

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2002.03.04</b>	(73) Titular(es): <b>ARKEMA FRANCE</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2001.03.19 FR 0103674</b>	<b>420, RUE D'ESTIENNE D'ORVES 92700</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.12.17</b>	<b>COLOMBES</b>	<b>FR</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.07.27</b> <b>196/2011</b>	(72) Inventor(es): <b>THIERRY AUBERT</b> <b>JACQUES AUGER</b>	<b>FR</b> <b>FR</b>
	(74) Mandatário: <b>MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA</b> <b>RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO PESTICIDA DOS SOLOS OU DOS SUBSTRATOS COM COMPOSTOS DE ENXOFRE**

(57) Resumo:

PARA SUBSTITUIR O BROMETO DE METILO EM TODAS AS SUAS UTILIZAÇÕES NO TRATAMENTO DOS SOLOS OU DOS SUBSTRATOS, A INVENÇÃO PROPÕE A UTILIZAÇÃO DE PELO MENOS UM COMPOSTO DE ENXOFRE DE FÓRMULA GERAL: NA QUAL R REPRESENTA UM RADICAL ALQUILO OU ALCENILO, N É IGUAL A 0, 1 OU 2, X É UM NÚMERO COMPREENDIDO ENTRE 0 E 4, E R' REPRESENTA UM RADICAL ALQUILO OU ALCENILO, OU, SOMENTE SE N = X = 0, UM ÁTOMO DE HIDROGÉNIO OU DE UM METAL ALCALINO. ESTES COMPOSTOS DE ENXOFRE (EM PARTICULAR O DISSULFURETO DE DIMETILO) PODEM SER APLICADOS DE ACORDO COM OS MÉTODOS CLÁSSICOS DE TRATAMENTO DOS SOLOS (INJEÇÃO, PULVERIZAÇÃO, GOTA A GOTA, ASPERSÃO) E NÃO TÊM EFEITOS FITOTÓXICOS.

## RESUMO

### **"TRATAMENTO PESTICIDA DOS SOLOS OU DOS SUBSTRATOS COM COMPOSTOS DE ENXOFRE"**

Para substituir o brometo de metilo em todas as suas utilizações no tratamento dos solos ou dos substratos, a invenção propõe a utilização de pelo menos um composto de enxofre de fórmula geral: na qual R representa um radical alquilo ou alcenilo, n é igual a 0, 1 ou 2, x é um número compreendido entre 0 e 4, e R' representa um radical alquilo ou alcenilo, ou, somente se  $n = x = 0$ , um átomo de hidrogénio ou de um metal alcalino. Estes compostos de enxofre (em particular o dissulfureto de dimetilo) podem ser aplicados de acordo com os métodos clássicos de tratamento dos solos (injeção, pulverização, gota a gota, aspersão) e não têm efeitos fitotóxicos.

### DESCRIÇÃO

#### **"TRATAMENTO PESTICIDA DOS SOLOS OU DOS SUBSTRATOS COM COMPOSTOS DE ENXOFRE"**

A presente invenção refere-se ao domínio da agricultura e tem, mais particularmente, por objeto a substituição do brometo de metilo em todas as suas utilizações de tratamento dos solos ou dos substratos de plantas (terrosos, turfas, lâ de rocha, etc.), em particular os que são destinados à agricultura, com vista a controlar nos mesmos os nemátodos, fungos patogénicos, insetos prejudiciais e bactérias.

Atualmente, a desinfecção dos solos ou dos substratos, por exemplo, dos que são destinados à agricultura intensiva e, nomeadamente, dos que são destinados à arboricultura, à horticultura e à produção de legumes, é efetuada maioritariamente por fumigação com brometo de metilo (consumo mundial superior a 70 000 toneladas), apresentando este composto, no estado gasoso, excelentes propriedades nematocidas, fungicidas, inseticidas e bactericidas. Infelizmente, este composto contribui para o empobrecimento da camada do ozono e, em conformidade com o acordo de Montreal (1992), já não deverá ser utilizado no ano de 2005 nos países industrializados. Parece, pois, ser uma necessidade urgente propor aos utilizadores substitutos igualmente eficazes e que respeitem o máximo possível o ambiente. Apesar dos esforços continuamente postos em prática, tanto pelas organizações governamentais como pelos organismos privados, não foi descoberto, até ao presente, qualquer substituto capaz, por si só e com o mesmo custo, de substituir o brometo de metilo em todas as suas

utilizações e com a mesma eficácia (ver USDA Report, Vol. 6, nº 4, e Citrus & Vegetable Magazine, Methyl bromide Update: Spring 2000). Com efeito, os principais substitutos atualmente propostos são muito tóxicos e necessitam, por conseguinte, de uma proteção respiratória dispendiosa e pouco cómoda (caso do dicloropropeno), ou então são de aplicação delicada e conduzem, por conseguinte, a resultados variáveis (caso do Metam de sódio, do Dazomet e do tetratiocarbonato), ou então são nitidamente mais onerosos (caso do iodeto de metilo).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, os únicos compostos de enxofre encarados como substitutos do brometo de metilo são o isotiocianato de metilo (MITC), o tetratiocarbonato ou compostos que produzem MITC, como o Metam de sódio e o Dazomet.

Apesar dos esforços consideráveis fornecidos pela comunidade científica, desde que o brometo de metilo foi banido, têm-se encontrado poucas moléculas capazes de o substituir na sua aplicação na fumigação dos solos ou dos substratos, ao passo que há centenas de pesticidas disponíveis (mais de 700 nematocidas, fungicidas, inseticidas, bactericidas reportados no Pesticide Manual, Tenth edition, Ed. Clive Tombin). A razão é a necessidade, para os fumigantes, de satisfazerem a duas condições essenciais: por um lado, não devem apresentar, nas doses em que são ativos, qualquer fitotoxicidade sobre as culturas colocadas depois do tratamento, e, por outro lado, devem ter a propriedade essencial e rara de não ser completamente absorvidos no solo e de se difundirem rapidamente, na forma de gás, na espessura do solo a tratar, encontrando-se os organismos patogénicos, com frequência, até 50 cm pelo

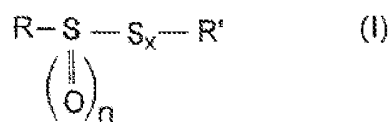
menos abaixo da superfície do solo; além disso, por razões evidentes de produtividade, assim como para limitar o risco de reinfestação, o tempo de tratamento durante o qual o fumigante atua deve ser o mais curto possível.

