ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/259175751

Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas

Book · June 2008

CITATIONS
2

READS
49,881

1 author:

Anzalone Alvaro
Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, UCLA
43 PUBLICATIONS **321** CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:

PhD Thesis View project

All content following this page was uploaded by Anzalone Alvaro on 02 December 2016.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

HERBICIDAS

Modos y mecanismos de acción en plantas

Alvaro Anzalone

2007

Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado"
Decanato de Agronomía
Departamento de Fitotecnia

INDICE GENERAL

	Página
Introducción	vi
Capítulo I. Características generales de los herbicidas	
Introducción	2
1.- Conceptos básicos sobre herbicidas	2
1.1.- Nomenclatura de herbicidas	2
1.1.1.- Nombre técnico	2
1.1.2.- Nombre químico	2
1.1.3.- Nombres o denominaciones comerciales	2
1.2.- Formulación	2
1.2.1.- Tipos de formulaciones	2
1.3.- Concentración	2
1.4.- Dosificación	2
1.5.- Familia química	3
1.6.- Clasificación toxicológica	3
1.7.- Selectividad	3
1.8.- Epoca de aplicación	3
1.9.- Forma de aplicación	4
1.10.- Compatibilidad	4
2.- Características físico-químicas de los herbicidas	4
2.1.- Solubilidad	5
2.2.- Constante de disociación y pK	5
2.3.- Coeficiente de adsorción	6
2.4.- Coeficiente de reparto	7
2.4.1.- Coeficiente de reparto carbono orgánico-agua	7
2.4.2.- Coeficiente de reparto octanol-agua	7
2.5.- Indice de Gustafson	8
2.6.- Presión de vapor	9
2.7.- Fotosensibilidad	9
2.8.- Isomería óptica	10
Capítulo II. Absorción y translocación de herbicidas en las plantas	
Introducción	12
1.- Absorción de herbicidas por las plantas	12
1.1.- Absorción de herbicidas aplicados al suelo	12
1.1.1.- Conceptos básicos en las relación herbicida-suelo	12
a.- La adsorción-desadsorción de herbicidas en el suelo	12
b.- Persistencia de herbicidas en el suelo	14
1.1.2.- Estructuras con capacidad de absorción de herbicidas desde el suelo	15
a.- Absorción de herbicidas por las semillas	16
b.- Absorción de herbicidas por las raíces	16
c.- Absorción de herbicidas por los brotes subterráneos	18
1.1.3.- Factores que afectan la absorción de herbicidas aplicados al suelo	19
1.2.- Absorción de herbicidas aplicados a los órganos aéreos de las plantas	19
1.2.1.- Retención foliar de herbicidas	19
1.2.2.- Penetración de herbicidas a las estructuras aéreas de las plantas	21
a.- Penetración de la cutícula por herbicidas	21
b.- Penetración de la pared celular por herbicidas	23
c.- Penetración de la membrana plasmática por herbicidas	23
2.- Translocación de herbicidas en plantas	24
2.1.- Herbicidas con translocación preferencial por el xilema	25
2.2.- Herbicidas con translocación preferencial por el floema	26
2.3.- Herbicidas que se translocan por el xilema y el floema	28
2.4.- Herbicidas de translocación limitada	28

Capítulo III. Metabolismo de herbicidas en plantas
Introducción 31
1.- Detoxificación de herbicidas en plantas 31
1.1.- Reacciones de oxido-reducción en la detoxificación de herbicidas 32
1.1.1.- El citocromo P450 y el metabolismo de herbicidas 32
1.1.2.- El citocromo P450 y la selectividad de herbicidas 35
1.1.3.- El citocromo P450 y la resistencia de plantas a herbicidas 36
1.1.4.- Otros usos del citocromo P450 en la mejora de plantas 37
1.2.- Reacciones de hidrólisis en la detoxificación de herbicidas 37
1.3.- Reacciones de conjugación en la detoxificación de herbicidas 38
1.3.1.- Conjugación glucosídica 38
1.3.2.- Conjugación con polipéptidos 38
a.- Mecanismo de catálisis de las glutationa-*S*-transferasas 40
b.- La glutationa-*S*-transferasa y la selectividad de herbicidas 40
c.- La glutationa-*S*-transferasa y la resistencia a herbicidas 41
1.3.3.- Conjugación con aminoácidos 41
2.- La activación de proherbicidas en plantas 41

