



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112018004764-3 B1



(22) Data do Depósito: 09/09/2016

(45) Data de Concessão: 07/06/2022

(54) Título: COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA COMPREENDENDO NATAMICINA E ÁCIDOS GRAXOS C4-C22, MONOGLICERÍDEOS DESTES ÁCIDOS GRAXOS E/OU DERIVADOS DESTES ÁCIDOS GRAXOS

(51) Int.Cl.: A23L 3/3463; A01N 43/90; A23B 7/10; A23B 7/154; A01P 3/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 09/09/2015 EP 15184512.0; 18/04/2016 US 62/324,192.

(73) Titular(es): AREC CROP PROTECTION B.V..

(72) Inventor(es): JACOBUS STARK; CHRISTIAAN GERARDUS JOHANNES MARIA JANS; WILHELMUS MARIA VAN DER KRIEKEN.

(86) Pedido PCT: PCT NL2016050627 de 09/09/2016

(87) Publicação PCT: WO 2017/043972 de 16/03/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/03/2018

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA COMPREENDENDO NATAMICINA E ÁCIDOS GRAXOS C4-C22, MONOGLICERÍDEOS DESTES ÁCIDOS GRAXOS E/OU DERIVADOS DESTES ÁCIDOS GRAXOS. A invenção se refere a uma composição compreendendo natamicina e pelo menos um composto selecionado a partir de ácidos graxos C4-C22, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos. A invenção se refere adicionalmente aos métodos que empregam a dita composição para proteger uma planta ou parte de planta, para aprimorar o desenvolvimento e/ou rendimento de uma planta agrícola, e para proteger um solo e/ou um substrato de crescimento.

"COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA COMPREENDENDO NATAMICINA E ÁCIDOS GRAXOS C4-C22, MONOGLICERÍDEOS DESTES ÁCIDOS GRAXOS E/OU DERIVADOS DESTES ÁCIDOS GRAXOS"

[0001] A invenção se refere a composições para controlar doenças de fungos em plantas e partes de planta e para aprimorar o desenvolvimento e o rendimento das plantas.

[0002] Plantas podem ser atacadas por muitos tipos diferentes de fungos fitopatogênicos o que causa perdas tremendas em colheitas pelo mundo. Doenças de planta podem reduzir drasticamente o rendimento e a qualidade das colheitas. Ainda em fruta, nozes e vegetais coletados, existe uma grande variedade de espécies de bolor que causam deterioração e a perda de qualidade. Estimativas em perdas de safra diretas que podem ser atribuídas aos bolores são de 25 a 30% da produção de safra mundial. Para perdas de safra individuais podem ser muito maiores, especialmente nos sistemas de colheita intensivos e quando condições climáticas são favoráveis para o desenvolvimento de bolor. Até mesmo colheitas completas podem ser destruídas. Onde no mundo desenvolvido, perdas são de principal importância a partir do ponto de vista econômico, o impacto em países em desenvolvimento é muito maior: pode levar a uma falta de produtos alimentícios básicos tais como arroz, milho e bananas. Ainda com relação à população crescente no mundo, é de total importância aprimorar a produção de alimentos mundial aprimorando o rendimento e evitando perdas.

[0003] Bolores também podem causar perdas devido à produção de micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos tóxicos/carcinogênicos produzidos por certos fungos

filamentosos. Níveis muito altos de micotoxina em uma safra, quando notados, vão resultar em diminuição do valor ou destruição total do produto. No entanto, é questionável se as micotoxinas são sempre detectadas e se medidas suficientes são tomadas, especialmente nos países em desenvolvimento. É estimado que durante o crescimento e armazenamento cerca de 25% das colheitas são afetadas pelas micotoxinas, o que é uma preocupação grave com relação à saúde humana e animal. Efeitos agudos devido às grandes quantidades de micotoxinas presentes em alimentos ou alimentação são comumente restritos aos países em desenvolvimento ou ao gado. Quando presentes em baixas concentrações as micotoxinas podem causar efeitos crônicos levando, por exemplo, ao câncer e são de preocupação para a saúde a longo prazo da população.

[0004] Exemplos de micotoxinas produzidas pelos bolores patogênicos das plantas e as safras agrícolas em que eles podem ocorrer são: (1) aflatoxinas (por exemplo, em cereais tais como milho e grãos, nozes tais como amendoins e pistaches, fruta e ervas) formados, por exemplo, por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*; (2) ocratoxina A (por exemplo, em cereais tais como milho, grão e cevada, café, cacau, uvas e nozes) é excretado, por exemplo, por *A. ochraceus* e *Penicillium verrucosum*; (3) patulina (principalmente em maçãs, mas também em outras frutas, vegetais e cereais) é produzida por certas espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*; (4) deoxinivalenol também conhecido como DON (principalmente em cereais e grãos tal como trigo, cevada, aveia, centeio, milho, sorgo e arroz) é formado, por exemplo, por *Fusarium graminearum* e *Fusarium*

culmorum. Outros exemplos de micotoxinas que podem estar presentes em safras são fuminosinas, tricotecenos, zearalenona, citrinina e ácido ciclopiazônico.

[0005] O crescimento de bolor também pode resultar em perda de nutrientes, formação de sabores fora do normal e destruição de tecido que causa perda de qualidade após o processamento. Em muitos casos, infestações de bolor ocorrem no campo depois que o bolor se desenvolve durante o armazenamento se as condições são favoráveis, resultando em perdas após a colheita, por exemplo, de grão, semente, bulbos de flor, batatas semente, fruta e vegetais ou bolor em alimentos processados, tais como, cereais de café da manhã, sucos ou cortes de fruta.

[0006] Fungos patogênicos de planta no solo, no campo (nas partes de planta agrícola, tais como, sementes, bulbos e plantas) e após a colheita (por exemplo, em cereais, vegetais e frutas) em geral são controlados por fungicidas sintéticos. No entanto, muitos fungicidas perdem a sua atividade durante os anos devido ao seu uso repetido o que resulta no desenvolvimento de resistência aos fungos. Isto ocorre até no caso de novos pesticidas que estão no mercado apenas por um curto período de tempo. Em adição, o crescimento de monoculturas (por exemplo, a cepa de *Cavendish* de banana) resulta em uma seleção mais rápida de cepas de bolor patogênico de planta resistentes. O desenvolvimento da resistência sempre vai resultar em um número crescente de tratamentos e a aplicação de maiores quantidades e/ou mais fungicidas. A aplicação de agroquímicos em concentrações

muito altas ou usando coquetéis de agroquímicos geralmente resulta em efeitos fitotóxicos na safra em si.

[0007] Muitos fungicidas atualmente no mercado vão interromper ecossistemas naturais causando efeitos prejudiciais, por exemplo, contaminando fontes de água ou por causa dos seus efeitos indesejáveis nos organismos não alvo. Além da poluição ambiental, problemas de saúde humana especialmente com relação à segurança dos trabalhadores também é um problema importante. Em adição, altos níveis de resíduo de fungicidas perigosos em produtos agrícolas no momento do consumo, até excedendo os limites de resíduo máximo, é um ponto de preocupação sério. Consumidores e reguladores governamentais possuem preocupações crescentes resultando em regulação mais estrita, por exemplo, na União Europeia, nos EUA, Japão e em muitos outros países. Mais e mais, agroquímicos sintéticos foram banidos e serão banidos nos próximos anos. É claro que, a partir de um ponto de vista ambiental e de saúde, este é um desenvolvimento positivo; por outro lado, estas medidas geram problemas com relação ao combate aos bolores na agricultura e assim para o suprimento de alimentos mundial.

[0008] Até hoje, relativamente poucos fungicidas naturais, os assim chamados antimicrobianos naturais ou bio(pesti)cidas, estão no mercado. A disponibilidade comercial de biocidas tal como culturas bacterianas, extratos de planta ou outros compostos a partir de uma origem natural pode ajudar a diminuir o impacto negativo de agroquímicos sintéticos. No entanto, em geral parece ser que

os assim chamados biocidas não são eficazes o suficiente e assim não oferecem solução real.

[0009] Pode ser concluído que, apesar da disponibilidade de muitos fungicidas comerciais e o seu uso extensivo, bolores ainda se desenvolvem em quase todas as colheitas e produtos agrícolas colhidos. Em adição, pode ser concluído que na agricultura existe uma grande necessidade por alternativas ambientalmente amigáveis para substituir os fungicidas sintéticos perigosos que estão sendo aplicados hoje.

[0010] Por muitas décadas o polieno macrolídeo antifúngico natamicina tem sido usado para evitar o crescimento de fungos em produtos alimentícios, principalmente queijos e linguiças fermentadas secas. Natamicina foi primeiramente descrita em 1957 e é produzida pela fermentação usando uma espécie de *Streptomyces*, por exemplo, *Streptomyces natalensis*. Atualmente este antimicrobiano natural é bastante usado pelo do mundo como um aditivo alimentício.

[0011] A natamicina possui uma longa história de uso seguro e, mais importante, até agora, bolores resistentes nunca foram encontrados. Durante os anos, bastante literatura tem sido publicada descrevendo o uso potencial de natamicina em muitas aplicações. No entanto, apesar da sua grande atividade contra bolores, pode ser observado que isto quase nunca resulta no uso comercial na agricultura. Isto justifica a conclusão de que a eficácia de natamicina na agricultura na prática real não foi boa o suficiente.

[0012] A atividade antifúngica de ácidos graxos, monoglicerídeos e derivados de ácidos graxos em geral é conhecida. Já em 1899, Clark descreveu as propriedades antifúngicas de ácidos graxos (Clark, 1899. Botan Gaz 28: 289-327). Trabalho mais recente em que o efeito de certos ácidos graxos contra o crescimento de fungos patogênicos de planta foi examinado compreende o estudo de Altieri et al. (Altieri et al., 2009. Int J Food Science Techn 44: 242-245), que descreve a atividade antifúngica de ácido láurico, ácido mirístico e ácido palmítico e os seus monoglicerídeos contra cepas de *Fusarium*. Um segundo exemplo de trabalho mais recente é o estudo de Liu et al. (Liu et al., 2008. Mycopathologia 166: 93-102), que avalia a atividade antifúngica de nove ácidos graxos contra quatro fungos patogênicos. Algumas vezes resultados promissores para controlar patogênicos de planta foram reportados. No entanto, as concentrações necessárias foram bem altas e os resultados *in vivo* não foram realmente convincentes. O uso de ácidos graxos como antimicrobiano natural em proteção de safra, portanto, não é existente ou é muito limitado.

[0013] Pode ser concluído que existe uma necessidade grave por soluções naturais para o combate aos bolores e redução de perdas econômicas na agricultura.

[0014] A presente invenção se refere a uma nova composição antifúngica sinérgica compreendendo natamicina e pelo menos um composto da família de ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos. O comprimento de cadeia dos ácidos graxos, monoglicerídeos dos mesmos e/ou derivados dos mesmos no

escopo desta invenção é de 4 a 22. A invenção, portanto, provê uma composição antifúngica compreendendo natamicina e pelo menos um composto selecionado a partir do grupo que consiste de ácidos graxos C4-C22, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos.

[0015] Surpreendentemente, foi descoberto que quando uma safra agrícola (por exemplo, uma planta ornamental, planta vegetal ou árvore), uma parte de planta agrícola (por exemplo, uma semente, flor, bulbo, batata semente, cereal, fruta, favo, noz, vegetal ou flor) ou um meio a ser plantado (por exemplo, um solo, substrato de crescimento, substratos de crescimento de cogumelo, artificial substrato de crescimento, composto, água aplicada para irrigação, por exemplo, em estufas ou grânulo nutriente adicionado para o solo) é tratado com uma composição da invenção, a colheita ou produto coletado sofre menos a partir de infestações de bolor. Surpreendentemente, um efeito sinérgico claro entre natamicina e ácidos graxos, os seus monoglicerídeos e/ou o seus derivados foi encontrado.

[0016] Fungicidas de polieno foram reportados por interagir com a membrana plasmática, especialmente com esteróis de membrana de fungos. Apesar do modo de ação da natamicina ser reportado por diferir daquele de outros fungicidas de polieno, alguns relatórios também descrevem a interação de natamicina com o principal esterol fúngico, ergosterol (te Welscher et al., 2008. J Biol Chem 283: 6393-6401), modulando desta forma a fluidez da membrana e a função de enzimas de ligação de membrana. Sem estar limitado pela teoria, um ácido graxo que está presente em uma membrana

celular pode ajudar a fluidizar uma membrana, resultando na interação aprimorada entre a natamicina e o ergosterol.

[0017] O termo "ácidos graxos", como é usado aqui, inclui referência aos ácidos graxos e aos sais de ácidos graxos tais como sais de sódio, potássio e amônio de ácidos graxos.

[0018] Ácidos graxos podem ser saturados ou não saturados (cis, trans), possuir uma cadeia linear ou não. Compostos preferidos selecionados a partir do grupo que consiste de ácidos graxos C4-C22, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos são ácidos graxos C8-C20, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos, mais preferidos ácidos graxos C12-C18, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos. Os ditos ácidos graxos incluem ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e/ou ácido linoleico, e monoglicerídeos de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e/ou ácido linoleico e/ou derivados de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e/ou ácido linoleico.

[0019] Ácidos graxos preferidos são ácido butírico (4:0), ácido capróico (6:0), ácido caprílico (8:0), ácido cáprico (10:0), ácido undecilênico (11:1), ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (18:1 cis-9), ácido elaidico (18:1 trans-9), ácido linoleico (C18:2), ácido linolênico (18:3), ácido linolelaidico (18:2), e ácido araquidônico (20:4).

[0020] Monoglicerídeos preferidos incluem um monoglicerídeo de ácido láurico (por exemplo, 1-mono-laurina), um monoglicerídeo de ácido mirístico (por exemplo, 1-mono-miristina), e um monoglicerídeo de ácido palmítico (por exemplo, 1-mono-palmitina).

[0021] Derivados preferidos de ácidos graxos são aldeídos, acetatos, ésteres de etila, amidas ou amidas substituídas de ácido butírico (4:0), ácido caproico (6:0), ácido caprílico (8:0), ácido cáprico (10:0), ácido undecilenico (11:1), ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18: 1, cis-9), ácido elaidico (18:1 trans-9), ácido linoleico (18:2), ácido linolênico (18:3), ácido linolelaidico (18:2), ácido araquidônico (20:4).

[0022] Com uma composição da invenção vários problemas são resolvidos: devido ao efeito sinérgico da natamicina e ácidos graxos ou monoglicerídeos e/ou derivados dos mesmos, uma melhor eficácia é alcançada e menos natamicina é necessária. Isto é de importância a partir de um ponto de vista econômico. Quando combinado em um coquetel com outros fungicidas naturais ou sintéticos também menos destes outros fungicidas é necessário resultando na redução de custo, um produto mais seguro, menos resíduos e menos poluição ambiental. Devido ao fato de que uma melhor eficácia também é obtida quando uma composição da invenção é usada, o custo em uso será menor. A partir de um ponto de vista econômico, natamicina agora é muito cara para a maioria das aplicações agrícolas o que limita o uso deste antifúngico

biológico ambientalmente amigável na agricultura. Com a presente invenção este problema é resolvido e a aplicação vasta na agricultura de um produto biológico ambientalmente amigável, seguro e eficaz contra bolores vai se tornar realidade.