Encontram-se na literatura algumas indicações dispersas sobre a atividade específica de certas substâncias sulfurosas perante diversos organismos patogênicos; é o caso, por exemplo, dos dissulfuretos, que impedem as larvas de nemátodos de sair dos quistos (patente GB 249 830) ou que atuam sobre os insetos do tipo coleópteros ou lepidópteros presentes nos víveres armazenados (Pestic. Sci. Vol. 55, 1999, páginas 200-202); os dissulfuretos de dialilo têm uma ação fungicida sobre os esclerotes de *S. cepivorum* (Soil Biology and Biochemistry, Vol. 14, nº 3, páginas 229-232); as propriedades nematocidas dos dissulfuretos ou trissulfuretos derivados de certas aliáceas sobre os nemátodos do tipo *Meloidogyne incognita* são descritas no artigo Agric. Biol. Chem. 52 (9) 1988, páginas 2383-2385. Os tiosulfinafos ( $n = x = 1$ ) são descritos na literatura como nematocidas (JP 01 207 204), como fungicidas e antibacterianos (JP 57 075 906), como nematocidas e antimicrobianos (Agric. Biol. Chem., 1988, 52(9), páginas 2383-2385), como inseticidas contra os insetos dos víveres armazenados (Pestic. Sci. Vol. 55, 1999, páginas 200-202). A atividade inseticida dos vapores provenientes de fragmentos de alho, contendo entre outros dissulfuretos e tiosulfinafos, foi posta em evidência no pedido de patente FR-A-2 779 615, que propõe o emprego destes fragmentos para o tratamento por fumigação dos víveres armazenados. No entanto, para os peritos na técnica, não é, *a priori*, evidente que um fumigante para víveres armazenados possa ser conveniente para a aplicação

no tratamento dos solos ou dos substratos. Com efeito, como é explicado na coluna 3 (linhas 8 - 54) da patente US 5 518 692, que preconiza o iodeto de metilo como substituto do brometo de metilo, o solo é um meio bastante mais complexo do que os víveres armazenados (humidade não uniforme, partículas de diâmetros muito variáveis, etc.), e os organismos a controlar são muito mais numerosos e variados no caso dos solos. Por consequência, a maior parte dos fumigantes utilizados para os víveres armazenados não é utilizada para a fumigação dos solos.

Não se encontra, na técnica anterior, qualquer indicação de uma atividade pesticida global destas substâncias, isto é, uma atividade simultaneamente nematocida, fungicida, inseticida e bactericida. A atividade nematocida, fungicida e bactericida dos polissulfuretos de dimetilo (que têm um número de átomos de enxofre superior ou igual a 3) é descrita na patente US 2,917,429, mas não se faz ali menção de propriedades inseticidas e o dissulfureto de dimetilo é referido como tendo uma atividade nula perante um grande número de fungos.

Descobriu-se agora que os compostos de enxofre de fórmula geral:



na qual R representa um radical alquilo ou alcenilo que contém de 1 a 4 átomos de carbono, n é igual a 0, 1 ou 2, x é um número compreendido entre 0 e 4, e R' representa um radical alquilo ou alcenilo que contém de 1 a 4 átomos de carbono, ou, apenas se n = x = 0, um átomo de hidrogénio ou de metal alcalino, são particularmente interessantes para a

fumigação dos solos e dos substratos, visto que eles satisfazem às três condições essenciais para poderem ser utilizados, na prática, na desinfecção dos solos ou dos substratos: apresentam propriedades pesticidas globais (nematocidas, fungicidas, inseticidas, bactericidas); são capazes de se difundir rapidamente na espessura do solo a tratar para conduzir a uma concentração de gás suficiente para exterminar os organismos patogénicos presentes; nas doses necessárias para matar estes organismos patogénicos, os compostos de fórmula (I) não apresentam qualquer fitotoxicidade sobre as culturas colocadas depois do tratamento. Este conjunto de propriedades indispensáveis para a aplicação em vista não tinha sido nunca descrito antes para os compostos de fórmula (I).

Como substitutos do brometo de metilo, os compostos de fórmula (I) são tanto mais interessantes quanto é facto que alguns já estão presentes na natureza como provenientes da degradação natural das crucíferas e das aliáceas. Em particular, os tiosulfinafos, abrangidos pela fórmula geral (I), são produtos emitidos naturalmente quando se moem as aliáceas e, nestas condições, podem ser utilizados na agricultura biológica. Por outro lado, uma vez que não contêm átomos de halogéneos, geradores de radicais halogenados responsáveis pela destruição catalítica do ozono atmosférico, os compostos de fórmula (I) são inócuos para a camada do ozono.

Como exemplos não limitativos de radicais R e R', podem-se citar os radicais metilo, propilo, alilo e 1-propenilo. Entre os compostos de fórmula (I), são preferidos os compostos para os quais  $n = 0$ . Outros compostos preferidos

são os dissulfuretos ( $n = 0$ ,  $x = 1$ ) e mais particularmente o dissulfureto de dimetilo (DMDS).

No entanto, não faz parte da invenção, tal como é reivindicada, apenas o tratamento pesticida dos solos ou dos substratos de plantas por fumigação, com efeito cumulativo, nematocida, fungicida, inseticida e bactericida, caracterizado pelo facto de se aplicar no solo ou no substrato, numa dose compreendida entre 150 e 1000 kg/ha, de pelo menos um composto de enxofre que é o dissulfureto de dimetilo.