Capítulo IV. Mecanismos de acción de herbicidas
Introducción 43
1.- Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis 43
1.1.- Herbicidas inhibidores del fotosistema II 44
1.2.- Herbicidas secuestradores de electrones en el fotosistema I 47
2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos 48
2.1.- Herbicidas inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa 49
2.2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos sin inhibición de la acetil coA carboxilasa o inhibidores de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga 50
3.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos 52
3.1.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada 52
3.2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos 54
3.3.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de glutamina 55
3.4.- Otros inhibidores de la síntesis de aminoácidos 56
3.4.1.- Inhibidores de la síntesis de asparagina 56
3.4.2.- Inhibidores de la síntesis de metionina, histidina y arginina. 56
4.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de pigmentos fotosintéticos 56
4.1.- Herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno IX oxidasa 57
4.2.-Inhibidores de la síntesis de carotenoides 58
4.2.1.- Herbicidas inhibidores de la fitoeno desaturasa 59
4.2.2.- Herbicidas inhibidores de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa 59
4.2.3.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de carotenoides en lugar desconocido 59
5.- Herbicidas inhibidores de la división celular 60
5.1.- Herbicidas inhibidores de la mitosis 60
5.2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de la pared celular 61
6.- Herbicidas hormonales 62
6.1.- Herbicidas tipo auxina 62
6.2.- Herbicidas inhibidores del transporte de auxinas 63
7.- Otros mecanismos de acción 64
7.1.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de folato (inhibidores de la dihidropteroato sintetasa) 64
7.2.- Herbicidas inhibidores de la respiración (desacopladores) 64
7.3.- Herbicidas con mecanismo de acción desconocido 65
7.4.- Nuevos mecanismos de acción en desarrollo 65

Referencias bibliográficas 67

INDICE DE CUADROS

Capítulo I **Página**

Cuadro

I.1 Clasificación toxicológica de plaguicidas en Venezuela 3
I.2 Solubilidad en agua (*S*) de algunos herbicidas. 5
I.3 Clasificación de sustancias en relación a la capacidad de ionización 6
I.4 Clasificación de herbicidas de acuerdo a sus propiedades iónicas 6
I.5 Relación entre el log(K_{OW}) y la movilidad de un grupo de herbicidas 8
I.6 Valores de GUS según la susceptibilidad de los herbicidas a la lixiviación 8
I.7 Valores de solubilidad, K_{OC}, $T_{0.5}$ y nivel del riesgo de lixiviación para un grupo de herbicidas 8
I.8 Escala de volatilidad de los herbicidas 9
I.9 Presión de vapor para algunos herbicidas de uso común 9

Capítulo II

Cuadro

II.1 Capacidad de translocación de herbicidas dentro de las plantas de acuerdo a la vía de movilización 25
II.2 Movilidad relativa y vías de translocación primaria para diferentes herbicidas o sus grupos químicos 29

Capítulo III

Cuadro

III.1 Principales reacciones metabólicas de detoxificación de herbicidas en plantas y algunos de los grupos químicos afectados 32

Capítulo IV

Cuadro

IV.1 Herbicidas inhibidores del fotosistema II 46
IV.2 Herbicidas secuestradores de electrones a nivel del fotosistema I 48
IV.3 Herbicidas inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa 50
IV.4 Herbicidas inhibidores de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga 51
IV.5 Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada 53
IV.6 Herbicidas inhibidores de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa 55
IV.7 Herbicidas inhibidores de la glutamina sintetasa 56
IV.8 Herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno IX oxidasa 58
IV.9 Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de carotenos a nivel de la fitoeno desaturasa 59
IV.10 Herbicidas inhibidores de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa 59
IV.11 Herbicidas inhibidores de la síntesis de carotenoides en lugar desconocido 60
IV.12 Herbicidas inhibidores del ensamblaje de microtúbulos o de la polimerización de la tubulina 61
IV.13 Herbicidas inhibidores de la organización de microtúbulos 61
IV.14 Herbicidas inhibidores de la síntesis de celulosa 62
IV.15 Herbicidas tipo auxina 63
IV.16 Herbicidas inhibidores del transporte de auxinas 64
IV.17 Herbicidas inhibidores de la síntesis de folato 64
IV.18 Herbicidas inhibidores de la respiración 65
IV.19 Herbicidas con mecanismo de acción desconocido 65

INDICE DE FIGURAS

Página

Capítulo I

Figura

I.1 Clasificación de la época de aplicación de los herbicidas con respecto al cultivo 3
I.2 Formas de aplicación de los herbicidas 4
I.3 Moléculas de herbicidas pertenecientes a la familia química de las cloroacetamidas 4
I.4 Ejemplos de ionización de herbicidas ácidos y bases débiles 6
I.5 pK_a de la molécula de glifosato ácido 6
I.6 Distribución esquemática de plaguicidas entre la membrana plasmática y las fases acuosas externas e internas de acuerdo a la afinidad por los lípidos 8
I.7 Isómeros ópticos 10