[0023] Sem estar limitado pela teoria, pelo menos parte do efeito sinérgico que é observado entre natamicina e ácidos graxos, monoglicerídeos e/ou derivados dos mesmos pode ser devido a uma solubilidade aprimorada da natamicina em uma composição aquosa compreendendo ácidos graxos ou monoglicerídeos e/ou derivados dos mesmos. Na ausência de ácidos graxos, monoglicerídeos e/ou derivados dos mesmos, a solubilidade de natamicina está entre 25 e 50 ppm, dependendo da temperatura. Na presença de ácidos graxos, monoglicerídeos e/ou derivados dos mesmos, a solubilidade de natamicina é aumentada em um pH entre 5 e 9. A solubilidade aprimorada foi observada especialmente para a natamicina purificada, e foi observada para diferentes bateladas de diferentes produtores, incluindo Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd. (Jinan, China), Chihon Biotechnology Co., Ltd. (Luoyang, China), e Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha).

[0024] A composição antifúngica de acordo com a invenção compreende de 1% a 98% (p/p) de natamicina, preferencialmente a partir de 5% a 90% de natamicina, mais preferencialmente a partir de 10% a 85% de natamicina, mais preferencialmente a partir de 20% a 80% de natamicina, ainda mais preferencialmente 6% a 60% (p/p) de natamicina.

[0025] Uma composição antifúngica de acordo com a invenção preferencialmente compreende 0,01% a 25% (p/p), preferencialmente 0,1% a 10% (p/p) de pelo menos um composto selecionado a partir de ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos.

[0026] Uma composição antifúngica preferida de acordo com a invenção compreende de 6% a 60% (p/p) de natamicina e 0,1% a 10% (p/p) de pelo menos um composto selecionado a partir de ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos.

[0027] Uma composição antifúngica de acordo com a invenção preferencialmente compreende pelo menos dois compostos selecionados a partir do grupo que consiste de ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos, preferencialmente em que cada um dos ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos está presente em 0,1% a 10% (p/p).

[0028] O pH de uma composição da invenção preferencialmente está entre o pH de 5 a 9, mais preferencialmente entre 6 e 8, tal como cerca de 7 ou 7,5. Se for necessário, o pH de uma composição da invenção pode ser ajustado com uma base ou um ácido, como é conhecido de um perito na técnica.

[0029] Uma composição da invenção preferencialmente é moída, por exemplo, usando um moinho de esferas tal como Dynomill®. O tamanho de partícula médio de natamicina preferencialmente está entre 0,2 e 10 micrometros, preferencialmente entre 0,5 e 5 micrometros, mais

preferencialmente entre 0,5 e 2 micrometros. Métodos para determinar o tamanho de partícula médio de uma composição de acordo com a invenção são conhecidos técnico no assunto. Por exemplo, Hukkanen e Braatz, 2003. *Sensors and Actuators B* 96: 451-459, discutem vários métodos que podem ser usados para determinar o tamanho de partícula médio de uma composição, incluindo espalhamento de luz frontal e extinção ultrassônica. Um método preferido é baseado em análise de difração de laser, por exemplo, usando um Analysette 22-MicroTec mais dimensionador de partícula a laser (Fritsch, Idar-Oberstein, Alemanha).

[0030] Uma composição antifúngica preferida adicional de acordo com a invenção compreende pelo menos quatro compostos selecionados a partir do grupo que consiste de ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos, preferencialmente em que cada um dos ácidos graxos, monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos está presente em 0,1% a 10% (p/p). Uma composição da invenção pode incluir matéria celular. A dita natamicina em uma composição de acordo com a invenção preferencialmente é produzida pela fermentação de biomassa através de um organismo fermentador e a matéria celular que está presente na composição é a partir do dito organismo de fermentação que produz natamicina.

[0031] A dita matéria celular preferencialmente inclui compostos que são remanescentes de bactéria produtoras de natamicina, ou compostos excretados pela bactéria produtora de natamicina. Exemplos de tais compostos

são compostos do envelope da célula bacteriana, que inclui a membrana plasmática e a parede celular de uma bactéria que produz natamicina. Tais compostos incluem fosfolipídeos, tais como fosfolipídeos e glicolipídeos que, com a hidrólise, tal como pela adição de hidróxido de sódio, resultam em ácidos graxos, tais como ácidos graxos C16-C18.

[0032] Componentes adicionais de matéria celular a partir de uma bactéria produtora de natamicina que pode estar presente em uma composição da invenção, por exemplo, são peptideoglicanos (poli-N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico) ou mureína, ácido teicoico (por exemplo, polissacarídeos bacterianos de glicerol fosfato ou ribitol fosfato ligados através de ligações de fosfodiéster), ácido glutâmico, L, galactose, glicose, manose, frutose, galactosamina, N-acetil glucosamina, ácido murâmico, carboidratos, ribitol, peptídeos, ácido L-diaminopimélico, glicina, alanina, esteróis, e/ou proteínas tais como proteínas envolvidas no contato célula - célula, reconhecimento de superfície, contato do citoesqueleto, sinalização, atividade enzimática ou substâncias de transporte através da membrana da bactéria produtora de natamicina.

[0033] Os ditos componentes adicionais podem incluir adicionalmente compostos presentes no citoplasma, plasmídeos, DNA, RNA, ribossomos, membranas intracelulares, enzimas, estruturas de armazenamento de nutriente, tais como glicogênio, estruturas de lipídeo, estruturas de proteína e estruturas de açúcar.

[0034] Deve ser entendido que qualquer um dos componentes de matéria celular, como descritos aqui, pode ser combinado como se cada e toda combinação fosse individualmente listada. Por exemplo, a composição pode incluir natamicina, ácidos graxos, proteínas, glicose e amido.

[0035] O caldo de fermentação pode ser produzido por um processo de fermentação adequado usando bactéria que produz natamicina. Tal bactéria pode incluir, por exemplo, *Streptomyces natalensis* e *Streptomyces gilvosporeus*.

[0036] Qualquer meio adequado para a fermentação de uma cepa de produção específica pode ser aplicado. Por exemplo, o meio de fermentação pode conter fontes de alimentação suficientes e nutrientes, tais como fontes de carbono e nitrogênio metabolizáveis, fatores de crescimento, elementos inorgânicos e elementos traço. O meio para fermentação pode ser preparado em água e pode incluir uma combinação de um ou mais dos seguintes compostos:

uma fonte de nitrogênio tal como extrato de levedura e/ou proteínas que não são de levedura, tais como hidrolisados de proteína, peptonas, proteínas de soja, extrato de carne;

uma fonte de carbono metabolizável tal como glicose, melaço, lactose, polissacarídeos, licor de imersão de milho, amido de milho, e amido de batata;

fatores de crescimento tais como vitaminas;

elementos inorgânicos tais como sulfato de cálcio, potássio, sódio, magnésio, amônio; e/ou

elementos traço tais como zinco, cobre, ferro, boro e cobalto.

[0037] O meio de fermentação pode adicionalmente incluir agentes antiespumantes tais como desespumante de silicone para controlar a formação de espuma durante a fermentação.

[0038] A fermentação pode ser realizada em qualquer recipiente de fermentação adequado, usando qualquer técnica adequada ou métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o meio de fermentação pode ser trazido para uma temperatura adequada, por exemplo, entre 28° e 35°C, inoculado com uma cepa de produção, e incubado por um período de tempo suficiente. O tempo de fermentação pode depender de vários fatores, incluindo a composição do meio de fermentação, a temperatura de incubação, o fornecimento de oxigênio, o equipamento de agitação, a qualidade do inóculo e o desenvolvimento da fermentação. Por exemplo, o tempo de fermentação pode ser de 60 a 170 horas.

[0039] Durante a fermentação oxigênio e/ou ar são fornecidos para manter um nível adequado de oxigênio dissolvido no meio de fermentação durante a parte principal da fermentação, uma fonte de alimentação tal como a fonte de carbono é fornecida em uma taxa suficiente e o pH pode ser controlado.

[0040] Uma composição de natamicina pode ser recuperada a partir do caldo de fermentação usando diferentes métodos. Por exemplo, o caldo de fermentação, incluindo o meio de fermentação e células do organismo de produção, é tratado para eliminar pelo menos uma porção das, ou todas,

as células vivas do organismo de produção. A eliminação das células do organismo de produção também pode ser executada após uma ou mais etapas de processamento tais como as etapas de processamento necessárias para concentrar o caldo de fermentação através de qualquer método adequado tal como evaporação, filtração e centrifugação. Para aprimorar a evaporação ou a filtração, o caldo de fermentação pode ser aquecido. Por exemplo, em uma variação, o caldo de fermentação é aquecido até uma temperatura entre 50 e 70 °C.

[0041] A desintegração da biomassa pode ser realizada usando qualquer método conhecido na técnica. Outros exemplos de tais métodos para a lise das células de produção incluem, por exemplo, o uso de uma etapa de tratamento de calor que é realizada por um período de tempo suficiente em uma temperatura suficiente; um tratamento de pH através da adição de compostos para aumentar ou diminuir o pH para valores que resultam em uma incubação alcalina ou ácida do caldo de fermentação; o uso de agentes antimicrobianos; usando agentes ativos em superfície tais como enzimas de degradação de parede celular ou tensoativos químicos para danificar a membrana celular do organismo de produção; o uso de tecnologias de interrupção tais como homogeneização, tratamento ultrassônico, tratamento eletrostático, campo magnético, misturação de alto cisalhamento, etc.; um solvente orgânico tal como metanol e/ou etanol, e um ou mais dos métodos descritos acima podem ser aplicados para gerar natamicina. A desintegração da biomassa pode resultar na lise e a destruição de todas as células da cepa de produção. Em adição, a desintegração pode

resultar na fragmentação das estruturas celulares, especialmente a hifa e na solubilização de constituintes celulares. Vários métodos e técnicas são conhecidos no estado da técnica para verificar a desintegração das células do organismo de produção, por exemplo, por microscopia, medindo a viscosidade da biomassa, ou determinando o desenvolvimento das colônias em um meio de crescimento adequado em uma placa de agar.

[0042] Um método preferido de produção de uma composição de natamicina compreende fornecer um caldo de fermentação compreendendo natamicina; filtrar o caldo de fermentação para obter um bolo de filtração, em que o bolo de filtração compreende natamicina; tratar o bolo de filtração com metanol ou etanol para desintegrar a biomassa, dissolver pelo menos uma porção da natamicina no bolo de filtração tratado, preferencialmente aumentando o pH do bolo de filtração tratado, por exemplo, com hidróxido de sódio aquoso, para produzir uma solução de natamicina; extrair a solução de natamicina; com etanol ou metanol, preferencialmente metanol; e precipitar pelo menos uma porção de natamicina a partir da solução de natamicina através da neutralização do pH para obter natamicina. Em adição, sais tais como CaCl_2 e NaCl podem ser adicionados para aprimorar o processo de recuperação, enquanto acetona e sais tais como sulfato de amônio podem ser usados para fazer o *salting out* do caldo de fermentação.

[0043] Como é conhecido por um técnico no assunto, uma composição compreendendo natamicina e pelo menos um composto selecionado a partir de ácidos graxos C4-C22,

monoglicerídeos destes ácidos graxos e/ou derivados destes ácidos graxos, podem ser obtidos usando metanol e/ou etanol para a desintegração da biomassa, preferencialmente metanol e/ou como solventes orgânicos. Usos repetidos de etanol, ou o uso de solventes orgânicos tal como isopropanol, butanol e/ou propanol resulta em uma redução da quantidade de ácidos graxos que está presente na composição de natamicina.

[0044] A dissolução de pelo menos uma porção da natamicina no bolo de filtração tratado compreende aumentar o pH do bolo de filtração tratado. Em uma variação, o pH é aumentado até cerca de pH 10. Quaisquer bases adequadas podem ser usadas para aumentar o pH. Por exemplo, uma base adequada é hidróxido de sódio (NaOH). Quando a base é usada, então a precipitação de pelo menos uma porção da natamicina a partir da solução de natamicina compreende adicionar um ácido para obter um pH de cerca de 6 a 7. Tal ácido pode incluir, por exemplo, ácido clorídrico (HCl).

[0045] A dissolução de pelo menos uma porção da natamicina no bolo de filtração tratado pode, em adição ou como uma alternativa, compreender reduzir o pH do bolo de filtração tratado. Em uma variação, o pH é reduzido até cerca de pH 3. Quaisquer ácidos adequados podem ser usados para reduzir o pH. Por exemplo, um ácido adequado é ácido clorídrico (HCl). Quando um ácido é usado, então a precipitação de pelo menos uma porção de natamicina a partir da solução de natamicina compreende adicionar a base para obter um pH de cerca de 6 a 7. Tal base pode incluir, por exemplo, hidróxido de sódio (NaOH).

[0046] Uma composição da invenção preferencialmente é uma composição aquosa ou não aquosa, preferencialmente oleosa, de estoque concentrada que precisa ser diluída com um diluente adequado tal como, por exemplo, água ou óleo antes do uso; ou uma composição aquosa ou não aquosa pronta para o uso.

[0047] Uma composição da invenção pode ser usada para o tratamento do solo, para preparar um tratamento da semente, um revestimento da semente, uma emulsão de revestimento (por exemplo, para fruta ou plantas no campo), uma cera que é aplicada na fruta (por exemplo, abacaxis, laranjas ou maçãs), um óleo que é aplicado por pulverização nas plantas no campo (por exemplo, bananas). Uma composição da invenção também inclui uma composição seca concentrada tal como por exemplo, um granulado, um pó e/ou um comprimido que pode ser usado para preparar composições para imersões, pulverização ou produtos agrícolas de imersão.

[0048] Uma composição da invenção preferencialmente é um concentrado de suspensão (SC), um grânulo que pode ser disperso em água (WG), um pó molhável (WP), uma suspo emulsão (oleosa) (SE), dispersão em óleo (OD), um concentrado de dispersão (DC), uma composição de tratamento de semente em pó seca (DS), um pó que pode ser transformado em pasta fluida com água (WS), uma composição de tratamento de semente escoável (FS) ou uma composição de tratamento de semente de grânulo que pode ser disperso em água (WG).

[0049] Um "concentrado de suspensão" como usado aqui se refere a uma suspensão de partículas sólidas em um líquido intencionado para a diluição com água antes do uso.

[0050] Um "concentrado de dispersão" como usado aqui se refere a uma dispersão de partículas sólidas em um líquido intencionado para a diluição com água antes do uso.

[0051] O "grânulo que pode ser disperso em água" como usado aqui se refere a uma formulação na forma de grânulo que pode ser disperso em água formando uma dispersão tal como uma suspensão ou solução.