Os compostos de fórmula (I) podem ser utilizados no estado puro ou sob diversas formas que, consoante a natureza do composto (I), podem ser uma emulsão aquosa, uma microemulsão, um produto microencapsulado ou suportado por um sólido, uma solução em água, num solvente orgânico, ou em mistura com um produto que pode ter, ele próprio, uma atividade para o tratamento dos solos.

Todas estas formulações podem ser realizadas de acordo com métodos bem conhecidos dos peritos na técnica. Assim, por exemplo, as emulsões aquosas e as microemulsões podem ser obtidas adicionando-se um ou vários meios tensioativos ao composto de fórmula (I), e em seguida adicionando à mistura obtida uma certa quantidade de água, de forma a obter-se uma emulsão estável ou uma microemulsão.

São mais particularmente adaptados à preparação das emulsões aquosas ou das microemulsões os meios tensioativos de preferência hidrófilos, ou seja, os que têm um valor HLB ("Hydrophile Lipophile Balance") superior ou igual a 8, que podem ser de natureza aniónica, catiónica, não iónica ou

anfótera. Como exemplos não limitativos de meios tensioativos aniónicos, podem citar-se:

- os sais de metal alcalino, alcalinoterroso, de amónio ou de trietanolamina dos ácidos alquil-, aril- ou alquilaril-sulfónicos, dos ácidos gordos com pH básico, do ácido sulfossuccínico ou dos ésteres alquílicos, dialquílicos, alquilarílicos ou polioxietileno-alquilarílicos do ácido sulfossuccínico,
- os sais de metal alcalino ou alcalinoterroso dos ésteres de ácido sulfúrico, fosfórico, fosfónico ou sulfoacético e de álcoois gordos saturados ou insaturados, assim como os seus derivados alcoxilados,
- os sais de metal alcalino ou alcalinoterroso dos ácidos alquil-aril-sulfúricos, alquil-aril-fosfóricos, alquil-aril-sulfoacéticos, assim como os seus derivados alcoxilados.

Os meios tensioativos catiónicos utilizáveis são, por exemplo, os da família dos alquil-amónio quaternários, dos sulfónios ou das aminas gordas de pH ácido, assim como os seus derivados alcoxilados.

Como exemplos não limitativos de meios tensioativos não iónicos podem citar-se os alquil-fenóis alcoxilados, os álcoois alcoxilados, os ácidos gordos alcoxilados, os ésteres gordos de glicerina ou os derivados gordos do açúcar.

Os meios tensioativos anfóteros utilizáveis são, por exemplo, as alquil-betainas ou as alquil-aurinas.

Os meios tensioativos preferidos para a preparação das emulsões aquosas e das microemulsões são os compostos à base de benzeno-sulfonato de alquilo e de alquil-fenol alcoxilado.

Os solventes orgânicos utilizáveis para dissolver os compostos de fórmula (I) de acordo com a invenção são os hidrocarbonetos, os álcoois, os éteres, as cetonas, os ésteres, os solventes halogenados, os óleos minerais, os óleos naturais e os seus derivados, assim como os solventes polares apróticos, tais como a dimetilformamida, o sulfóxido de dimetilo ou a N-metilpirrolidona. São particularmente convenientes os solventes biodegradáveis, mais particularmente os ésteres metílicos dos óleos de colza.

Os produtos com atividade pesticida particularmente adaptados para serem misturados aos compostos de fórmula (I) de acordo com a invenção são produtos puros, tais como o 1,3-dicloropropeno ou a cloropicrina ( $\text{Cl}_3\text{C}-\text{NO}_2$ ), eles próprios utilizados como fumigantes, as soluções aquosas de produtos tais como o Metame de sódio ( $\text{CH}_3-\text{NH}-\text{CS}_2^-\text{Na}^+$ ) ou o tetratiocarbonato de sódio ( $\text{N}_2\text{CS}_4$ ), igualmente utilizados como fumigantes, ou qualquer outro produto que tenha uma atividade complementar ou sinérgica com os compostos de fórmula (I), como o MITC ( $\text{CH}_3-\text{NCS}$ ) ou o Dazomet (gerador de MITC).

Os compostos de fórmula (I) e as composições que os contêm podem ser aplicados de acordo com um qualquer dos processos clássicos de introdução de pesticidas no solo, como por exemplo, a injeção por relhas, que permite introduzir o produto em profundidade, a pulverização sobre o solo, o

gota a gota por um sistema de irrigação clássica ou de aspersão do tipo "sprinkler". Depois da introdução do produto no solo e de uma eventual repartição (por exemplo, por uma pá rotativa, no caso de uma injeção no solo), a superfície do solo pode eventualmente ser "fechada", quer por uma cobertura da superfície por meio de um rolo alisador, quer por um filme plástico.

As doses do composto (I) a utilizar para se obter o efeito desejado situam-se geralmente entre 150 e 1000 kg/ha e dependem da natureza do composto (I), do nível de infestação do solo, da natureza dos animais nocivos e dos organismos patogénicos, do tipo de cultura e do solo, e dos métodos de aplicação. Nessas doses, observa-se o efeito pesticida geral procurado (ao mesmo tempo nematocida, fungicida, inseticida e bactericida) e não o efeito fitotóxico.

Não se sai do âmbito da presente invenção associando-se o tratamento pelo DMDS com um tratamento (simultâneo ou não) com uma ou várias outras substâncias pesticidas.

Os exemplos que se seguem ilustram a invenção.

#### **EXEMPLO 1 (formulações)**

Exemplo 1a: podem ser obtidas emulsões aquosas que têm uma estabilidade suficiente para permitir uma aplicação homogénea do produto no solo, depois da preparação da emulsão, misturando-se:

- 692 g de dissulfureto de dimetilo, 38,5 g de Toximul<sup>®</sup> D, 38,5 g de Toximul<sup>®</sup> H (dois meios tensioativos comercializados pela Sociedade Stepan, à base de

- benzeno-sulfonato de alquilo e de alquilfenol alcoilado em solução alcoólica), e 9230 g de água: formulação A,
- 1800 g de dissulfureto de dimetilo, 160 g de Toximul<sup>®</sup> DH68, 40 g de Toximul<sup>®</sup> DM83 (dois meios tensioativos comercializados pela Sociedade Stepan, à base de benzeno-sulfonato de alquilo), e 8000 g de água: formulação B,
  - 1600 g de dissulfureto de dimetilo, 320 g de Toximul<sup>®</sup> DH68, 80 g de Toximul<sup>®</sup> DM83 (dois meios tensioativos comercializados pela Sociedade Stepan, à base de benzeno-sulfonato de alquilo), e 8000 g de água: formulação C.