Capítulo II

Figura

II.1 Representación de las micelas coloidales inorgánicas más comunes 12
II.2 Representación de una micela coloidal orgánica 12
II.3 Proceso de adsorción-desadsorción de herbicidas en el suelo 13
II.4 Partes de plántulas de mono y dicotiledóneas 16
II.5 Esquema general del proceso de absorción de herbicidas aplicados al suelo 16
II.6 Estructura de la raíz y vías de entrada de compuestos desde el suelo al xilema y floema 17
II.7 Esquema general del movimiento de herbicidas desde la solución del suelo hacia el xilema y el floema 17
II.8 Selectividad posicional lograda por la absorción diferencial de herbicidas por las estructuras subterráneas entre plantas mono y dicotiledóneas 18
II.9 Fases de la retención foliar de plaguicidas 20
II.10 Efecto del agente humectante (activador de superficie) sobre la forma en que se esparcen las gotas del caldo de aspersión sobre la superficie foliar 20
II.11 Conformación estructural de la cutícula foliar 21
II.12 Efecto la concentración de herbicida en el caldo de aspersión sobre la penetración foliar de herbicidas 22
II.13 Modelo simplificado del sistema de transporte de sustancias en las plantas 25
II.14 Relación del pKa y el log Kow con la vía preferencial de movilización de herbicidas en las plantas 25
II.15 Movimiento de agua y solutos desde la raíz a las hojas por transpiración 26
II.16 Modelo del movimiento de fotosintatos en plantas 26
II.17 Mecanismo de funcionamiento de la trampa iónica para herbicidas ácidos débiles 27
II.18 Transporte de herbicidas con alta afinidad por los lípidos en el apoplasto 27
II.19 Mapa de contorno para valores de Cf como función de pKa y $\log K_{ow}$ 28

Capítulo III

Figura

III.1 Fases en el proceso de detoxificación de compuestos xenobióticos por las plantas 31
III.2 Diferentes vías de detoxificación de simazina en maíz 32
III.3 Mecanismo de reacción para las citocromos P450 monoxigenasas 33
III.4 Esquema general del funcionamiento de las enzimas P450 reductasa y mono-oxigenasa 33
III.5 Diferentes formas de metabolización del prosulfuron por enzimas citocromo P450 34
III.6 Estructuras químicas de los herbicidas fluometuron, linuron, clortoluron y diuron y sus metabolitos detectados en ensayos utilizando microsomas con enzimas P450 (CYP71A10) de soya. 34
III.7 Conjugación del 2,4-D con glucosa 38
III.8 Metabolismo de los compuestos conjugados con glutationa 39
III.9 Función de los transportadores de metabolitos conjugados con glutationa en la detoxificación de herbicidas en células vegetales 39
III.10 Metabolismo del EPTC en diferentes plantas 40
III.11 Detoxificación de simazina por conjugación con glutationa en maíz, sorgo y caña de azúcar 40

Capítulo IV

Figura

IV.1 Resumen esquemático de la transferencia cooperativa de electrones entre los Fotosistemas I y II en la membrana tilacoidal 43
IV.2 Resumen esquematizado del proceso fotosintético en la membrana tilacoidal del cloroplasto 43
IV.3 Conformación estructural hipotética del fotosistema II 44
IV.4 Sitio de acción de los herbicidas inhibidores del fotosistema II en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis 44
IV.5 Proceso de inducción a la producción de formas de oxígeno activo y peroxidación de lípidos hecha por herbicidas inhibidores del fotosistema II 45
IV.6 Proceso de peroxidación de lípidos 45
IV.7 Conformación estructural hipotética del fotosistema I 47
IV.8 Proceso de formación y detoxificación de radicales libres por efecto del paraquat 47
IV.9 Esquema general de la síntesis de ácidos grasos en células vegetales 48
IV.10 Funcionamiento hipotético de la acetil coenzima A (Acetil CoA) carboxilasa 49
IV.11 Esquema general de la síntesis de aminoácidos 52
IV.12 Síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, valina e isoleucina) 52
IV.13 Metabolitos secundarios originados a partir de precursores en la ruta del shikimato 54
IV.14 Acción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSP) en la síntesis de los aminoácidos triptofano, tirosina y fenilalanina 54
IV.15 Proceso de síntesis de glutamina y glutamato 55
IV.16 Resumen esquemático del mecanismo de acción de los herbicidas inhibidores de la síntesis de glutamina 56
IV.17 Esquema general del mecanismo de acción de los herbicidas inhibidores de la síntesis de clorofila a nivel de la protoporfirinógeno IX oxidasa 57
IV.18 Esquema general del proceso de disipación de energía hecha por los carotenoides 58
IV.19 Esquema general de la síntesis de carotenoides 58
IV.20 Organización de los polipéptidos α y β-tubulina para la formación de microtúbulos 60
IV.21 Síntesis de celulosa por el complejo celulosa sintetasa asociado a la membrana plasmática 61
IV.22 Herbicidas inhibidores de la síntesis de celulosa ya diseñados y las empresas propietarias de las patentes 62
IV.23 Esquema hipotético del mecanismo de acción de los herbicidas tipo auxinas planteado por Grossmann (2003) 63
IV.24 Representación esquemática del proceso de respiración celular 65
IV.25 Mecanismos de acción de algunos compuestos bajo estudio 66