[0052] Um "pó molhável" como usado aqui se refere a uma formulação em pó intencionada a ser misturada com água ou outro líquido antes do uso.

[0053] Um "pó que pode ser transformado em pasta fluida com água" como usado aqui se refere a uma formulação em pó que é feita para uma pasta fluida em água antes do uso.

[0054] Uma composição da invenção preferencialmente compreende um complexo de polieletrólito de um poliânion e um policación como descrito no pedido de patente internacional publicado WO2013/133706, que é incorporado aqui por referência, ou qualquer outra tecnologia de encapsulação conhecida na técnica, por exemplo, lipossomas, estruturas de lipídeo ou células vazias, por exemplo, de levedura em que a composição da invenção é encapsulada.

[0055] O dito complexo de polieletrólito é um complexo de polieletrólitos carregados de maneira oposta (um poliânion e um policación) que formam ligações eletrostáticas fortes. O dito complexo de polieletrólito é um complexo insolúvel. Este complexo sozinho não possui eficácia antimicrobiana. O complexo de polieletrólito possui propriedades aderentes e contém partes polares (carregadas)

e partes apolares. As porções aromáticas no complexo podem ter afinidade por compostos antimicrobianos tais como, por exemplo, natamicina. Em combinação com o caráter aderente do complexo de polieletrólito, o composto antimicrobiano vai ser depositado de maneira ótima e aderido para o solo para o uso na agricultura, horticultura e cultivo de cogumelos.

[0056] O complexo de polieletrólito compreende um poliânion, tal como um composto de lignina, goma xantana, humato e alginato, e um polication, tal como quitosana e poli-alilamina, em uma quantidade relativa entre 1:2 e 60:1 (p/p), mais preferido entre 1:1 e 50:1, mais preferido entre 2:1 e 30:1, tal como cerca de 2:1, cerca de 5:1, cerca de 10:1; cerca de 15:1, cerca de 20:1, cerca de 25:1 e cerca de 30:1 (p/p). As quantidades relativas de um poliânion, preferencialmente um composto de lignina, e um polication, preferencialmente a quitosana, em um complexo de polieletrólito é ainda mais preferido cerca de 5:1 (p/p).

[0057] Poliânions preferidos incluem goma xantana, alginato, um composto de lignina tal como lignosulfonato, pectina, carragenana, ácido húmico, ácido fúlvico, goma angico, goma Kondagogu, sódio alquil naftaleno sulfonato, ácido poli- γ -glutâmico, amido maleico de meio éster, carboximetil celulose, sulfato de condroitina, sulfato de dextrana, ácido hialurônico, e um poliânion sintético tal como poli(ácido acrílico), ácido polifosfórico e poli(L-lactida).

[0058] Polications preferidos incluem poli-L-lisina, epsilon-poli-L-lisina, poli-L-arginina, poli-alilamina, quitosana oligossacarídeo e quitosana. Exemplos de complexos

de polieletrólitos são: (1) complexos de um composto de lignina (tal como cálcio lignosulfonato) e quitosana ou polialilamina; (2) complexos de potássio humato e quitosana ou poli-alilamina.

[0059] O complexo de polieletrólito está preferencialmente presente em uma composição da invenção em uma concentração entre 10 e 800 g/l, mais preferencialmente 50 e 500 e ainda mais preferencialmente 75 e 250 g/l de uma composição da invenção.

[0060] Uma composição de acordo com a invenção preferencialmente compreende adicionalmente um complexo de polieletrólito compreende um poliânion, tal como um composto de lignina, goma xantana, humato e alginato, e um policátion, tal como quitosana ou poli-alilamina, em uma quantidade relativa entre 1:2 e 60:1 (p/p).

[0061] Uma composição da invenção pode compreender adicionalmente pelo menos um composto adicional selecionado a partir do grupo que consiste um tensoativo, um agente aderente, um biocida, um conservante, um estabilizante, um antioxidante, um agente de formação antiespumante, um agente espessante, um protetor de UV e um óleo de pulverização.

[0062] O termo tensoativo, como usado neste pedido, se refere a um agente que diminui a tensão de superfície de um líquido e que permite o espalhamento mais fácil e a distribuição de uma suspensão compreendendo natamicina.

[0063] O dito pelo menos um tensoativo preferencialmente compreende pelo menos um tensoativo aniônico e/ou pelo menos um tensoativo não iônico. O dito tensoativo aniônico é preferencialmente selecionado a partir

lauril sulfato de sódio, um copolímero (met)acrílico de estireno tal como Atlox Metasperse™ 500 L e/ou Atlox Metasperse™ 550S (Croda Crop Care, Snaith Goole, UK), e semelhantes, e tensoativos do tipo sulfosuccinato. Um tensoativo aniônico mais preferido é selecionado a partir de sais de tristirilfenol etoxilados tais como, por exemplo, sulfato de tristirilfenol etoxilado, por exemplo, sulfato de 2,4,6-Tris[1-(fenil)etil]fenil-omega-hidroxipoli(oxietileno) (Soprophor® 4D384), e fosfato de tristirilfenol etoxilado, por exemplo, sal fosfato trietanolamina de éter de 2,4,6-tristirilfenil polietileno glicol (Soprophor® FL); sódio dioctilsulfosuccinato, por exemplo, Geropon® DOS; condensado de naftaleno sulfonato, por exemplo, Morwet® D425; e lauril sulfato de sódio, por exemplo, Heliwet™ NLS90 (Mosselman s.a., B-7011 Ghlin, Bélgica).

[0064] O dito tensoativo não iônico é preferencialmente selecionado a partir da linha Witconol®, a linha Emulpon® e a linha Berol® de Akzo Nobel; a linha Brij®, a linha Synperonic® e a linha Myrj® de Croda; a linha Antarox® de Rhodia, as linhas Serdiox® e Servidox® de Elementis; monolaurato de poli(oxietileno)x-sorbitano, copolímero de enxerto de polimetil metacrilato-polietilenoglicol, e copolímeros de bloco de óxido de etileno/óxido de propileno. Um tensoativo não iônico preferido é selecionado a partir de monolaurato de poli(oxietileno)x-sorbitano, por exemplo, TWEEN® 60, 61 ou 65, copolímero de enxerto de polimetil metacrilato-polietilenoglicol, por exemplo, Atlox™ 4913, copolímero de bloco de óxido de etileno/óxido de propileno,

por exemplo, Synperonic™ PE/L61, ATLAS G-5000 e ATLAS G-5002L,

[0065] O dito pelo menos um tensoativo preferencialmente compreende pelo menos dois tensoativos, pelo menos três tensoativos, pelo menos quatro tensoativos, pelo menos cinco tensoativos, tais como, por exemplo, seis tensoativos, sete tensoativos, oito tensoativos, nove tensoativos, ou dez tensoativos.

[0066] Uma combinação ainda mais preferida de pelo menos dois tensoativos compreende Atlas™ G 5002-L (Croda Crop Care, Cowick Hall, DN14 9AA, UK) e MetaSpense™ 550 S (Croda Crop Care, Cowick Hall, DN14 9AA, UK).

[0067] Os ditos pelo menos dois tensoativos preferencialmente adicionalmente compreendem pelo menos um agente molhante e pelo menos um agente de dispersão. Um agente de dispersão preferido é um condensado de naftaleno sulfonato, por exemplo, alquilnaftalenosulfonato de sódio, condensado de formaldeído (Morwet® D425). Um agente molhante preferido é selecionado a partir dos grupos de etoxilatos de di- ou triestirenofenol fosfatados na forma de fosfato e/ou de sulfonatos de lignina. O agente molhante mais preferido é triestirenofenol fosfato etoxilado, tal como, por exemplo, Soprophor® FL.

[0068] O dito pelo menos um tensoativo, preferencialmente pelo menos dois tensoativos, preferencialmente está presente em uma composição de acordo com a invenção em uma concentração entre 10 e 105 ppm, mais preferido entre 100 e 104 ppm, mais preferido entre 500 e 5000 ppm para cada tensoativo.

[0069] Um agente aderente é preferencialmente selecionado a partir de produtos com base em látex como PROLONG® (Holland Fyto B.V., Holanda) e BOND® (Loveland Industries Ltd), produtos com base em pinoleno/terpeno como NU-FILM® (Hygrotech Saad) e SPRAY-FAST® (Mandops), polissacarídeos de cadeia longa como goma gelana, goma guar, goma succinoglicana (RHEOZAN®; Rhodia) e goma xantana, ou um silicato de magnésio - alumínio hidratado, por exemplo, atapulgita, (Attagel®; BASF). Alternativamente, o agente aderente pode ser um polímero ou copolímero a partir de um tipo de polímero tal como poliacrilato e polietileno por exemplo, NEOCRYL® (DSM, Holanda). Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais agentes aderentes diferentes.

[0070] Um agente aderente preferencialmente está presente em uma quantidade entre 0 e 10^5 ppm, mais preferido entre 100 e 10^4 ppm, mais preferido entre 500 e 5000 ppm.

[0071] Um biocida preferido, além de natamicina, em uma composição de acordo com a invenção inclui um composto antimicrobiano tal como um antifúngico, um antibacteriano, um inseticida e/ou um acaricida. Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais biocidas adicionais, tais como dois ou mais compostos antimicrobianos, dois ou mais herbicidas, dois ou mais inseticidas, dois ou mais acaricidas, dois ou mais bactericidas, ou combinações de, por exemplo, pelo menos um composto antimicrobiano e pelo menos um inseticida, pelo menos um composto antimicrobiano e pelo menos um herbicida, pelo menos um composto antimicrobiano e pelo menos um acaricida, pelo menos um

composto antimicrobiano e pelo menos um bactericida, pelo menos um herbicida e pelo menos um inseticida, pelo menos um herbicida e pelo menos um acaricida, pelo menos um herbicida e pelo menos um bactericida, pelo menos um inseticida e pelo menos um acaricida, pelo menos um inseticida e pelo menos um bactericida, e pelo menos um acaricida e pelo menos um agente para eliminar pragas. Alguns biocidas possuem uma grande faixa de organismos alvo, como é conhecido dos peritos e, portanto, devem ser incluídos em mais do que um subgrupo de biocidas.

[0072] Um composto antimicrobiano preferido é um composto antifúngico. Exemplos de compostos antifúngicos adicionais são pirimetanil, fludioxonil, imazalil, tiabendazol, sódio orto-fenilfenato, pirimetanil, piraclostrobin, boscalid, carbendazim, 2-fenilfenol; 8-hidroxiquinolina sulfato; acibenzolar-5-metil; actinovato; aldimorph; amidoflumet; ampropilfos; ampropilfos-potássio; eoprim; anilazina; azoxistrobin; benalaxil; benodanil; benomil (metil 1-(butilcarbamoil)benzimidazol-2-ilcarbamato); bentiavalicarb-isopropil; benzamacril; benzamacril-isobutil; bilanafos; binapacril; bifenil; blasticidin-S; boscalid; bupirimato; butiobato; butilamina; polissulfeto de cálcio; capsimicin; captafol; captan (N-(triclorometiltio)ciclo-hex-4-eno-1,2-dicarboximida); carbendazim; carboxin; carpropamid; carvona; quinometionat; clobentiazona; clorfenazol; cloroneb; clorothalonil; clozolinato; cis-1-(4-clorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-cicloheptanol; clozylacon; um fungicida de conazol tal como, por exemplo, (RS)-1-(β -aliloxi-2,4-

diclorofenetil)imidazol (imazalil; *Janssen Pharmaceutica NV*,
 Bélgica) e N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]
 imidazol-1-carboxamida (prochloraz); ciazofamid;
 ciflufenamid; cimoxanil; ciprodinil; ciprofuram; Dagger G;
 debacarb; diclofluanid; diclona; diclorofen; diclocymet;
 diclomezina; dicloran; diethofencarb; diflumetorim;
 dimetirimol; dimetomorf; dimoxistrobina; dinocap;
 difenilamina; dipiritiona; ditalimfos; ditianon; dodina;
 drazoxolona; edifenfos; etaboxam; etirimol; etridiazol;
 famoxadona; fenamidona; fenapanil; fenfuram; fenhexamida;
 fenitropan; fenoxanil; fempiclonil; fenpropidina;
 fenpropimorf; ferbam; fluazinam (3-cloro-N-(3-cloro-5-
 trifluórmethyl-2-piridil)- α,α,α -trifluór-2,6-dinitro-p-
 toluidina); flubenzimina; fludioxonil; flumetover; flumorph;
 flúormida; fluoxastrobina; flurprimidol; flusulfamida;
 flutolanil; folpet (N-(triclorometiltio)ftalimida);
 fosetil-Al; fosetil-sódio; fuberidazol; furalaxil;
 furametpyr; furcarbanil; furmeciclox; guazatina;
 hexaclorobenzeno; himexazol; iminoctadina triacetato;
 iminoctadina tris(albesilato); iodocarb; iprobenfos;
 iprodiona; iprovalicarb; irumamicin; isoprofosfinoana;
 isovalediona; kresoxim-metil; mancozeb; maneb; meferimzona;
 mepanipirim; mepronil; metalaxil; metalaxil-M;
 metasulfocarb; metfiroxam; metil 1-(2,3-di-hidro-2,2-
 dimetil-1H-inden-1-il)-1H-imidazol-5-carboxilato; metil 2-
 [[[ciclopropil[(4-metoxifenil)imino]metil]tio]-metil]-
 .alfa.-(metoximetileno)benzenoacetato; metil 2-[2-[3-(4-
 clorofenil)-1-metil-alilideneaminoximetil]fenil]-3-met-
 oxiacrilato; metiram; metominostrobin; metrafenona;

metsulfovax; mildiomicina; monopotássio carbonato;
 miclozolina; N-(3-etil-3,5,5-trimetilciclo-hexil)-3-
 formilamino-2-hidroxi-benzamida; N-(6-metoxi-3-piridinil)
 ciclopropanocarboxamida; N-butil-8-(1,1-dimetiletil)-1-
 oxaspiro[4.5]decan-3-amina, nitrothal-isopropil;
 noviflumuron; ofurace; orisastrobina; oxadixil; ácido
 oxolinico; oxicarboxina; oxifentiina; pencicuron;
 pentiopirade; fosdifen; ftalida; picobenzamid;
 picoxistrobina; piperalina; polioxinas; polioxorim;
 procimidona; propamocarb; propanosina-sódio; propineb;
 proquinazid; piraclostrobina; pirazofos; pirimetanil;
 piroquilona; piroxifur; pirrolnitrina, quinconazol;
 quinoxifen; quintozena; siltiofam; sódio tetratiocarbonato;
 espiroxamina; enxofre; tecloftalame; tecnazeno; tetciclacis;
 fungicida de tiazol tal como, por exemplo, 2-(tiazol-4-
 il)benzimidazol (tiabendazol; por exemplo, o produto
 comercial TECTO® Flowable SC de Syngenta, EUA), ticiofeno;
 tipluzamida; metil tiofanato; tirame; tiadinil; tioximida;
 tolclorfen-metil; tolylfluorid; triazbutil; triazoxida;
 triciclamida; triciclazol; tridemorf; trifloxistrobin;
 validamycin A; vinclozolina; zineb; ziram; zoxamida; (2S)-
 N-[2-[4-[[3-(4-clorofenil)-2-propinil]oxi]-3-metoxifenil]
 etil]-3-metil-2-[(metilsulfonil)amino]butanamida; 1-(1-
 naftalenil)-1H-pirrol-2,5-diona; 2,3,5,6-tetracloro-4-
 (metilsulfonil)piridina; 2,4-di-hidro-5-metoxi-2-metil-4-
 [[[[1-[3-(trifluórmetil)fenil]-etilideno]amino]oxi]metil]
 fenil]-3H-1,2,3-triazol-3-ona; 2-amino-4-metil-N-fenil-5-
 tiazolecarboxamida; 2-cloro-N-(2,3-di-hidro-1,1,3-trimetil-
 1H-inden-4-il)-3-piridinacarboxamida; 3,4,5-tricloro-2,6-

piridinadicarbonitrila; 3-[(3-bromo-6-flúor-2-metil-1H-indol-1-il)sulfonil]-N,N-dimetil-1H-1,2,4-triazole-1-sulfonamida; e sais de cobre tais como mistura de Bordeaux ($\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{CaSO}_4$); hidróxido de cobre; naftalenato de cobre; oxicloreto de cobre ($(\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2)$), sulfato de cobre tribásico ($\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$); cufraneb; óxido cuproso; mancopper; cobre oxina.