Exemplo 1b: pode ser preparada uma microemulsão de água - dissulfureto de dimetilo, adicionando-se 4400 g de água a uma mistura de 4400 g de dissulfureto de dimetilo, 960 g de Toximul<sup>®</sup> DH68 e 240 g de Toximul<sup>®</sup> DM83 (dois meios tensioativos comercializados pela Sociedade Stepan, à base de benzeno-sulfonato de alquilo): formulação D.

Exemplo 1c: pode ser obtida uma solução de dissulfureto de dimetilo no éster metílico de colza, solvente biodegradável que permite aumentar o ponto de inflamação da preparação a aplicar e, por conseguinte, melhorar a segurança do aplicador, dissolvendo-se 3000 g de dissulfureto de dimetilo em 7000 g de éster metílico de colza: formulação E.

## **EXEMPLO 2 (fitotoxicidade)**

Exemplo 2a:

A ausência de fitotoxicidade do dissulfureto de dimetilo (DMDS) aplicado sob a forma da formulação A, na gama de

doses em que é eficaz sobre os organismos patogénicos do solo, foi demonstrada sobre plantas jovens de pepinos (9 cm, 2 folhas, híbrido ARIS) e de tomates (13 cm, 3 folhas, híbrido JUMBO).

Para os dois tipos de cultura, foram realizados 4 tratamentos em 20 plantas:

- controle não tratado
- 360 g/ha de DMDS
- 540 g/ha de DMDS
- 720 g/ha de DMDS.

Cinco dias depois do tratamento, as plantas jovens são transplantadas para vasos de 20 cm de diâmetro e 35 cm de altura.

As observações que se referem ao número de folhas por planta e ao estado visual das plantas são realizadas 15 e 41 dias depois da transplantação:

**Quadro 1: número médio de folhas por planta**

Tratamento	tomate		pepino	
	após 15 dias	após 41 dias	após 15 dias	após 41 dias
controle não tratado	5,5	9,7	5,4	9,8
DMDS: 360 kg/ha	5,3	9,6	5,3	9,8
DMDS: 540 kg/ha	5,3	9,4	5,7	9,7
DMDS: 720 kg/ha	5,7	9,8	5,7	9,9

Os resultados do quadro 1 mostram que não há diferenças significativas entre o controle não tratado e as plantas tratadas com o DMDS, qualquer que seja a concentração ensaiada; além disso, não foi detetado qualquer sintoma visual de fitotoxicidade.

Exemplo 2b: ausência de fitotoxicidade sobre a alface do DMDS, aplicado a 150 kg/ha, em pleno campo, sob estufa.

### **1. Material e métodos**

Variedade de alface: Sprintia

Tratamento: o DMDS é aplicado sob a forma da formulação A com o auxílio de um pulverizador de jato, em seguida é incorporado a uma profundidade de cerca de 5 cm com uma fresa rotativa. O solo é em seguida coberto por um filme de polietileno preto.

Plantação: 7 dias depois do tratamento, à razão de 160 000 pés/ha.

Recolha: 2 meses e 20 dias depois da plantação.

### **2. Resultados**

Observações visuais no terreno, ais 1 e 2 meses depois da plantação, não revelaram qualquer sinal de fitotoxicidade. Na recolha, foi determinado o peso médio das alfaces tratadas com o DMDS, que se verificou ser de 505 g, em comparação com 40 g para a testemunha sem tratamento. Pode, pois, concluir-se daqui que o tratamento efetuado com o DMDS não tem efeitos fitotóxicos sobre a alface.

### **EXEMPLO 3 (DIFUSÃO NO SOLO)**

A velocidade de difusão do DMDS foi estudada enchendo-se um recipiente estanque de pírex, de 3,3 litros e de 40 cm de altura, com 2,5 litros de terra (ou seja, 33 cm), proveniente do vale de Garona (solo arenoso-lodoso, contendo 1,6% de matéria orgânica); o DMDS foi depositado à superfície da terra em duas doses: 300 e 800 kg/ha, ou seja, considerando uma desinfeção em 30 cm, doses de 100 e 266,6 g/m<sup>3</sup> de solo. Medem-se em seguida, por cromatografia em fase gasosa, em função do tempo (em horas), as

concentrações de DMDS sob a forma gasosa (em  $\text{g/m}^3$ ) no volume livre superior do recipiente (ponto A), assim como a 11 cm (ponto B), a 22 cm (ponto C) e a 33 cm (ponto D) abaixo do nível da terra, graças a 3 aberturas equipadas com septos estanques no lado do recipiente; obtém-se assim a evolução da concentração em função do tempo para os 4 pontos de medição, como se mostra no quadro 2 no caso da dose de 800 kg/ha.

**Quadro 2: concentrações de DMDS em  $\text{g/m}^3$  - caso da dose de 800 kg/ha**

Tempo em h	A (0 cm)	B (-11 cm)	C (-22 cm)	D (-33 cm)
0	0	0	0	0
1	144,9	76,6	3	0
3	152,7	73,9	5,1	0,3
5	96,3	63,8	48,4	21,5
5,5	123,7	91,4	58,3	29,4
24	32,7	30,2	40,1	34,4
96	11,8	11,5	12,9	14,6

O quadro 2 mostra que bastam 24 horas aproximadamente para que a concentração de DMDS seja homogénea em toda a espessura da coluna de terra.

O produto CT das concentrações C pelos tempos de medição T é um outro dado essencial, que indica as doses acumuladas de DMDS às quais são submetidos os organismos patogénicos que se encontram eventualmente nos diferentes pontos de medição. Verificam-se assim, para as duas concentrações ensaiadas, os valores de CT em  $\text{gh/m}^3$  indicados no quadro 3.

