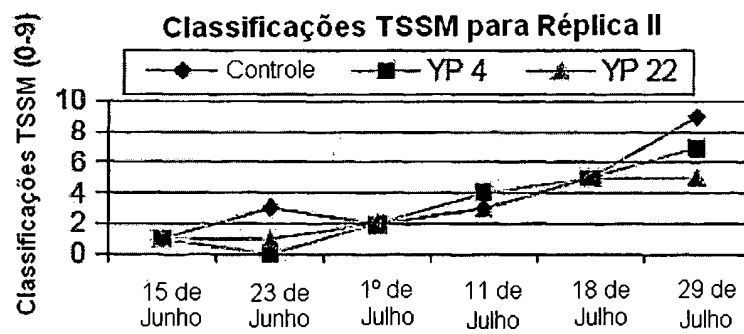


Fig. 26b

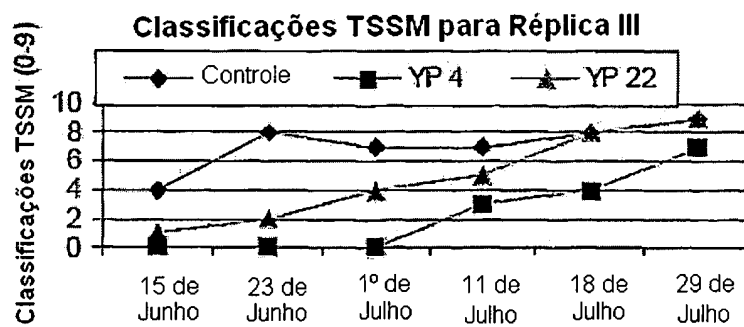
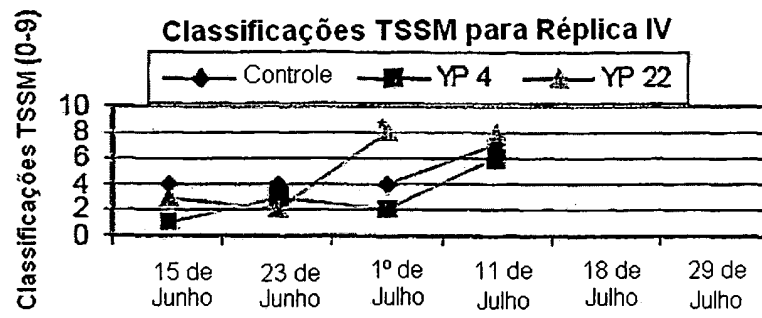


Fig. 26c



**Plantas na Réplica IV foram removidas.

Fig. 26d

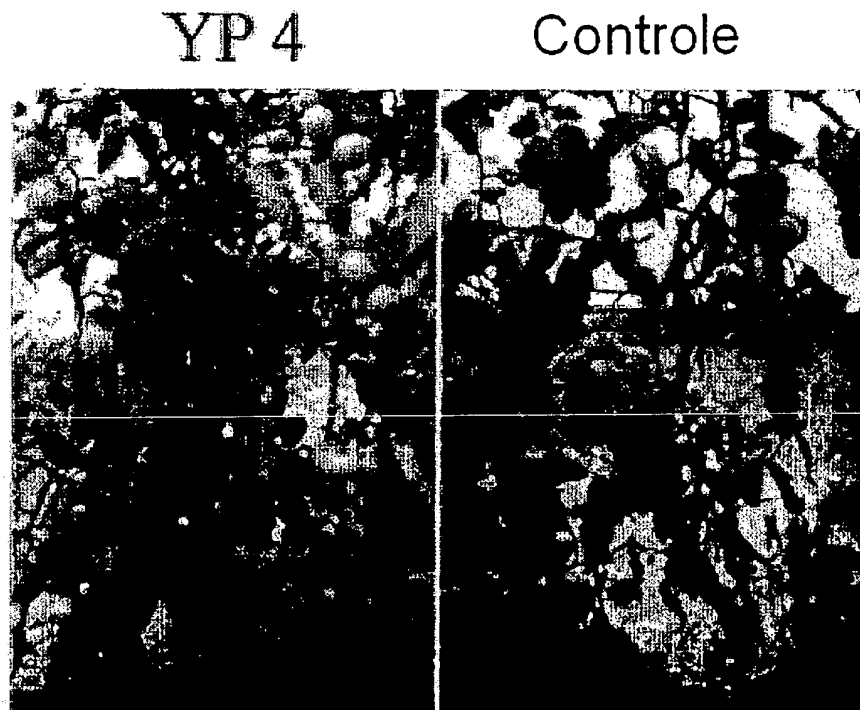


Fig. 27

MÉTODO PARA MATAR UM INSETO OU ARACNÍDEO, MÉTODO PARA
TRATAR OU IMPEDIR A INFESTAÇÃO DE UMA PLANTA E USO DE UMA
COMPOSIÇÃO

A presente invenção refere-se a composições que
5 compreendem terpenos e partículas de glucana ocas e
partículas de parede celular e métodos para preparar tais
composições. As composições aumentam a estabilidade e
atividade de terpeno e propiciam um carreador adequado para
os terpenos. A invenção também se refere a métodos para
10 utilizar tais composições nos campos médico, veterinário e
agrícola.