[0073] Um biocida adicional de acordo com a invenção também pode ser um biocida natural. O termo biocida natural compreende microrganismos e vírus, feromônios, extratos a partir de plantas e/ou animais, e outras substâncias tais como, por exemplo, minerais. Extratos de planta preferidos são ou compreendem extrato de salvia (= extrato de *Salvia officinalis*), extrato de *Reynoutria sachalinensis* (Golias), extrato de *Verticillium alboatrum*, extrato de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, extrato de *Lecanicillium muscarium*, laminarina, lactoperoxidase, azadiraquitina, harpina, quitosana, extrato de *Pythium* (e outros extratos fúngicos).

[0074] Além de natamicina e ácidos graxos C4-C22, monoglicerídeos e/ou derivados dos mesmos, uma composição da invenção pode compreender um ou mais outros fungicidas, tais como, por exemplo, hidróxido de cobre, um tipo de estrobilurina de fungicidas tal como azoxistrobina, e fosfita, um tipo de triazol de fungicidas como ciproconazol, um tipo de inibidor de succinato desidrogenase de fungicidas tal como boscalida, um tipo de ftalimida / ftalonitrila de fungicidas tal como clorothalonil, folpet e captan, um tipo de benzimidazol de fungicidas tal como tiabendazol, um tipo

de carbamato de fungicidas, tal como propamocarb, um tipo de carboxamida de fungicidas, tal como fenoxanil, um tipo de dicarboxamida de fungicidas, tal como iprodiona, um tipo de ditiocarbamato de fungicidas, tal como Mancozeb, um tipo inorgânico de fungicidas, tal como hidróxido de cobre, um tipo de morfolina de fungicidas, tal como dimetamorph, um tipo de organofosfato de fungicidas, tal como fosetil, um tipo de azol de fungicidas, tal como protioconazol, um tipo de fenilamida de fungicidas como metalaxil, e fungicidas que não pertencem a um grupo específico de fungicidas como fludioxinil.

[0075] Uma fosfita preferida é um sal de fosfita tal como KH_2PO_3 , K_2HPO_3 , NaH_2PO_3 , Na_2HPO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_3$, etil hidrogeno fosfonato, ácido fosfórico, e misturas destes compostos. Uma mistura de KH_2PO_3 e K_2HPO_3 é obtida de maneira adequada adicionando KOH ou K_2CO_3 a uma composição de KH_2PO_3 em um pH final de 5 a 9.

[0076] Um biocida adicional preferido é adicionalmente um inseticida e/ou acaricida. Inseticidas preferidos incluem imidacloprida (produto comercial: ADMIRE®, Bayer) *Bacillus thuringiensis* (produto comercial: TUREX®, Certis USA), teflubenzurona (produto comercial: NOMOLT®, BASF), pimetrozina (produto comercial: PLENUM®, Syngenta) e acetamiprida (Produto comercial: GAZELLE®, Certis Europe), ACTELLIC® Syngenta, Suíça), piretróides (produto comercial BAYGON® (Bayer), bifenazato (por exemplo, Uniroyal), diclorvos (por exemplo, Amvac Chemical Corporation), imidacloprida (por exemplo, Bayer), fenamifos (por exemplo, Mobay Chemical Corporation), óleo de alecrim,

oxamil (por exemplo, Dupont) e inseticidas com base em enxofre. Um inseticida ainda mais preferido é pirimiphos-metil (produto comercial ACTELLIC®, Syngenta, Suíça). Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais inseticidas.

[0077] Acaricidas preferidos incluem clofentezina (produto comercial: APOLLO®, Makhteshim), acequinocil (produto comercial: KAMEMYTE®, Arysta), espirodiclofeno (produto comercial: ENVIDOR®, Bayer CropScience), bifenazato (produto comercial: FLORAMITE®, Certis Europe) e fenbutatinoxida (produto comercial: TORQUE L®, BASF). Um acaricida mais preferido é espirodiclofeno. Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais acaricidas.

[0078] Um inseticida/acaricida mais preferido adicional é um carbamato, por exemplo, alanicarb, aldicarb, aldoxicarb, allixicarb, aminocarb, bendiocarb, benfuracarb, bufencarb, butacarb, butocarboxim, butoxicarboxim, carbaril, carbofuran, carbosulfan, dimetilan, etiofencarb, fenobucarb, fenotiocarb, formetanato, furatiocarb, isoprocarb, metam-sódio, metiocarb, metomil, metolcarb, oxamil, pirimicarb, promecarb, propoxur, tiodicarb, tiofanox, trimetacarb, XMC, xililcarb, triazamato; um organofosfato, por exemplo, acefato, azametifos, azinfos (-metil, -etil), bromofos-etil, bromfenvinfos (-metil), butatiofos, cadusafos, carbofenotiona, cloretoxifos, clorfenvinfos, clormefos, clorpirifos (-metil/-etil), coumafos, cianofenfos, cianofos, clorfenvinfos, demeton-5-metil, demeton-5-metilsulfona, dialifos, diazinona, diclofentiona, dicrotofos, dimetoato, dimetilvinfos, dioxabenzofos, disulfotona, EPN, etiona,

etoprofos, etrimfos, famfur, fenamifos, fenitrothion, fensulfotiothion, fenthion, flupirazofos, fonofos, formotion, fosmetilana, fostiazato, heptenofos, iodofenfos, iprobenfos, isazofos, isofenfos, O-salicilato de isopropila, isoxation, malation, mecarbam, metacrifos, metamidofos, metidation, mevinfos, monocrotofos, naled, ometoato, oxidemeton-metil, parationa (-metil/-etil), fentoato, forato, fosadona, fosmet, fosfamidona, fosfocarb, foxim, pirimifos (-metil/-etil), profenofos, propafos, propetamfos, protiofos, prothoato, piraclofos, piridafentiothion, piridation, quinalfos, sebufos, sulfotep, sulprofos, tebupirimfos, temefos, terbufos, tetrachlorvinfos, tiometona, triazofos, trichlorfona, vamidotiothion; um modulador de canal de sódio/bloqueador de canal de sódio dependente da voltagem, tal como um piretroide, por exemplo, acrinatrina, aletrina (d-cis-trans, d-trans), beta-ciflutrina, bifentrina, bioalletrina, isômero de bioalletrina-S ciclopentil, bioetanometrina, biopermetrina, bioresmetrina, clovaportrina, cis-cipermetrina, cis-resmetrina, cis-permetrina, clocitrina, cicloprotrina, ciflutrina, cihalotrina, cipermetrina (alfa-, beta-, teta-, zeta-), cifenotrina, deltametrina, empentrina (isômero de IR), esfenvalerato, etofenprox, fenflutrina, fenpropatrina, fenpiritrina, fenvalerato, flubrocitrinaato, flucitrinato, flufenprox, flumetrina, fluvalinato, flibfenprox, gama-cihalotrina, imiprotrina, kadetrina, lambda-cihalotrina, metoflutrina, permetrina (cis-, trans-), fenotrina (IR trans-isomer), praletrina, proflutrina, protrifenbuta, piresmetrina, resmetrina, RU 15525, silafluofeno, tau-

fluvalinato, teflutrina, teraletrina, tetrametrina (isômero de IR), tralometrina, transflutrina, ZXI 8901; uma oxadiazina, por exemplo, indoxacarb; um agonista/antagonista de receptor de acetil colina; um cloronicotinil, por exemplo, clotianidina, dinotefurana, imidacloprid, nitenpiram, nitiazina, tiacloprid, tiametoxam; uma nicotina tal como bensultap, cartap; um organocloro, por exemplo, camfeclor, clordano, endosulfan, gama-HCH, HCH, heptaclor, lindano, metoxiclor, a fiproles, por exemplo, acetoprol, etiprol, fipronil, pirafluprol, piriprol, vaniliprol; uma mectina, por exemplo, avermectina, emamectina, emamectina-benzoato, ivermectina, milbemicina; um mimético de hormônio juvenil, por exemplo, diofenolan, epofenonana, fenoxicarb, hidropreno, quinopreno, metopreno, piriproxifen, tripreno; um agonista/interruptor de ecdyson tal como diacil-hidrazinas, por exemplo, cromafenozida, halofenozida, metoxifenozida, tebufenozida; benzoilureas, por exemplo, bistriflúorna, clofluazurona, diflubenzurona, fluazurona, flucicloxurona, flufenoxurona, hexaflumurona, lufenurona, novalurona, noviflumurona, penflúorna, teflubenzurona, triflumurona um organotina, por exemplo, azociclotina, cihexatina, óxido de fenbutatina; um pirrol, por exemplo, clorfenapir; um dinitrofenol, por exemplo, binapacirl, dinobutona, dinocap, um ácido tetronico, por exemplo, espirodiclofeno, espiromesifeno; um ácido tetrâmico, por exemplo, espirotetramat e 3-(2,5-dimetilfenil)-8-metoxi-2-oxo-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-4-il etil carbonato; uma carboxamida, por exemplo, flonicamida; um ácido benzoico dicarboxamida, por exemplo, flubendiamida; azadiraquitina,

um fumegante, por exemplo, fosfeto de alumínio, metil brometo, sulfúril flúoreto; um antialimentante, por exemplo, criolita, flonicamida, pimetrozina; um inibidor de crescimento de ácaros, por exemplo, clofentezina, etoxazol, hexitiazox; amidoflumet, benclothiaz, benzoximato, bifenazato, bromopropilato, buprofezina, quinometionato, clordimeform, clorobenzilato, cloropicrina, clotiazobena, ciclopreno, ciflumetofen, diciclanil, fenoxacrim, fentrifanil, flubenzimina, flufenerim, flutenzina, gossyplure, hidrametilnona, japonilure, metoxadiazona, petróleo, piperonil butóxido, oleato de potássio, piridalil, sulfluramida, tetradifona, tetrasul, triaratenó, e/ou verbutin.

[0079] Um biocida adicional adicionalmente preferido é um bactericida, por exemplo, bronopol, diclorofen, nitrapirin, níquel dimetilditiocarbamato, kasugamicina, octilinona, ácido furancarboxílico, oxitetraciclina, probenazol, estreptomicina, tecloftalam, e sais de cobre. Bactericidas preferidos incluem compostos tais como sais de cobre (por exemplo, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre, sulfato de cobre e mistura de Bordeaux), soforolípideo que é um glicolípideo que é produzido por leveduras tais como *Candida bombicola*, *Candida apicola*, e *Wickerhamiella domercqiae* e é composto de um açúcar dimerico ligado com uma ligação glicosídica com um ácido hidroxil graxo, estreptomicina, o produto comercial CITRICIDAL® (Bio/Chem Research) e validamicina. Uma bactericida ainda mais preferida é hidróxido de cobre. Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais bactericidas.

[0080] Alguns dos compostos indicados possuem mais do que uma atividade. Por exemplo, sais de cobre (por exemplo, hidróxido de cobre) possuem atividades bactericida e fungicida. As atividades dos compostos individuais são conhecidas dos peritos. Em adição, handbooks e sítios de rede (por exemplo, www.frac.info/frac) estão disponíveis para determinar a atividade ou as atividades de um composto.

[0081] Uma composição de acordo com a invenção preferencialmente compreende adicionalmente pelo menos um composto adicional selecionado a partir do grupo que consiste de um conservante, um estabilizante, um antioxidante, um agente de formação de antiespumante, um agente espessante, um protetor de UV e um óleo de pulverização.

[0082] O dito conservante é preferencialmente selecionado a partir de conservantes de ácido fraco tais como ácido sórbico, ácido láctico, ácido benzoico, ácido propiônico, ácido cítrico, ácido acético, ou um metal alcalino ou sal de metal alcalino terroso do mesmo; ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico; um sal de desidratação tal como cloreto de sódio, imidazóis tal como imazalil ou qualquer composto antifungos conhecido na técnica como um conservante para produtos alimentícios, proteção de safra ou após o tratamento de colheita de frutas, vegetais ou cereais; etil parabenzoato; bórax; bissulfito de cálcio; cálcio dissódio EDTA; ácido desidroacético; isotiazóis (por exemplo, KATHON® (Rohm e Haas); um sal de amônio quaternário tal como, por exemplo, cloreto de 1-(3-cloroalil)-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantano (CTAC), e antimicrobianos capazes de evitar o crescimento bacteriano

na composição. Um conservante preferido é um sal de amônio quaternário, preferencialmente CTAC estabilizado com bicarbonato de sódio (Dowicil®75). Um conservante adicionalmente preferido é Kathon™, que preferencialmente está presente em uma concentração de cerca de 0,04 grama/litro. Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais diferentes biocidas. Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais diferentes conservantes.

[0083] Um conservante está preferencialmente presente em uma quantidade entre 0 a até 60% (p/v), mais preferido entre 0,01 até 10 % (p/v), mais preferido entre 0,1 até 5 % (p/v), mais preferido cerca de 0,5 % (p/v) em um produto pronto para o uso para a aplicação para uma safra agrícola, uma planta ou parte de planta, um solo e/ou um substrato de crescimento.