**Quadro 3**

doses	A (0 cm)	B (-11 cm)	C (-22 cm)	D (-33 cm)
300 kg/ha	3187	2737	2753	2210
800 kg/ha	4145	3327	3276	2809

Os valores de CT medidos são pois da ordem de 2500 gh/m<sup>3</sup> para uma dose de 300 kg/ha e de 3000 gh/m<sup>3</sup> para uma dose de 800 kg/ha.

#### **EXEMPLO 4 (PROPRIEDADES FUNGICIDAS)**

O efeito fungicida do DMDS foi demonstrado em quatro dos organismos patogénicos comuns e prejudiciais para as principais culturas hortícolas descritas no artigo "Désinfecter les sols autrement", publicado em junho de 1999 na revista do CTIFL (Centro técnico interprofissional dos frutos e legumes). Estes quatro organismos são os seguintes:

↳ *Phytophthora cactorum*, um dos representantes mais conhecidos da família dos Phytophthora, fungos polípagos que atacam particularmente o tomate, o pimento e o morangueiro, representando estas três culturas a maioria do consumo do brometo de metilo a nível mundial. O *Phytophthora cactorum*, em particular, ataca principalmente o morangueiro e as árvores de fruto.

↳ *Rhizoctonia solani*: grupo de fungos patogénicos polípagos muito importante no género da *Rhizoctonia* e que atacam numerosas culturas hortícolas, entre as quais o pimento e a alface.

↳ *Sclerotinia sclerotiorum*: fungo polípago que ataca em particular as culturas de melões.

↳ *Sclerotium rolfsii*: fungo igualmente polípago que se encontra, por exemplo, nas culturas de melão e de courgete.

Estes quatro fungos foram estudados sob a forma seguinte:

- *Sclerotinia sclerotiorum*: esclerotes
- *Sclerotium rolfsii*: esclerotes

- *Rhizoctonia solani*: grãos de cevada colonizados (micélio e esclerotes)
- *Phytophthora cactorum*: grãos de painço colonizados (micélio, esporângios e oosporos).

### **Preparação dos fungos (24 horas antes da operação de gaseamento)**

1. Preparação dos esclerotes de *Sclerotinia sclerotiorum* e de *Sclerotium rolfsii*: os fungos são cultivados em meio de malte gelosado até à obtenção dos esclerotes. Os esclerotes são extraídos em condições estéreis e são conservados a seco em caixas de Petri vazias, até à sua utilização. Os esclerotes utilizados para o ensaio têm mais de 3 meses e estão perfeitamente adormecidos.

2. Preparação de *Phytophthora cactorum* e de *Rhizoctonia solani*:

O painço e a cevada que servem para a multiplicação dos dois fungos são humedecidos com água ultrapura por imersão durante 24 horas. Os grãos são em seguida escorridos ao de leve e em seguida repartidos por frascos e submetidos a autoclave (3 sujeições à autoclave a 110°C durante 20 minutos, 3 vezes com 24 horas de intervalo). São introduzidos fragmentos de cultura de fungos nos frascos, que são em seguida incubados a 22°C ± 2°C (luz branca, 18 h), até à obtenção de uma colonização homogénea. Os grãos são em seguida retirados dos frascos em condições estéreis, são secos em corrente esterilizada de uma "hotte" e em seguida conservados a seco até à sua utilização.

### **Condições de gaseamento e de dessorção**

O conjunto dos lotes de fungos a tratar é colocado durante algumas horas à temperatura de ensaio (20°C). São

submetidos ao gaseamento, aquando de cada ensaio, entre 35 e 300 unidades de fungos ou de "propágalos" (grãos ou esclerotes).

Cada recinto de fumigação, compreendendo uma ou várias espécies de fungos, corresponde a um balão de vidro estanque ao gás, com um volume de 11 litros. Cada balão está equipado com orifícios, inferior para a introdução do DMDS líquido, e superior para a toma de amostras de ar com uma seringa.

Antes da introdução do gás, é realizado um vácuo parcial (-500 mbars) no balão com uma bomba de vácuo. Isto permite, por um lado, evitar o fenómeno de sobrepressão devido à expansibilidade do DMDS no balão e, por outro lado, favorecer uma melhor homogeneidade da mistura ar-gás nos primeiros segundos que se seguem à injeção. O DMDS (pesado com precisão ao mg) é injetado com a seringa, por via líquida, através do orifício de baixo, isto é, por baixo da rede colocada a meia altura do balão e que suporta os lotes de fungos. Depois da introdução do produto, a pressão interna do balão é restabelecida à pressão atmosférica. Um agitador magnético funciona durante todo o tempo de duração do tratamento, para homogeneizar bem a mistura gás-ar.

No final do gaseamento, é retirada a tampa do balão. Um minuto depois desta operação, os lotes de fungos gaseados são retirados e deixados ao ar livre durante 15 minutos, para dessorção do DMDS. São em seguida transvasados para uma caixa de Petri, permanecendo esta aberta durante 5 minutos para permitir uma perfeita dessorção do gás.

### **MEDIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GÁS**

Determina-se, por meio de CPG com detetor FID, a concentração média (C em g/m<sup>3</sup>) de DMDS no recinto de fumigação depois da homogeneização do gás no ar do recinto e, tendo em conta a duração da exposição (T em horas), calcula-se o produto CT (g.h/m<sup>3</sup>) que, no domínio da fumigação, é o parâmetro chave a considerar, visto que a eficácia biológica de um gás face a um agente patogénico dado não é eficaz senão se este último tiver sido exposto a uma certa concentração média C durante uma certa duração de exposição, quer dizer, a um certo valor do produto CT, valor (ou dose) que se pode atingir de diferentes formas: concentrações baixas e longas durações de exposição, ou o inverso.

### **Condições de leitura dos resultados**

Grãos: depois do gaseamento, os grãos são depositados sobre um meio seletivo, à razão de 5 a 10 por caixa de Petri de 90 mm (*Rhizoctonia*: malte-agar; *Phytophthora*: malte-agar + pimaricina, ampicilina, rifampicina, benomil).