[0084] Um antioxidante, quando presente, preferencialmente é selecionado a partir de aminoácidos (por exemplo, glicina, histidina, tirosina, triptofano) e os seus derivados, imidazol (por exemplo, ácido urocânico) e derivados, vitamina C e derivados (tal como ascorbilpalmitato e ascorbiltetraaisopalmitato, Mg-ascorbilfosfato, Na-ascorbilfosfato, ascorbil-acetato), tocoferol e derivados (tais como vitamina-E-acetato), misturas de vitamina E, vitamina A e derivados (vitamin-A-palmitato e -acetato) bem como coniferil benzoato, ácido rutínico e derivados, α-glicosilrutin, ácido ferúlico, furfurilidenoglucitol, carnosina, butil hidroxitolueno, butil hidroxianisol, e tri-hidroxibuti-rofenona. Uma

composição da invenção também pode compreender dois ou mais diferentes antioxidantes. Um antioxidante preferencialmente está presente em uma quantidade entre 0 até 20% (p/v), mais preferido entre 0,1 até 10 % (p/v), mais preferido entre 1 até 5 % (p/v), mais preferido cerca de 3 % (p/v) em um produto pronto para o uso para a aplicação para uma safra agrícola, uma planta ou parte de planta, um solo e/ou um substrato de crescimento.

[0085] Um agente de formação de antiespumante, quando presente, é preferencialmente selecionado a partir de polimetilsiloxano, simeticona octanol, e óleos de silicone. A composição da invenção também pode compreender dois ou mais diferentes agentes de formação de antiespumante. Um agente antiespumante preferencialmente está presente em uma quantidade entre 0 até 10 % (p/v), mais preferido entre 0,05 até 5 % (p/v), mais preferido entre 0,1 até 1 % (p/v), mais preferido cerca de 0,05 % (p/v) em um produto pronto para o uso para a aplicação para uma safra agrícola, uma planta ou parte de planta, um solo e/ou um substrato de crescimento.

[0086] Um agente espessante, quando presente, é preferencialmente selecionado a partir de agar, ácido algínico, alginato, carragenana, goma gelana, goma xantana, goma succinoglicana, goma guar, adipato de diamido acetilado, amido oxidado acetilado, arabinogalactana, etil celulose, metil celulose, goma de alfarroba, amido sódio octenil succinato, e trietil citrato. Uma composição da invenção também pode compreender dois ou mais diferentes agentes espessantes. Um agente espessante preferencialmente está presente em uma quantidade entre 0 até 10% (p/v), mais

preferido entre 0,01 até 5 % (p/v), mais preferido entre 0,02 até 1 % (p/v), mais preferido cerca de 0,05 % (p/v) em um produto pronto para o uso para a aplicação para uma safra agrícola, uma planta ou parte de planta, um solo e/ou um substrato de crescimento.

[0087] Um protetor de UV ou absorvente de UV, quando presente, é preferencialmente selecionado a partir de taninos sulfonados, dióxido de titânio, sais de humato tais como potássio humato, lignosulfonatos, e compostos relacionados. Um protetor de UV preferencialmente está presente na quantidade entre 0,1 e 10 % (p/v) em um produto pronto para o uso para a aplicação para uma safra agrícola, uma planta ou parte de planta, um solo e/ou um substrato de crescimento.

[0088] Uma composição de acordo com a invenção opcionalmente adicionalmente compreende um óleo de pulverização, por exemplo, um óleo mineral tal como BANOLE(R) ou Spraytex.

[0089] A invenção provê adicionalmente um método para proteger uma planta agrícola ou parte de planta agrícola compreendendo fornecer uma composição de acordo com a invenção e aplicar a dita composição para uma planta agrícola ou parte de planta tal que a planta agrícola ou parte de planta agrícola é contatada com uma quantidade suficiente da dita composição.

[0090] O dito método preferencialmente é para proteger a planta ou parte de planta a partir de um fungo, preferencialmente a partir de um bolor.

[0091] Os termos "planta" e "colheita", como são usados aqui, ambos se referem a uma planta cultivada, árvore ou fungo que é cultivado para alimentos, roupas, forragem de gado, biocombustível, medicina, ou outro uso.

[0092] A dita parte de planta preferencialmente é uma folha, caule, semente, bulbo, bulbo de flor, batata semente, raiz, tubérculo, fruta e/ou vegetal, ainda mais preferencialmente uma semente, bulbo, fruta ou vegetal.

[0093] A invenção adicionalmente provê um método para aprimorar o desenvolvimento e/ou rendimento de uma planta agrícola, compreendendo fornecer uma composição de acordo com a invenção, e contatar a planta com a dita composição.

[0094] Uma composição da invenção pode ser aplicada de muitos modos diferentes. Por exemplo, a dita composição pode ser aplicada através de: (1) pulverização de plantas no campo ou em estufas opcionalmente usando um portador tal como uma cera ou um óleo; (2) imersão de sementes, bulbos ou batatas semente; (3) adição para a parte de planta tal como uma semente ou sistema de raiz por exemplo, através do solo; (4) adição para a parte de planta tal como uma semente, batata semente ou bulbo através de um revestimento de semente ou uma vestimenta de semente; (5) adição para o solo ou substrato de crescimento em que as sementes devem ser plantadas ou germinação e/ou plantas ou cogumelos estão desenvolvendo; (6) adição para água ou sistemas aquáticos aplicados, por exemplo, em estufas ou no campo; (6) tratamento de partes de planta colhidas tais como bulbos,

sementes, cereais, favos, flores, fruta, vegetais ou plantas, por exemplo, por imersão ou pulverização.

[0095] Uma composição da invenção pode ser aplicada sem diluição ou após a diluição. Comumente a composição da invenção será aplicada através de uma diluição aquosa ou diluição oleosa, através de uma vestimenta, revestimento ou uma cera. Uma composição preferencialmente é diluída, preferencialmente entre 10^2 e 10^6 vezes, em uma solução aquosa ou em óleo, para a aplicação nos métodos da invenção. É fácil entender que a quantidade necessária da composição da invenção vai diferir por aplicação já que diferentes aplicações podem precisar de diferentes tratamentos. Em geral, no entanto, a quantidade de composição em uma composição pronta para o uso tal como, por exemplo, uma imersão ou pulverização de suspensão, calculada de volta para a quantidade de natamicina na composição, necessária para tratar o produto (por exemplo, um substrato de crescimento, um solo, uma semente, um bulbo, uma planta no campo ou a fruta coletada) será de 10 a 100.000 ppm de natamicina, mais preferencialmente 30 a 50.000 ppm de natamicina e ainda mais preferencialmente 50 a 5000 ppm de natamicina.

[0096] A quantidade final de natamicina em um solo ou meio de crescimento, em uma planta ou em uma parte de planta colhida pode ser expressão de diferentes modos. Como um primeiro exemplo, a quantidade de natamicina, por exemplo, em uma semente aplicada através de, por exemplo, uma vestimenta de semente ou um revestimento de semente é 0,01 a 20,0 gramas de natamicina por kg de semente, mais

preferencialmente 0,05 a 5,0 gramas de natamicina por kg de semente, ainda mais preferencialmente 0,1 a 2,0 gramas de natamicina por kg de semente. Como um segundo exemplo, uma composição da invenção para a imersão ou pulverização de produtos tal como bulbos de flor, batatas semente, cebolas, maçãs, peras, bananas e abacaxis em geral vai compreender de 0,01 g/l a 100 g/l, preferencialmente 0,03 g/l a 50 g/l e ainda mais preferencialmente 0,05 g/l a 5 g/l de natamicina. Após o tratamento dos produtos tal como bulbos de flor, batatas semente, cebolas, maçãs, peras, bananas e abacaxis, tipicamente a quantidade de natamicina no produto é 0,01 a 20,0 mg/dm²; preferencialmente 0,1 a 10,0 mg/dm². No caso do tratamento de substratos de crescimento de cogumelo, cada tratamento de pulverização vai adicionar 0,01 a 5,0 gramas de natamicina por m² de substrato de crescimento, mais preferencialmente 0,02 a 1,0 gramas de natamicina por m² de substrato de crescimento. No caso de tratamento de um solo em que por exemplo, vegetais ou plantas ornamentais são crescidos 0,01 a 5,0 gramas de natamicina são aplicados por m² que é preferencialmente misturado na camada de topo do solo, mais preferencialmente 0,1 a 1,0 gramas de natamicina por m². No caso de uma aplicação de pulverização em uma cultura no campo uma dosagem típica é de 1 a 5000 gramas de natamicina por hectare, mais preferencialmente 50 a 2000 gramas por hectare. No entanto para uma cultura tal como bananas, a dosagem preferida de natamicina é de 5 a 500 gramas por hectare, mais preferencialmente 10 a 100 gramas por hectare.

[0097] Uma composição da invenção pode ser adicionada em qualquer momento adequado usando qualquer método adequado para o meio de crescimento, solo, planta ou parte de planta; por exemplo, antes, durante ou após o plantio de, por exemplo, uma semente, bulbo, batata semente, um corte ou uma planta jovem; durante o crescimento no campo, após a colheita ou durante o armazenamento de uma fruta, vegetal, noz ou bulbo de flor.

[0098] Uma composição da invenção pode ser usada para preparar composições, por exemplo, para a imersão, mergulho, hidratação, injeção no solo, umedecimento, vaporização, pulverização, pulverização eletrostática, embaçamento, fumegação, escovação, tintura e mistura. Quando usada para proteger uma cultura no campo ou em uma estufa, uma composição da invenção é na sua maioria aplicada como uma suspensão ou solução aquosa ou de óleo através de pulverização ou névoa. Quando aplicado após a colheita, é preferencialmente aplicado por imersão, névoa ou pulverização. Uma composição da invenção também pode ser aplicada através de um sistema de hidratação ou usando um portador tal como um revestimento, vestimenta ou cera.

[0099] A invenção também provê um método para proteger um solo e/ou um substrato de crescimento, o método compreendendo aplicar ao dito solo e/ou substrato de crescimento uma composição de acordo com a invenção. O dito substrato de crescimento preferencialmente é um substrato de crescimento de cogumelo. O solo e/ou um substrato de crescimento preferencialmente é protegido a partir de um fungo, preferencialmente um bolor.

[0100] Uma composição da invenção pode ser aplicada para o tratamento do solo, substrato de crescimento ou substratos de crescimento de cogumelo através de pulverização ou mistura, através de um sistema de hidratação, através de fertilizantes ou através, por exemplo, de um grânulo tal como um grânulo de nutriente.

[0101] Uma composição é preferencialmente aplicada em um solo ou substrato de crescimento para evitar o desenvolvimento de fungos. Exemplos de um solo ou substrato de crescimento são húmus, solo, composto, areia, um revestimento ou camada de topo tal como aplicado no crescimento de cogumelos (por exemplo, *Agaricus bisporus* ou *Pleurotus ostreatus*) e substratos de crescimento artificiais tais como aqueles que são aplicados, por exemplo, em estufas para o crescimento, por exemplo, tomates, pepinos, flores ou plantas, lã de rocha e outros substratos artificiais. A composição da invenção pode ser misturada fisicamente através do substrato de crescimento, injetada no solo, pulverizada no substrato de crescimento, aplicada como um encharcado de solo, aplicada pela imersão no substrato de crescimento ou uma combinação dos ditos métodos. Opcionalmente a composição da invenção pode ser aplicada em um portador pelos métodos bem conhecidos. A composição da invenção também pode ser adicionada para os sistemas de hidratação de circulação tais como aplicados, por exemplo, nas estufas. A dita composição também pode ser adicionada para um solo ou substrato de crescimento misturando o mesmo com um agente para adicionar nutrientes extras tais como grânulos de fertilizante e/ou um agente para evitar o

desenvolvimento de organismos perigosos tais como microrganismos, insetos, nematódeos e ácaros; herbicidas.

[0102] Uma composição da invenção pode ser aplicada, por exemplo, em sementes, bulbos, batatas semente, pedaços de raiz, culturas colhidas e tubérculos, por exemplo, através de imersão ou pulverização opcionalmente através de uma vestimenta ou um revestimento ou por imersão ou *priming*. O tratamento pode ser aplicado a qualquer momento a partir da colheita até a semeadura, por exemplo, após a colheita, durante o armazenamento ou logo antes do plantio.

[0103] Uma composição da invenção é aplicada em partes de planta, incluindo sementes, bulbos, tubérculos, tubérculos raiz, pedaços de raiz e recortes, diretamente ou através de uma vestimenta tal como uma vestimenta de semente ou através de um revestimento tal como um revestimento de semente para evitar o crescimento de especialmente fungos nas ditas partes de planta. Sementes incluem sementes para o crescimento de novas plantas e sementes armazenadas como alimentação ou alimentos. Exemplos são sementes de cereais (por exemplo, milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, aveia, centeio); nozes (por exemplo, amendoins, café, cacau, amêndoas, pistaches); plantas leguminosas (por exemplo, soja, feijões) vegetais (por exemplo, espécies de alface, espécies de repolho, brócolis, espinafre, tomates, páprica, pepinos, cebolas); plantas de fruta (por exemplo, uvas, fruta cítrica, maçãs, peras, fruta pedra); plantas ornamentais (por exemplo, rosas, crisântemo, gerânio, petúnia, begônia); plantas fibrosas (por exemplo, algodão); plantas oleaginosas (por exemplo, rícino, girassol, cacau, nozes moídas); flores

(por exemplo, rosa, lírios, orquídea). Exemplo de plantas de bulbo ou tubérculos são bulbos de flor (por exemplo, tulipa, lírio, hiacinta, açafrão, narciso), batatas semente e cebolas. Um exemplo de um tubérculo de raiz é uma dália.

[0104] Colheitas no campo podem ser pulverizadas em qualquer momento adequado, por exemplo, preventivamente antes de uma infecção de bolor se desenvolver, após uma infecção de bolor se desenvolver, antes / durante / após a floração; antes / durante / após, por exemplo, fruta, nozes e grãos se desenvolverem. Quando o risco de infecção é alto, por exemplo, durante uma estação chuvosa para colheitas tropicais ou no caso de más condições climáticas, uma composição da invenção pode ser aplicada de maneira mais regular. Quando o risco de infecção é menor, intervalos de pulverização podem ser maiores. Culturas colhidas tais como frutas, vegetais, flores e nozes podem ser tratadas, por exemplo, por imersão ou pulverização em qualquer momento após a colheita.

[0105] Exemplos de culturas são cereais (por exemplo, milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, aveia, centeio); fruta tropical (por exemplo, banana, abacaxi, papaia, kiwi e manga); fruta cítrica (por exemplo, laranjas, limões, limas, mandarinas e toranjas); frutas de pomo (por exemplo, maçãs e peras); fruta de pedra (por exemplo, pêssegos, cerejas, amêndoas, passas e damascos); bagas (por exemplo, morangos, framboesas, amoras e groselha); vegetais (por exemplo, alface, repolho, tomates, pepinos, páprica, pimentas, cebolas, cenouras, batatas); plantas leguminosas (por exemplo, feijões, ervilhas, soja); plantas oleaginosas

(por exemplo, ricino, girassol, cacau, nozes moídas, coco); *cucurbitaceae* (por exemplo, pepino, berinjelas, melões, abóboras); plantas fibrosas (por exemplo, algodão); plantas ornamentais, árvores e flores (por exemplo, tulipa, lírio, rosa, orquídeas, crisântemo, petúnia, begônia, violeta, dália, fúcsia, gérbera, narciso, açafrão, coníferas); outras culturas tais como café, chá, borracha, vinhas, nozes, pistaches, tabaco, coníferas, cana de açúcar, açúcar de beterraba, beterraba forrageira e lúpulo.

[0106] Comumente, um dispositivo é usado para aplicar uma composição da invenção. Qualquer dispositivo conhecido na técnica pode ser usado. Exemplos são equipamento para injetar a composição no solo ou substrato de crescimento; equipamento para misturar a mesma através do solo, substrato de crescimento ou composto; sistemas de hidratação e névoa em estufas; equipamento para a pulverização em um substrato de crescimento, em uma cultura no campo ou em uma estufa usando, por exemplo, um avião ou helicóptero; equipamento para imersão de fruta coletada, bulbos, sementes, batatas semente, cereais ou vegetais; equipamento em que culturas colhidas são lavadas; equipamento aplicado para névoa, pulverização ou escovação de bananas; equipamento para aplicar um revestimento ou uma cera, por exemplo, em maçãs ou abacaxis.

[0107] Uma composição de acordo com a invenção pode ser aplicada em partes de planta após a colheita. Exemplos de tais partes de planta são cereais (por exemplo, milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, aveia, centeio); fruta tropical (por exemplo, banana, abacaxi, papaia, kiwi e manga); fruta

cítrica (por exemplo, laranjas, limões, limas, mandarinas e toranjas); frutas de pomo (por exemplo, maçãs e peras); fruta de pedra (por exemplo, pêssegos, amoras, amêndoas, ameixas e damascos); bagas (por exemplo, morangos, framboesas, amoras e groselha); vegetais (por exemplo, alface, repolho, tomates, pepinos, páprica, pimentas, cebolas, cenouras, batatas); sementes a partir de plantas leguminosas (por exemplo, feijões, ervilhas, soja); sementes a partir de plantas oleaginosas (por exemplo, rícino, girassol, cacau, nozes moídas, coco); *cucurbitaceae* (por exemplo, pepino, berinjelas, melões, abóboras); flores (por exemplo, tulipa, lírio, rosa, orquídeas, crisântemo, dália, gérbera, narciso, e outras partes de planta colhidas tais como grãos de café, folhas de chá, uvas, nozes, pistaches e tabaco.

[0108] A invenção provê adicionalmente o uso de uma composição de acordo com a invenção para proteger uma planta, parte de planta, solo e/ou substrato de crescimento, preferencialmente a partir de uma doença de planta e/ou um fungo tal como um bolor.

[0109] Exemplos de doenças de planta e bolores que podem ser combatidos com uma composição da invenção são:

(1) Doenças transmitidas pelo solo. Um primeiro exemplo de uma doença de bolor relacionada com o solo é *Fusarium wilt* ou doença do Panamá causada por *Fusarium oxisporum* f. sp. cubense. Outros fungos fitopatogênicos transmitidos pelo solo são, por exemplo, outras espécies de *Fusarium* tais como *Fusarium oxisporum* f.sp. lycopersici e *Fusarium oxisporum* f. sp. fragariae, *Rhizoctonia solani*, espécies de *Sclerotinia*, espécies de *Pythium* e *Pestalotiopsis clavispora*. Em adição,

patogênicos transmitidos pelo solo principais mais específicos em diferentes culturas são para cereais, por exemplo, *Gaeumanomyces graminis*, *Pseudocercospora herpetchoides*, *Bipolaris sorokiniana* e *Polymyxa graminis*; para milho, por exemplo, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum graminicola*, *Gibberella zeae* e *Macrophomina phaseolina*; para arroz, por exemplo, *Sclerotium oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* e espécies de *Achlya*; para o algodão, por exemplo, *Fusarium oxysporum*, *Thielaviopsis basicola*, *Macrophomina phaseolina* e *Glomerella gossypii*; para soja, por exemplo, *Fusarium virguliforme*, *Phytophthora sojae*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina* e *Phialophora gregata*; para batata, por exemplo, *Rhizoctonia solani*, espécies de *Phoma*, *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium sambucinum*, *Spongospora subterranean* e *Phytophthora erythroseptica*. Exemplos de bolores indesejados que podem ocorrer em substratos de crescimento de cogumelo são, por exemplo, espécies de *Trichoderma* (por exemplo, *T. harzianum*, *T. aggressivum* e *T. viride*), espécies de *Verticillium* (por exemplo, *V. fungicola* var. *fungicola* e *V. fungicola* var. *aleophilum*), espécies de *Aspergillus*, espécies de *Penicillium*, espécies de *Dactylum* (por exemplo, *D. dendroides*) e espécies de *Mycogone* (por exemplo, *M. perniciosa*).

(2) Doenças transmitidas pela semente e doenças em bulbos e tubérculos. Exemplos de doenças de bolor em bulbos de flor tais como tulipa e lírio são da espécie *Fusarium* tal como *Fusarium oxysporum*, espécie *Botrytis*, espécie *Pythium*,

espécie *Rhizoctonia* e espécie *Stagnospora*. Exemplos de doenças de bolor em batatas semente são da espécie *Fusarium* (por exemplo, *Fusarium solani*), *Rhizoctonia solani*, espécie *Phoma*, *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes* e espécie *Penicillium*. Doenças chave que ocorrem em sementes tais como semente podre são causadas, por exemplo, pela espécie *Aspergillus* (por exemplo, *A. terreus*), espécie *Penicillium* e espécie *Phomopsis*; a dormência de doenças em sementes é causada, por exemplo, pela espécie *Pythium*, espécie *Fusarium* e espécie *Rhizoctonia*; a doença que emerge posteriormente é causada, por exemplo, pela espécie *Helminthosporium*, espécie *Ustilago* e espécie *Tilletia*. Os fungos transmitidos por semente em cereais são da espécie *Fusarium*, espécie *Alternaria*, *Cochliobolus sativus*, *Stagnospora nodorum*, *Ustilago nuda* e *Claviceps purpurea*. Importantes fungos transmitidos por semente em soja são da espécie *Phomopsis*, espécie *Diaporthe*, *Peronospora manshurica*, *Cercospora kikuchii*, espécie *Alternaria* e espécie *Fusarium*. Patogênicos de fungos transmitidos pela semente principais em arroz são da espécie *Fusarium*, *Alternaria padwickii*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae*, espécie *Helminthosporium* e *pyricularia oryzae*. Importantes patogênicos transmitidos por semente no milho são da espécie *Fusarium*, espécie *Penicillium*, espécie *Aspergillus*, espécie *Bipolaris*, espécie *Alternaria* e espécie *Rhizopus*. Em sementes de algodão, por exemplo, a espécie *Aspergillus*, a espécie *Thielaviopsis* e a espécie *Fusarium* podem se desenvolver.

(3) Bolores em uma cultura no campo (pré colheita). Exemplos de doenças de bolor em folha em plantas de banana são ponto em folha de Sigatoka ou amarelo Sigatoka causadas por *Mycosphaerella musicola* e Preto Sigatoka causadas por *Mycosphaerella fijensis*. Um exemplo de uma doença em plantas de batata é doença da praga prematura causada pela espécie *Alternaria* tal como *Alternaria solani* e *Alternaria alternate*. Outro exemplo de uma doença em plantas de batata, mas também de importância para as plantas de tomate, é doença de praga tardia causada por infestantes de *Phytophthora*. Espécies do tipo *Alternaria* também são capazes de danificar culturas no campo tal como vegetais, algodão, tabaco e cereais ou pode causar doença de manchas pretas em tomates, cebolas e cenouras. *Fusarium oxysporum* é um dos bolores patogênicos mais importantes em muitas culturas tais como milho e soja, Oídio é uma doença importante em muitas culturas que pode ser causada por diferentes espécies de fungos. Exemplos são espécie *Erysiphe* (por exemplo, *E. necator* em uvas, *E. betae* em beterraba, *E. cruciferarum* em repolho, espécie *E. graminis* em cereais), *Oidium lycopersicum*, por exemplo, em tomate, espécie *Podosphaera*, por exemplo, em rosa, maçã e morango, *Blumeria graminis* em trigo e cevada, *Sphaerotheca fusca* em pepino e melão e *Leveillula taurica* em páprica, pimenta e berinjela. Mofo de Downey é uma doença de planta principal que pode ser causada por muitas espécies de fungos diferentes. Exemplos são *Plasmopara viticola*, por exemplo, em vinhas, *Pseudoperonospora humuli*, por exemplo, em lúpulo, *Peronospora parasitica* em, por exemplo, repolho, *Peronospora*

destructor em, por exemplo, cebola, *Peronospora belbahrii* em, por exemplo, manjerição, *Pseudoperonospora cubensis* em, por exemplo, pepino, melão ou cantalupo, *Pseudoperonospora farinosa* f.sp. *betae*, por exemplo, em beterraba, *Bremia lactucae* em, por exemplo, alface.

(4) Bolors que crescem em produtos agrícolas colhidos (após a colheita). Bolors que podem se desenvolver em fruta coletada tal como maçãs, peras, fruta cítrica, fruta de pedra e bagas, por exemplo, são *Botrytis cinerea* em uvas e fruta macia, *Botrytis aclada* em cebolas, legumes e frutas, *Gloeosporium fructigenum*, *Gloeosporium perennans*, *fytophthora cactorum*, *fytophthora syringae*, espécie *Penicillium* (por exemplo, o *P. expansum* que produz micotoxina patulina em frutas de pomo e nozes, *P. digitatum* e *P. italicum* em fruta cítrica, *P. verrucosum* e *P. viridicatum* em cereais), *Fusarium moniloforme* em milho, *Rhizopus stolonifer* em morangos. *Aspergillus flavus* possui a capacidade de produzir a micotoxina aflatoxina, especialmente em amendoins, nozes de pistache, nozes do Brasil e milho. *Aspergillus fumigatus* pode se desenvolver em uma grande faixa de frutas armazenadas, culturas, cereais, grãos de cacau e nozes. *Aspergillus pullulans* podem se desenvolver em grãos armazenados, morangos, fruta cítrica e amoras. Exemplos de patógenos de fungos comumente encontrados em abacaxis são *Thielaviopsis paradoxa*, *Penicillium funicolosum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. Em bananas a doença mais importante após a colheita é podridão de coroa que pode ser causada por um número de espécies de fungos: exemplos de patógenos de fungos comumente

encontrados em bananas são *Colletotrichum musae*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium roseum*, *Verticillium theobromae*, *Lasiodiplodia theobomae* e *Deightonella torulosa*.

[0110] Também incluídos nesta invenção estão substrato de crescimento, solo, produtos agrícolas incluindo plantas tal como culturas no campo e partes de planta tal como produtos colhidos contendo uma composição da invenção.

[0111] Para o propósito de clareza e uma descrição concisa, funcionalidades são descritas aqui como parte dos mesmos ou de diferentes aspectos e modalidades preferidas dos mesmos, no entanto, será percebido que o escopo da invenção pode incluir modalidades tendo combinações de todas ou algumas das funcionalidades descritas.

[0112] A invenção será ilustrada agora pelos seguintes exemplos, que são providos por meio de ilustração e não de limitação e será entendido que muitas variações nos métodos descritos e as quantidades indicadas podem ser feitas sem fugir do espírito da invenção e o escopo das reivindicações anexas.

Legendas da Figura

[0113] Figura 1. Exemplo de Placa de Petri com zonas de lesão. Incubação "36": ácido palmítico 0,03 mM; "13": ácido butanoico 0,3 mM e 3 mM de Natamicina; "19": ácido palmítico 0,03 mM e 3 mM de Natamicina; "26": ácido esteárico 0,9 mM e 3 mM de Natamicina.

Exemplo 1: Atividade antifúngica sinérgica de natamicina e ácidos graxos contra *Fusarium oxisporum*

[0114] A atividade antifúngica sinérgica da combinação de natamicina e um coquetel de quatro ácidos graxos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico) contra *Fusarium oxisporum* foi demonstrada em um ensaio in vitro usando placas de microlitro de 96 poços.

[0115] Natamicina (95% pura) foi obtida a partir da companhia Freda, China; palmitato de sódio e linoleato de sódio foram obtidos a partir de Sigma, EUA; sal de ácido oleico sódio e sal de ácido esteárico sódio foram obtidos a partir de Carl Roth, Alemanha.

[0116] Uma solução de estoque 5,0 mM (4 x 1,25 mM cada) dois quatro sais de sódio de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico foi preparada usando métodos bem conhecidos.

[0117] Uma suspensão de esporos de uma cepa selvagem do bolor transmitido pelo solo *Fusarium oxisporum* f. sp. *cubense*, o patogênico da doença do Panamá de plantas de banana, foi preparada usando métodos bem conhecidos.

[0118] Para o experimento, uma suspensão de esporo recém preparada e uma solução recém preparada dos sais de sódio dos ácidos graxos foram preparadas. Natamicina foi dissolvida em 80% DMSO usando métodos bem conhecidos. Meio de crescimento de fungos (Extrato de malte Agar), a suspensão de esporos de *Fusarium oxisporum* (10.000 esporos por poço) e os ácidos graxos e/ou soluções de natamicina em diferentes concentrações foram adicionadas para os poços das placas de microlitro usando métodos bem conhecidos. O experimento foi executado em duplo. Após a incubação das placas de microlitro

por 5 dias no escuro em 24°C as placas de microlitro foram examinadas para a presença ou a ausência de desenvolvimento de bolor visível. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito sinérgico de natamicina e ácidos graxos contra *Fusarium oxisporum*

Ácidos graxos	Natamicina							
	0	1 µM	2 µM	3 µM	4 µM	5 µM	6 µM	7 µM
0	++	++	++	++	++	++	++	++
2,3 µM	++	++	++	++	++	+/-	--	--
4,5 µM	++	++	++	++	++	--	+/-	--
250 µM	++	++	++	++	++	--	--	--

+: crescimento de bolor visível

-: crescimento de bolor não visível

[0119] Estes resultados mostram que a sensibilidade de *Fusarium oxisporum* para a natamicina é > 7µM; a sensibilidade para o coquetel de ácidos graxos é > 250 µM.

[0120] Os resultados reportados na Tabela 1 claramente demonstram a sinergia entre natamicina e ácidos graxos. Mesmo em concentrações extremamente baixas de ácidos graxos (2,3 µM e 4,5 µM) o desenvolvimento do crescimento de bolor foi quase completamente evitado em uma concentração de 5 a 6 µM de natamicina; em 7 µM de natamicina, nenhum crescimento foi observado na presença de ácidos graxos. Em 5 a 7 µM de natamicina e 250 µM de ácidos graxos, o bolor de *Fusarium* foi completamente inibido.

Exemplo 2: Efeito de natamicina em combinação com diferentes concentrações de uma faixa de sais de sódio de ácido graxo.