Esclerotes: depois do gaseamento, os esclerotes são desinfetados superficialmente com água de Javel (1% de NaOCl), enxaguados duas vezes com água esterilizada, em seguida depositados à razão de um por caixa sobre um meio de malte agar-cloranfenicol (200 ppm).

### **Expressão dos resultados**

Anota-se diariamente o número de propágulos que dão nascimento a uma colónia (propágulos viáveis), até que já não haja mais evolução, e no máximo até 19 dias depois do dia do gaseamento.

Os resultados são expressos em:

- ↪ **viabilidade** (V), isto é, a percentagem de propágulos viáveis que tenham dado origem a uma colónia,
- ↪ **redução de viabilidade** (R<sub>v</sub>) em relação à testemunha, isto é

$$R_v = \frac{V_{\text{testemunha}} - V}{V_{\text{testemunha}}} \times 100$$

- ↪ **nota de vigor** (N<sub>m</sub>): a cada propágulo que tenha dado origem a uma colónia é atribuída uma nota (N), que descreve a rapidez deste propágulo para se desenvolver; esta nota, igual à diferença entre o número total de dias de observação (19 no máximo) e o número de dias entre o depósito em caixa de Petri e o desenvolvimento da colónia, é tanto maior quanto mais próximo estiver o aparecimento da colónia da data de depósito em caixa de Petri. Para cada um dos ensaios determina-se em seguida uma média (N<sub>m</sub>) das notas atribuídas.
- ↪ **redução da nota de vigor** (R<sub>Nm</sub>) em relação à testemunha, isto é:

$$R_{Nm} = 100 - \frac{Nm}{Nm_{\text{testemunha}}} \times 100$$

## RESULTADOS

### 1. Eficácia biológica do DMDS sobre *Phytophthora cactorum*

Os resultados reunidos no Quadro 4 mostram claramente que, para doses CT superiores a cerca de 2500 g.h/m<sup>3</sup>, a eficácia fungicida progride regularmente com a dose CT: baixa da

viabilidade e da nota de vigor. A eficácia total (0% de viabilidade) é obtida na vizinhança de 3500 g.h/m<sup>3</sup>.

Quadro 4 Recapitulativo do conjunto das leituras expressas em termos de viabilidade e de vigor sobre *Phytophthora cactorum* (X = número de grãos)

X	C	T	CT	viabilidade		vigor	
				V	RV	Nm (em 12 dias)	RNm
60	17,46	24	419	91,7	6,8	7,7	15,5
60	26,04	24	625	100	-1,7	8,05	11,9
60	29,29	24	703	100	-1,7	8,3	9,1
60	37,79	24	907	100	-1,7	7,2	21,2
60	15,91	66	1050	95	5,0,	5,5	43,1
90	21,24	66	1402	97,8	2,2	6,6	32,2
60	30,96	48	1450	95	3,4	5,4	40,7
90	28,77	66	1899	97,8	2,2	5,6	42,6
90	30,02	66	1981	97,8	2,2	5,3	45,7
60	51,25	48	2460	43,3	55,9	1,7	81,2
300	37,44	66	2471	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
90	42,98	66	2837	16,7	83,3	0,6	93,6
300	45,06	66	2974	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
90	48,02	66	3169	1,1	98,9	0,05	99,5
300	52,53	66	3467	0	100	0	100

\* n.d. = não determinado

## 2. Eficácia biológica do DMDS sobre *Rhizoctonia solani*

Os resultados reunidos no Quadro 5 mostram claramente que, para doses CT superiores a cerca de 2000 g.h/m<sup>3</sup>, a eficácia fungicida progride regularmente com a dose CT: baixa da viabilidade e da nota de vigor. A eficácia total (0% de viabilidade) é obtida na vizinhança de 3500 g.h/m<sup>3</sup>.

Quadro 5: Recapitulativo do conjunto das leituras expressas em termos de viabilidade e de vigor sobre *Rhizoctonia solani* (X = número de grãos)

X	C	T	CT	viabilidade		vigor	
				V	RV	Nm (em 11 dias)	RNm
60	17,46	24	419	100	0	9,0	0
60	26,04	24	625	100	0	8,7	3,1
70	29,29	24	703	100	0	8,3	7,3
70	37,79	24	907	100	0	7,1	21,6
65	15,91	66	1050	89,2	10,8	7,0	22,2
65	21,24	66	1402	96,9	3,1	7,6	15,0
65	30,96	48	1450	98,5	1,5	4,4	51,3
70	28,77	66	1899	84,3	15,7	6,0	33,2
75	30,02	66	1981	94,7	5,3	7,4	17,2
73	51,25	48	2460	11,0	89,0	0,3	96,2
286	37,44	66	2471	24,1	75,9	0,6	92,0
90	42,98	66	2837	2,2	97,8	0,1	98,4
286	45,06	66	2974	9,4	90,6	0,1	98,4
80	48,02	66	3169	1,2	98,8	0,05	99,3
290	52,53	66	3467	0	100	0	100

### **3. Eficácia biológica do DMDS sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

Os resultados reunidos no Quadro 6 a seguir mostram claramente que, para doses CT superiores a cerca de 1000 g.h/m<sup>3</sup>, a eficácia fungicida progride regularmente com a dose CT: baixa da viabilidade e da nota de vigor. A eficácia total (0% de viabilidade) é obtida na vizinhança de 3500 g.h/m<sup>3</sup>, considerando que o ponto CT 3467 é um ponto anormal.