[0121] Este exemplo demonstra os efeitos fungicidas aprimorados de natamicina em combinação com diferentes concentrações de sais de sódio de ácido graxo.

[0122] *Saccharomyces cerevisiae* (pelo menos 105 cfu/ml) foi distribuído em Placas de Petri com um diâmetro de 145 mm contendo 30 ml de Dextrose Agar de Batata (PDA; Carl Roth; pH de cerca de 6) usando cotonetes esterilizados. Discos de papel filtro (Whatman, Papel de Ensaio Antibiótico, grau AA) com um diâmetro de 6 mm foram carregados com 40 µl de uma solução de 3 mM de Natamicina (Chinonbio, China, 95%) mais 0, 0,03, 0,09, 0,3 ou 0,9 mM de sais de sódio de ácido butanoico (Carl Roth >99%), ácido caprílico (Carl Roth, >99,5%), ácido palmítico (Sigma, sódio palmitato 98,5) ou ácido esteárico (Carl Roth, estearato de sódio 88 a 92%). Como controles, os efeitos dos sais de ácido graxo sozinhos (sem a natamicina) foram testados. O crescimento de levedo também foi medido após a incubação no meio sem natamicina e sais de ácido graxo.

[0123] Seguindo a aplicação de um filtro, Placas de Petri foram incubadas de cabeça para baixo por 24 h em um refrigerador a 4°C para permitir a difusão de natamicina para o agar. Após 24 h os discos de filtro foram removidos a partir do agar e as Placas de Petri foram incubadas de cabeça para baixo em um forno a 30°C. O tamanho da zona de inibição mostra a eficácia contra a levedura da natamicina e / ou sais de ácido graxo liberados a partir do disco de filtro (ver, por exemplo, a Figura 1). Após 16 h de incubação no forno o tamanho da zona de inibição foi determinado usando

um medidor de calibre digital. Os dados são apresentados como quadrado mm e são uma média de quatro replicas.

Tabela 2. Eficácia de natamicina e ácidos graxos contra *S. cerevisiae*

[0124] O efeito da presença (+) ou ausência (-) de 3 mM de Natamicina mais diferentes concentrações de quatro sais de ácido graxo no crescimento de levedura em Placas de Petri como descrito aqui acima. Números representam a superfície de zonas de inibição expressas em mm quadrados após 16 h.

Concentração de ácido graxo (mM)	ácido butanoico-Na		ácido caprílico-Na		Ácido palmítico-Na		Ácido esteárico-Na	
Natamicina	+	-	+	-	+	-	+	-
0	585	0	585	0	585	0	585	0
0,03	629	0	492	0	409	0	567	0
0,09	624	0	637	0	620	0	587	0
0,3	652	0	681	0	672	0	620	0
0,9	628	0	539	0	490	0	569	0

[0125] Todos os sais de ácido graxo em concentrações de 0,09 mM e 0,3 mM aprimoraram o crescimento de levedura inibido pela natamicina, o que é evidente como um aumento na área de superfície da zona de inibição, comparado com 0 mM de ácidos graxos ou com apenas ácidos graxos. A razão molar entre natamicina e sais de ácido graxo foi de 3:0,09 (33 a 1) e 3:0,3 (10 a 1). Isto quer dizer que concentrações de ácido graxo que estão entre 1 e 30 %, preferencialmente entre 3 e 10 % de uma concentração de natamicina aprimora o efeito de natamicina.

[0126] Estes resultados mostram que os sais de sódio de ácido graxo em si não inibem o crescimento da levedura nas placas de Petri em concentrações que aprimoram o efeito de inibição induzida por natamicina do crescimento de levedura.

Exemplo 3. Efeito de natamicina em combinação com diferentes concentrações de sais de potássio e amônio de ácido caprílico.

[0127] Este exemplo demonstra que sais de potássio e amônio também aprimoram o efeito de biocida de natamicina em células de levedura.

[0128] O experimento foi realizado como descrito no exemplo 2, exceto que o diâmetro das placas de Petri foi de 90 mm. A medição da zona de inibição foi após as 16 horas.

[0129] Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito de sais de potássio e amônio na eficácia da natamicina contra célula de levedura nas placas de Petri. Números representam a superfície de zonas de inibição expressas em mm quadrados após 16 h.

Concentração de ácido graxo em ácido caprílico (mM)	sal de potássio		sal de amônio	
Natamicina	+	-	+	-
0	788	0	788	0
0,03	788	0	788	0
0,09	835	0	821	0
0,3	869	0	798	0
0,9	825	0	850	0

[0130] Ambos os sais de amônio e potássio de ácido caprílico aprimoram o crescimento de levedura inibido pela natamicina em 0,09, 0,3 e 0,9 mM, o que é evidente como um aumento na área de superfície da zona de inibição, se comparado com 0 mM de ácidos graxos mais natamicina ou com apenas ácidos graxos. Os sais de potássio e amônio em si não inibem o crescimento da levedura nas placas de Petri em concentrações que aprimoram o efeito de inibição induzida por natamicina do crescimento da levedura.

Exemplo 4: Efeito antifungos de natamicina em combinação com uma mistura de sais de sódio de ácido graxo

[0131] Este exemplo demonstra o efeito antifungos de natamicina em combinação com uma mistura de sais de sódio de ácido graxo.

[0132] *Saccharomyces cerevisiae* (pelo menos 10^5 cfu/ml) foi distribuído em Placas de Petri com um diâmetro de 90 mm contendo 10 ml PDA agar (Carl Roth, f cerca de 6) usando cotonetes esterilizados. Discos de papel filtro (Whatman) com um diâmetro de 6 mm foram carregados com 50 μ l de uma solução contendo uma concentração de 3 mM de Natamicina mais 0,3 mM de uma mistura de sal de sódio de ácido oleico e sal de sódio de ácido esteárico em uma razão de 50/50 (esta mistura será referida como mistura de ácido graxo).

[0133] Como controles, o efeito da mistura de ácido graxo sozinho (sem a natamicina) foi testado no crescimento de levedura. O crescimento da levedura também foi determinado após a incubação no meio sem tanto a natamicina quanto os sais de ácido graxo.

[0134] O tamanho da zona de inibição é um resultado da natamicina e / ou sais de ácido graxo liberados a partir do disco de amostra. Após 16 h de incubação no forno o tamanho da zona de inibição foi medido usando um medidor de calibre digital. Os dados são apresentados como mm quadrados e são uma média de quatro replicas.

Tabela 4. Efeito de 3 mM de natamicina mais 0,3 mM de uma mistura de sal de sódio de ácido oleico e sal de sódio de ácido esteárico no crescimento de levedura nas placas de Petri. Os números representam zonas de inibição expressas em mm quadrados após 16 h.

Concentração	Zona de inibição
Água	0
Mistura 0,3 mM de FA	0
3 mM de Natamicina	480
3 mM de Natamicina +	617

Exemplo 5: Efeito antifungos de sais de sódio de ácido graxo em combinação com natamicina contra *Botrytis* em maçãs

[0135] Este exemplo demonstra o efeito antifungos de sais de sódio de ácido graxo em combinação com natamicina contra *Botrytis* na maçã.

[0136] Fruta testada: maçãs cv *Maribelle* a partir de origem orgânica/certificada por SKAL. SKAL é uma organização holandesa semigovernmental que controla a produção orgânica na Holanda. Machucados de maçãs foram verificados no dia 5 e 7. Uma mistura de sais de sódio de ácido graxo contendo sal de sódio de ácido oleico e sal de sódio de ácido esteárico em uma razão 50/50 foi usada neste experimento e será referida como mistura de ácido graxo.

[0137] Tratamentos testados:

- 1) mistura 0,3 mM de ácido graxo
- 2) mistura 0,6 mM de ácido graxo
- 3) 3 mM de natamicina (Chinonbio 95%)
- 4) 3 mM de natamicina + mistura 0,3 mM de ácido graxo (FA)
- 5) 3 mM de natamicina + mistura 0,6 de mM ácido graxo
- 6) Controle não tratado
- 7) Controle sem infecção de fungos

[0138] Patogênico usado: Suspensão de esporos de *Botrytis cinerea* contendo 10^6 esporos/ml.

[0139] Aplicação: A casca da fruta da maçã foi danificada com um saca-rolhas, diâmetro de 4 mm e profundidade de ~0,5 cm para a fruta, com 2 machucados por maçã. 40 microlitros de uma suspensão de esporo recém preparada de *B. cinerea* foi aplicada por pipeta em cada machucado. Subsequentemente, a suspensão de esporo foi deixada secar no ar por 4 horas. Então, 40 microlitros de um tratamento como apresentado na lista acima foi aplicado pela pipeta a cada machucado.

[0140] Todas as frutas foram mantidas em temperatura ambiente (20 °C). Os machucados das maçãs foram verificados após 4 e 7 dias de incubação. A atividade antifúngica gravada é a área de superfície (mm quadrados) de podridão para a maçã comparada com o controle não reagido (ver as Tabelas 5, 6 e 7).

[0141] Replicatas: Todos os tratamentos para o experimento da maçã foram realizados em seis maçãs

individuais com dois machucados cada resultando em 12 machucados por tratamento.

Resultados

[0142] Os resultados destes experimentos são representados nas Tabelas 5 a 7.

Tabela 5: Eficácia de natamicina e um coquetel de ácido graxo contra podridão em maçãs

[0143] Podridão nas maçãs tratadas com 40 µl de 3 mM de Natamicina mais 0, 0,3 e 0,6 mM de mistura de ácido graxo após a inoculação. Controle é incubação sem natamicina e sais de ácido graxo.

- Cultura: frutas maçã		
Tratamentos	Tempo de incubação (dias)	Atividade antifúngica (%)
Controle	5	0
0,3 mM FA		-13
3 mM de Natamicina		62
3 mM de Natamicina + 0,3 mM FA		91
Controle	5	0
0,6 mM FA		12
3 mM de Natamicina		62
3 mM de Natamicina + 0,6 mM FA		93
Controle	7	0
0,3 mM FA		-21
3 mM de Natamicina		50
3 mM de Natamicina + 0,3 mM FA		87
Controle	7	0
0,6 mM FA		5

3 mM de Natamicina		50
3 mM de Natamicina + 0,6 mM FA		79

Tabela 6. Área de lesão nas frutas maçã por tratamento (mm²) 5 dias após a inoculação

%FA\Nata	Sem natamicina	3 mM de Natamicina
0	243	130
0,3 mM FA	387	31
0,6 mM FA	301	23

Tabela 7. Área de lesão nas frutas maçã por tratamento (mm²) 7 dias após a inoculação

%FA\Nata	Sem natamicina	3 mM de Natamicina
0	615	308
0,3 mM FA	743	83
0,6 mM FA	586	127

Exemplo 6. Efeito de natamicina parcialmente purificada a partir de um caldo de fermentação contendo ácidos graxos no desenvolvimento de sementes de milho

Preparo e formulação de uma composição de natamicina contendo ácidos graxos.

[0144] Este exemplo descreve o preparo e a formulação uma composição de natamicina composta de cerca de 60% natamicina e 40% de outros compostos a partir de um caldo de fermentação de *Streptomyces natalensis*.

[0145] Uma fermentação que usa *Streptomyces natalensis* foi realizada. Após a terminação da fermentação, uma composição de natamicina foi recuperada. Em particular,

o caldo de fermentação foi filtrado; o bolo de filtração foi tratado com metanol e NaOH 20% em um pH de cerca de 9 a 10. Após duas etapas de filtração e eluição adicionais, o pH foi ajustado até cerca de pH 6,5 adicionando HCL 15%. O conteúdo de natamicina final foi definido em 60% pela adição de 20% de glicose. O produto resultante foi seco e então moído. Em particular, 250 g do produto seco por litro de água foi moído usando um moinho de esferas para obter partículas mais homogêneas com um tamanho médio de cerca de 2 µm.

[0146] Como usado nos exemplos aqui, "Composição de natamicina A" se refere a uma composição de natamicina compreendendo os componentes mostrados na Tabela 8 abaixo moídos até um D50 (diâmetro mediano mássico) de 2 µm.

Tabela 8.

Composto	Teor (%)
Natamicina	58,5 a 61,5 %
Natamicina metil éster	1,5 a 4 %
Conteúdo de água	< 8 %
Ácidos graxos	6-10 %
Proteína	9,60%
Glicose	20%
Amido	1,20%

[0147] Como usado nos exemplos aqui, "Controle de Natamicina" se refere a uma natamicina comercialmente disponível com uma pureza de 95% ou maior moída até um D50 (diâmetro mediano mássico) de 2 µm.

[0148] Composição de natamicina A e Controle de Natamicina foram formulados usando os ingredientes providos

na Tabela 9 abaixo. Composição de natamicina A de acordo com a seguinte formulação será referida como "Formulação 1". Controle de natamicina de acordo com a seguinte formulação será referida como "formulação de Controle da Natamicinuma".

Tabela 9.

Ingrediente	g/l	p/p %
Composição de Natamicina A	100	9,09
Atlas G 5002-L	20	1,82
MetaSpense 550 S	8	0,73
Glicerol	252	22,9
Rhodorsil 426R	6	0,55
Rhodopol 23 (2% em água)	77	7
Água	637	57,9
Totais	1100	100

[0149] Composição de natamicina A foi formulada para produzir a Fórmula 1 de acordo com o seguinte protocolo. Glicerol primeiramente foi adicionado para água e, enquanto se mantinha a agitação, os tensoativos Atlas™ G 5002-L (Croda Crop Care, Cowick Hall, DN14 9AA, UK) e MetaSpense™ 550 S (Croda Crop Care, Cowick Hall, DN14 9AA, UK) foram adicionados. Após a agitação por 30 minutos, 4,8 g do agente antiespumante Rhodorsil® 426R (Rhodia Inc., Cranbury, NJ) foi adicionado. Composição de natamicina A e Controle de Natamicina adicionados em porção e a suspensão foi agitada por mais 30 minutos. A suspensão foi moída até um tamanho de partícula médio de cerca de 1,7 µm. A suspensão foi coletada e a 1/5 parte remanescente de Rhodorsil® 426R foi adicionada. Após a agitação por 30 minutos o modificador de viscosidade

Rhodopol® 23 (Rhodia Inc., Cranbury, NJ) foi adicionado. Após a agitação por mais 3 horas, as formulações foram obtidas. Controle de Natamicina também foi formulado usando o protocolo definido acima para produzir a formulação de Controle Natamicina.

Exemplo 7. Efeito no Desenvolvimento de Sementes de Milho

[0150] Este exemplo demonstra o efeito da Composição de natamicina A no desenvolvimento de sementes de milho.

[0151] A Formulação 1 e a Formulação de Controle de Natamicina foram aplicadas às sementes de milho (150 sementes por tratamento). As dosagens são listadas na Tabela 15 abaixo. Um conjunto de sementes de controle não tratadas também foram incluídas no estudo. Seguindo o tratamento, as sementes foram incubadas usando um protocolo de teste frio que simula o frio desfavorável e condições climáticas úmidas que podem ocorrer durante a estação do plantio. Os resultados deste teste são usados para prever o desempenho um lote de semente vai passar sob condições similares no campo. Para realizar o teste, as sementes primeiramente foram embaladas em rolos com terra de campo saturada e toalhas de papel, então os rolos foram colocados em bolsas plásticas. As sementes foram viradas de forma que o lado do núcleo mais próximo do embrião que estava para baixo contra o solo. A fonte de terra do campo foi um pedaço onde milho foi crescido anteriormente e o solo foi conhecido de conter um alto número de espécies de bolor não identificadas. Após um período de incubação sob condições frias (7 dias em 8°C no escuro

seguido por 7 dias a 25°C na luz) o número de sementes normais, sementes anormais, e sementes mortas foi gravado.

[0152] Os resultados são sumarizados na Tabela 10 abaixo. Durante o curso do experimento, nenhuma fitotoxicidade que resulta de um tratamento de natamicina foi observada.

Tabela 10.

% de tratamento	% de plantas saudáveis	% de plantas normais	Sementes mortas
Não tratada	0	2	98
Formulação de Controle de Natamicina (0,25 g de Controle de Natamicina / kg de semente)	11	4	85
Formulação 1 (0,25 g de Composição de Natamicina A / kg de semente)	14	13	73
Formulação de Controle de Natamicina (0,5 g de Controle de Natamicina / kg de semente)	12	7	81
Formulação 1 (0,5 g de Natamicina Composição A (/ kg de semente)	20	12	68

[0153] O número de sementes saudáveis observado foi inesperadamente maior quando a Formulação 1 foi aplicada se

comparado com a formulação de Controle de Natamicina. Em particular, dosagens de Composição de natamicina A em 0,25g/kg de semente e 0,5g/kg de semente resultaram em 1,3 e 1,7 vezes mais no número de plantas saudáveis, respectivamente, do que a dosagem idêntica de Controle de Natamicina.

Exemplo 8. Efeito em Bananas contra *Mycosphaerella fijiensis*

[0154] Este exemplo demonstra a eficácia da Composição de natamicina A para o controle de *Mycosphaerella fijiensis*. Uma unidade experimental teve 9 plantas de banana que foram plantadas em áreas com 3 m entre as plantas. A tentativa seguiu um projeto aleatório completo e cada tratamento foi replicado três vezes. Fileiras de fronteira entre as plantas tratadas foram plantadas com *Musa textilis*, uma variedade de planta de banana tolerante ao Preto Sigatoka. Todos os tratamentos foram aplicados usando um soprador de motor para originar um volume de tratamento total de 23 L/ha. Os tratamentos testados foram aplicados como uma emulsão óleo - água usando óleo Spraytex® (5 L/ha) e 1% de emulsificante Imbirex. Os tratamentos fungicidas testados estão listados na Tabela 11 abaixo, junto com os seus respectivos ingredientes ativos e diluição (ou concentração). A última aplicação do tratamento de teste experimental foi realizada em 13 semanas após a primeira aplicação. Um total de 16 aplicações consecutivas foram realizadas durante o curso do estudo.

Tabela 11.

Tratamento	Ingrediente Ativo	Diluição para 1/ha
1. Formulação de Controle de Natamicina + Dithane 1,0 l/ha	Controle de Natamicina + mancozeb	100 X
2. Formulação 1 + Dithane 1,0 l/ha	Natamicina Composição A + mancozeb	100 X
3. Formulação de Controle de Natamicina + Dithane 0,5 l/ha	Controle de Natamicina + mancozeb	100 X
4. Formulação 1 + Dithane 0,5 l/ha	Natamicina Composição A + mancozeb	100 X
5. Formulação de Controle de Natamicina*	Controle de Natamicina	50 X
6. Dithane 0,5 l/há	Mancozeb	0,5 l/ha
7. Dithane 1,0 l/há	Mancozeb	1,0 l/ha
8. Dithane 2,0 l/há	Mancozeb	2,0 l/ha
9. Óleo Mineral	Óleo Mineral - Spraytex®	5,0 l/ha
10. Plantas não tratadas	-	-

*Formulação de Controle de Natamicina foi provida como uma suspoemulsão incluindo óleo

[0155] As seguintes variáveis foram avaliadas a cada semana para cada um dos tratamentos: folhas totais por planta, folha mais jovem com listras (isto é, folha mais

jovem infectada (YLI)), folha mais jovem com manchas (YLS) e severidade da doença. A primeira aparência em sintomas nas folhas de banana correlacionada com a severidade da infecção: quanto menor é o número da folha em que os sintomas aparecem, maior é o nível da infecção. Avaliações de doença foram conduzidas uma vez que a primeira folha aplicada alcançou a posição #4 e a cada 7 dias adiante até uma semana após a aplicação de tratamento final. Note que a Posição 4 é a folha 4. A resposta ao tratamento para Preto Sigatoka foi avaliada usando a escala Stover modificada por Gauhl (Tabela 12 abaixo) e os resultados das avaliações são mostrados na Tabela 13 abaixo.

Tabela 12. Escala de Stover modificada por Gauhl usada para determinar o grau da doença

Grau	Descrição
0	Sem sintomas de doença
1	Listras até um máximo de 10 manchas
2	11 manchas para 5 % da área da folha
3	6 a 15 %
4	16 a 33%
5	34 a 50 %
6	Mais do que 50 %

Tabela 13.

Tratamento	YLI médio	YLS médio	Número médio de folhas	Severidade média
1. Formulação de Controle de Natamicina + Dithane 1,0 l/ha	4,7	5,4	6,6	0,71

2. Formulação 1 + Dithane 1,0 l/ha	4,7	5,4	6,9	0,74
3. Formulação de Controle de Natamicina + Dithane 0,5 l/ha	4,4	5,0	6,5	0,86
4. Formulação 1 + Ditano 0,5 l/ha	4,6	5,3	7,3	0,85
5. Formulação de Controle de Natamicina *	4,1	4,7	7,2	1,40
6. Dithane 0,5 l/há	4,6	5,3	7,4	0,95
7. Dithane 1,0 l/há	4,9	5,7	7,0	0,63
8. Dithane 2,0 l/há	4,8	5,6	7,1	0,60
9. Óleo Mineral	4,2	4,9	7,3	1,35
10. Plantas não tratadas	3,3	4,3	7,4	2,17

*Formulação de Controle de Natamicina foi provida como uma suspoemulsão incluindo óleo

[0156] Com a exceção dos tratamentos de óleo (Tabela 13, entradas 5 e 9) todos os tratamentos tiveram uma severidade abaixo de 1 enquanto a planta não tratada teve uma severidade acima de 2. Todas as plantas tratadas possuem um YLI médio entre 4 e 5, enquanto a planta não tratada teve um YLI médio de 3,3. Ambas as conclusões indicam que todos os tratamentos tiveram um efeito fungicida. Estes resultados foram inesperados já que a Formulação 1 contém uma menor porcentagem do ingrediente ativo do que a Formulação de Controle de Natamicina, ainda a sua eficácia foi comparável. A Formulação 1 teve a mesma eficácia contra fungos que um produto comercial com o ingrediente ativo mancozeb.

Exemplo 9. Efeito de ácidos graxos no nível de saturação de natamicina em água.

[0157] Natamicina, que foi 95% pura (ChihonBio, China), foi combinada com diferentes quantidades de sais de ácido oleico e ácido esteárico (razão 50:50) como na sequência: pó de natamicina mais sais de ácido graxo secos foram vigorosamente moídos à mão por aproximadamente 60 segundos em um frasco cerâmico usando um pilão. 250 mg de natamicina moída - sais de ácido graxo foram transferidos para um pequeno béquer de vidro e 5 ml de água desmineralizada foram adicionados. A pasta fluida obtida foi agitada durante a noite em temperatura ambiente. Aqui a seguir, 1 ml de pasta fluida homogênea de natamicina/ácidos graxos foi transferido para um tubo Eppendorf de 2 ml e centrifugada por 45 min em 14500 rpm. O sobrenadante foi diluído 5 vezes em uma mistura de acetonitrila:H₂O (38:62). Uma amostra foi injetada para o HPLC.

[0158] A análise de HPLC foi como na sequência:

[0159] O sistema de HPLC foi um sistema Agilent 1100. A coluna usada foi uma Zorbax Bonus-RP, 4,6 x 250 mm, 5 µm. A fase móvel consiste de tampão acetonitrila : fosfato (0,7 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,39 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) pH 5,8 (28 : 72). A velocidade do fluxo foi de 1,0 ml/min e a temperatura da coluna foi 25 °C. O volume de injeção foi 5 µl. Natamicina foi detectada com um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 304 nm.

Resultados

[0160] Na Tabela 14 o efeito de uma combinação 50-50 dos sais de sódio de ácido oleico e ácido esteárico na solubilidade de natamicina em água. O experimento foi realizado em duplicata e valores da quantidade de natamicina dissolvida em água são médias das duplicatas.

Tabela 14: Dissolução de natamicina

Razão de natamicina: sais da mistura de ácido oleico e esteárico (g : g)	Natamicina dissolvida em água (mg/l)
1 : 0	46
1 : 0,05	428
1 : 0,10	905
1 : 0,22	1257
1 : 0,40	1757

[0161] Natamicina sem a adição de ácidos graxos dissolvida em água até um nível padrão de cerca de 46 ppm. A partir deste experimento, pode ser concluído que a adição de sais de ácido graxo leva a um forte aumento no nível de

solubilidade: adição de apenas 10% de sais de ácidos graxos se comparado com natamicina (p/p) já leva a um aumento de quase 20 vezes na solubilidade de natamicina em água.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição antifúngica, **caracterizada pelo** fato de que compreende natamicina e pelo menos um composto selecionado a partir dos ácidos graxos ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico, ou um sal destes ácidos graxos, em que a natamicina possui um tamanho de partícula médio dentre 0,2 e 20 micrômetro e em que pelo menos um ácido graxo ou sal do mesmo está presente em uma concentração entre 1 e 30 mol% da concentração de natamicina.

2. Composição antifúngica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que compreende 1% a 98% (p/p) de natamicina, preferencialmente, 6% a 60% (p/p) de natamicina.

3. Composição antifúngica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada pelo** fato de que compreende 0,1% a 10% (p/p) de pelo menos um ácido graxo selecionado dentre ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico ou sal do mesmo.

4. Composição antifúngica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada pelo** fato de que compreende pelo menos dois ácidos graxos selecionados de ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico ou sal do mesmo.

5. Composição antifúngica, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pelo** fato de que cada um dos ácidos graxos ou sal do mesmo está presente em 0,1% a 10% (p/p).

6. Composição antifúngica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada pelo** fato de que é uma composição aquosa ou oleosa.

7. Composição antifúngica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada pelo** fato de que a composição adicionalmente compreende proteínas, glicose e amido.

8. Composição antifúngica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizada pelo** fato de que o pelo menos um ácido graxo ou sal do mesmo está presente a uma concentração entre 3 e 10 mol% da concentração de natamicina.

9. Composição antifúngica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada pelo** fato de que adicionalmente compreende um complexo de polieletrólito que compreende um poliânion, tal como um composto de lignina, goma xantana, humato e alginato, e um polication, tal como quitosana ou poli-alilamina, em uma quantidade relativa entre 1:2 e 60:1 (p/p).

10. Método para proteger uma planta agrícola ou parte de planta, **caracterizado pelo** fato de que compreende fornecer uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e aplicar a dita composição para a dita planta agrícola ou parte de planta.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo** fato de que a dita parte de planta é uma semente, bulbo, fruta ou vegetal.

12. Método para aprimorar o desenvolvimento e/ou rendimento de uma planta agrícola, **caracterizado pelo** fato de que compreende fornecer uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e contatar a planta com a dita composição.

13. Método para proteger um solo e/ou um substrato de crescimento, o método **caracterizado pelo** fato de que compreende aplicar ao dito solo e/ou um substrato de crescimento uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, **caracterizada pelo** fato de que a dita composição é diluída, preferencialmente entre 10^2 e 10^6 vezes, em uma solução aquosa ou em óleo.

15. Uso de uma composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada pelo** fato de que é para proteger uma planta, parte de planta, solo e/ou substrato de crescimento.

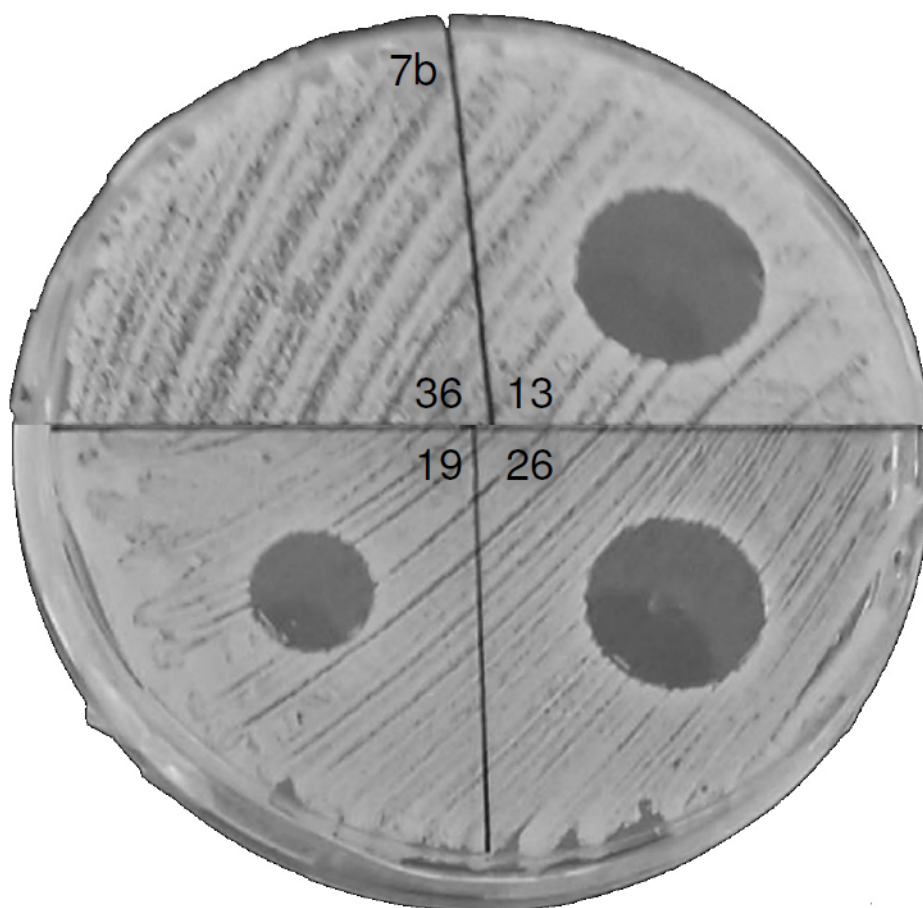


FIGURA 1