Quadro 6: Recapitulativo do conjunto das leituras expressas em termos de viabilidade e de vigor sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (X = número de esclerotes)

X	C	T	CT	viabilidade		vigor	
				V	RV	Nm (em 19 dias)	RNm
39	17,46	24	419	89,7	-3,0	13,3	-3,6
41	26,04	24	625	87,8	-0,8	12,8	0,1
41	29,29	24	703	85,4	2,0	12,6	2,2
38	37,79	24	907	81,6	6,3	12,0	6,6
67	15,91	66	1050	41,8	56,1	5,1	63,6
62	21,24	66	1402	46,8	50,9	1,3	90,6
47	30,96	48	1450	29,8	65,8	1,0	92,1
64	28,77	66	1899	29,6	68,9	3,6	74,8
54	30,02	66	1981	20,3	78,7	2,7	81,2
41	51,25	48	2460	14,6	83,2	0,7	94,9
170	37,44	66	2471	32,9	67,1	4,6	70,5
64	42,98	66	2837	14,1	85,2	1,8	87,5
170	45,06	66	2974	11,2	88,8	1,6	89,9
64	48,02	66	3169	0	100	0	100
170	52,53	66	3467	32,3	67,7	3,3	79,0

#### 4. Eficácia biológica do DMDS sobre *Sclerotium rolfsii*

Os resultados obtidos estão reunidos no Quadro 7 a seguir. Para este fungo foi observada uma ligeira degradação da qualidade do inóculo no decurso do tempo. No entanto, a viabilidade e o vigor são fortemente afetados a partir dos valores de CT de 900 a 1000 g.h/m<sup>3</sup> e a eficácia total é obtida entre 2000 e 2500 g.h/m<sup>3</sup>.

Quadro 7: Recapitulativo do conjunto das leituras expressas em termos de viabilidade e de vigor sobre *Sclerotium rolfsii* (X = número de esclerotes)

X	C	T	CT	viabilidade		vigor	
				v	RV	Nm (em 19 dias)	RNm
44	17,46	24	419	59,1	33,7	5,1	40,9
41	26,04	24	625	53,7	39,8	4,8	44,3
37	29,29	24	703	51,4	42,4	4,4	48,7
37	37,79	24	907	16,2	81,8	1,4	84,2
58	15,91	66	1050	27,6	68,0	2,1	71,1
60	21,24	66	1402	18,3	78,7	1,3	81,8
40	30,96	48	1450	15,0	83,2	0,7	91,8
65	28,77	66	1899	3,1	96,4	0,2	96,8
70	30,02	66	1981	4,3	95,0	0,3	95,1
40	51,25	48	2460	10,0	88,8	0,4	94,7
170	37,44	66	2471	0	100	0	100
90	42,98	66	2837	0	100	0	100
170	45,06	66	2974	0	100	0	100
80	48,02	66	3169	0	100	0	100
170	52,53	66	3467	0	100	0	100

Em resumo, para as quatro espécies de fungos estudadas, o DMDS provoca um decréscimo da população muito nítido a partir de doses CT compreendidas entre 2000 e 2500 g.h/m<sup>3</sup>, ou mesmo na vizinhança de 1000 g.h/m<sup>3</sup> no caso de *Sclerotinia* e *Sclerotium*, e uma mortalidade total para doses CT compreendidas entre 3000 e 3500 g.h/m<sup>3</sup>, ou mesmo entre 2000 e 2500 g.h/m<sup>3</sup>, para *Sclerotium*.

#### **EXEMPLO 5 (PROPRIEDADES NEMATOCIDAS)**

O efeito nematocida do dissulfureto de dimetilo (DMDS), do dissulfureto de dipropilo (DPDS) e do tiosulfinato de dialilo (alicina), três produtos principais da degradação das aliáceas, foi demonstrado por ensaios *in vitro* realizados sobre larvas de *Meloidogyne arenaria*, uma espécie entre os nemátodos de bugalhos das raízes, muito

nocivos, extremamente polifagos e dos mais expandidos no mundo, na maior parte das culturas de legumes, em particular nas de tomateiros e morangueiros, que são as culturas que consomem mais brometo de metilo. Apenas o tratamento à base de DMDS faz parte da invenção reivindicada.

### **Material e métodos**

As larvas juvenis de segunda fase (a fase livre e infestante) são mergulhadas 24 horas na solução a ensaiar, em seguida conta-se o número de larvas paralisadas antes de as transferir para a água pura por mais 24 horas. No final das 48 horas assim decorridas, contam-se de novo as larvas paralisadas e no dia seguinte as larvas realmente mortas.

A criação dos nemátodos foi realizada em plantas de tomates. Os ensaios foram realizados com soluções aquosas de DMDS a 0,0001%, 0,1% e 5% em massa, de DPDS a 1%, 5% e 10% em massa, e de alicina a 0,0003%, 0,0015% e 0,003% em massa, em comparação com uma testemunha de água pura, e foram repetidos cinco vezes. A atividade ovicida foi também pesquisada segundo estas mesmas modalidades, contando-se o número de eclosões depois de 5 a 20 dias, consoante a exposição aos produtos.

### **Resultados**

Para uma concentração inferior a 1%, o DMDS não tem senão uma atividade nematostática muito fraca e nenhuma atividade nematocida.

Para uma concentração superior ou igual a 1%, o DMDS e o DPDS apresentam uma acentuada atividade nematostática e nematocida, como mostram claramente os quadros 8 e 9. É

obtida uma eficácia total (100% de mortalidade) para concentrações superiores ou iguais a 1% no caso do DPDS.

A alicina apresenta igualmente uma atividade nematostática e nematocida acentuada para concentrações muito mais baixas, como o mostra o quadro 10. Não obstante, não foi procurada neste caso uma eficácia total (100% de mortalidade).

Quadro 8: eficácia do dissulfureto de dimetilo (DMDS) sobre as larvas

Concentração em massa (%)	taxa de imobilidade após 24 h (%)	taxa de imobilidade após 48 h (%)	taxa de mortalidade após 72 h (%)
0 (testemunha)	8	6	9
1	72	84	80
5	97	98	98

Quadro 9: eficácia do dissulfureto de dipropilo (DPDS) sobre as larvas

Concentração em massa (%)	taxa de imobilidade após 24 h (%)	taxa de imobilidade após 48 h (%)	taxa de mortalidade após 72 h (%)
0 (testemunha)	8	7	9
1	89	100	100
5	93	100	100
10	95	100	100

Quadro 10: eficácia da alicina sobre as larvas

Concentração em massa (%)	taxa de imobilidade após 24 h (%)	taxa de imobilidade após 48 h (%)	taxa de mortalidade após 72 h (%)
0 (testemunha)	2	10	8
0,0003	7	49	12
0,0015	19	85	45
0,003	49	65	63

Como se depreende dos quadros 11 e 12, o DMDS e o DPDS mostram igualmente uma atividade ovicida muito acentuada. Nos dois casos, observa-se cerca de 97% de redução do número de eclosões no último dia de observação.

Quadro 11: eficácia do DMDS sobre os ovos de nemátodos

Concentração em massa (%)	número de eclosões (acumulado)			
	D5	D10	D13	D17
0 (testemunha)	141	179	184	184
1	7	7	7	7
5	2	2	5	5
10	0	2	5	5

Quadro 12: eficácia do DPDS sobre os ovos de nemátodos

Concentração em massa (%)	número de eclosões (acumulado)				
	D5	D8	D12	D15	D19
(0) testemunha	550	810	990	1030	1030
1	117	183	200	200	200
5	67	67	67	67	67
10	33	33	33	33	33

### **EXEMPLO 6 (PROPRIEDADES INSETICIDAS)**

A atividade inseticida do dissulfureto de dimetilo (DMDS), do dissulfureto de dialilo (DADS) e do tiossulfinato de dialilo (alicina) foi demonstrado por ensaios *in vitro* sobre um inseto do solo, uma térmita (*Reticulitermes santonensis*). Apenas o tratamento à base de DMDS faz parte da invenção reivindicada.

### **Material e métodos**

Madeira morta infestada de térmitas foi recolhida do solo num terreno ocupado por uma colónia. Esta madeira morta serve de meio de criação. A criação foi mantida a 25°C constantes e a uma alternância dia/noite 12:12.

Os insetos são recolhidos à razão de 2 soldados para 28 obreiras.

Os ensaios são realizados em frascos de vidro com um volume de 3 L, hermeticamente fechados e contendo os insetos.

O produto a ensaiar é introduzido por um orifício de 2 mm de diâmetro, com o auxílio de uma micropipeta, e depositado sobre um papel de filtro (2 × 5 cm; Whatman n° 1) suspenso no centro do frasco, para onde migra por capilaridade e se vaporiza rapidamente. O orifício é fechado de novo hermeticamente o mais depressa possível.

Os frascos são colocados 24 horas numa estufa, nas mesmas condições de criação.

Ao fim de 24 horas, após alguns instantes de arejamento, é efetuada uma primeira contagem, em seguida os insetos são recolocados em condições de criação durante mais 24 horas. Por conseguinte, a contagem da mortalidade é realizada ao fim de 48 horas. É esta última contagem que vai servir para calcular os valores CL50 às 24 horas de fumigação, não sendo a primeira senão uma indicação da evolução pós-tratamento. Com efeito, numerosos fumigantes têm um efeito de choque "*knock-down*" [derrube], que pode fazer pensar na morte para insetos que se revelam vivos no dia seguinte, depois de recuperação. Cada ensaio é realizado sobre uma população de 30 a 50 insetos e é acompanhado por uma testemunha sem tratamento. São realizadas várias repetições com doses próximas do valor CL50.

**Quadro 13:** resultados (método dos "probits")

	<b>DMDS</b>	<b>DADS</b>	<b>alicina</b>
CL50 em g × 24 h/m <sup>3</sup>	0,095	0,011	0,010

**Conclusão:**

Como foi indicado no quadro 13, os três produtos ensaiados mostram uma excelente atividade inseticida sobre o inseto do solo utilizado. A atividade do DADS, próxima da da alicina, é superior à do DMDS, que é, ela própria, comparável à do brometo de metilo (0,1 g × 24 h/m<sup>3</sup>).

**EXEMPLO 7 (EFEITOS SOBRE OS MICRORGANISMOS)**

O efeito do DMDS, aplicado a 150 kg/ha sob a forma da formulação A, sobre os microrganismos do solo, foi avaliada segundo os métodos normalizados seguintes:

- "Recommended tests for assessing the side-effects of pesticides on the soil micro flora", Technical Report Agricultural Research Council Weed Research Organizatin, 1980 (59).
- "OECD Guideline for Testing of Chemicals – Soil Micro-organisms: Carbon Mineralization Test", Draft Document, June 1996.

O efeito do DMDS sobre os microrganismos do solo é medido pela diminuição do oxigénio consumido por estes microrganismos, expresso em mg de O<sub>2</sub> por kg de solo seco por hora, 14, 28, 42, 57 dias após o tratamento (quadro 14).

**Quadro 14**

	<b>dia 0</b>	<b>dia 14</b>	<b>dia 28</b>	<b>dia 42</b>	<b>dia 57</b>
controle não tratado	11,23	10,18	7,87	9,12	7,30
DMDS 150 kg/ha	9,70	8,74	6,62	8,93	4,90

O quadro 14 mostra uma diminuição significativa do oxigénio consumido pelos microrganismos, atribuída a uma redução da sua população.

Lisboa, 6 de Outubro de 2011

## REIVINDICAÇÕES

1. Tratamento pesticida dos solos ou dos substratos de plantas por fumigação, com efeito cumulativo, nematocida, fungicida, inseticida e bactericida, caracterizado por se aplicar no solo ou no substrato, numa dose compreendida entre 150 e 1000 kg/ha, pelo menos um composto de enxofre que é o dissulfureto de dimetilo.
2. Tratamento de acordo com a reivindicação 1, no qual o composto de enxofre é aplicado no estado puro ou sob a forma de uma emulsão aquosa, de uma microemulsão, de uma solução em água ou num solvente orgânico.
3. Tratamento de acordo com as reivindicações 1 ou 2, no qual o composto de enxofre não tem efeito fitotóxico.
4. Tratamento de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, associado a um tratamento simultâneo ou não com uma ou várias outras substâncias pesticidas.

Lisboa, 6 de Outubro de 2011