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento y la masificación de su uso hace unos 50 años los herbicidas han sido útiles y poderosas herramientas para el control de las malezas en los distintos sistemas agrícolas del mundo. La llamada "revolución verde", basada en la utilización de fertilizantes químicos y plaguicidas sintéticos, la mejora genética de los cultivos y un intenso uso del suelo, logró que la producción y la productividad agrícola aumentará de forma espectacular. Hoy se conoce que este modelo de producción agrícola es, para muchos de los casos donde su utiliza, insostenible, debido al inmenso impacto que produce en el ambiente. Es por ello que en la actualidad gran parte de la investigación agrícola que se realiza en el mundo se enfoca en la búsqueda de alternativas a estos sistemas.

A pesar de esta situación y los grandes cuestionamientos que se hacen sobre el uso de plaguicidas en la agricultura, los herbicidas siguen ocupando un importante lugar entre las diferentes opciones disponibles para el control de la flora arvense en los cultivos, y, al parecer, esta situación se mantendrá por largo tiempo mientras la investigación científica pueda generar opciones con viabilidad económica y práctica que respondan a la necesidad de combatir las malezas, la principal plaga de los cultivos. Si bien los métodos químicos no son la única forma conocida y evaluada para el control de malezas, es necesario comprender que la población mundial crece a un ritmo vertiginoso y la necesidad de producción de alimentos hace que se utilicen al máximo las herramientas de producción disponibles, en especial cuando su efectividad ha sido ampliamente demostrada, como es el caso de los herbicidas. Es por ello que hoy en día los herbicidas son los plaguicidas más utilizados en el mundo. De esta realidad se desprende la necesidad de ampliar al máximo el conocimiento de las características físico-químicas, el impacto ambiental y la forma como actúan los herbicidas, para así poder realizar un uso racional de esta herramienta.

Los procesos y fenómenos que suceden desde que un herbicida es aplicado al campo hasta que se manifiesta su acción sobre las malas hierbas son amplios y complejos. Desde la síntesis y el desarrollo de un herbicida hasta su uso comercial en la agricultura se deben estudiar una larga serie de aspectos, donde se incluyen desde la misma forma química de la molécula, hasta su comportamiento dentro de la planta e impacto sobre el ambiente en general, todo ello con la finalidad de ofrecer al agricultor herramientas de trabajo efectivas y seguras en la lucha contra las malezas.

En este texto se presenta de forma ordenada, simple y completa un resumen del modo de acción de los herbicidas. El capítulo I sirve como referencia para conocer algunos de los términos utilizados en el mundo de los herbicidas, así como las características generales de estos productos. En el capítulo II se detallan los aspectos de la absorción y la translocación de herbicidas en las plantas, haciendo énfasis en como estos procesos afectan la efectividad de los herbicidas en las aplicaciones en campo. El capítulo III aborda el tema del metabolismo de los herbicidas en las plantas, es decir, la serie de reacciones y transformaciones químicas que sufren los herbicidas dentro de las plantas y las consecuencias prácticas que esto conlleva. Por último, en el capítulo VI se presentan los mecanismos de acción de las diferentes familias químicas de herbicidas, cuyo conocimiento es importante para diseñar planes de uso de herbicidas, en especial para evitar la aparición de poblaciones de malezas resistentes a estos productos.

La finalidad de esta recopilación de conocimientos y consultas bibliográficas es ofrecer una guía teórica a estudiantes y técnicos de las áreas agrícolas de diferentes niveles en los temas relacionados con la fisiología y el metabolismo de los herbicidas. La sumatoria del conocimiento expuesto en este trabajo como fruto de diferentes revisiones de la literatura disponible y de la experiencia del autor, ayudará al lector a comprender muchos de los fenómenos que se suceden en relación al uso de los herbicidas, como la selectividad, daños que causan a las plantas, la movilidad, etc. El nivel en el que se abordan los temas permitirá una fácil lectura del contenido, pero sin dejar de lado la profundidad de los conocimientos que se discuten; además, se han utilizado una gran cantidad de figuras y cuadros que ayudarán a la comprensión de los temas expuestos.

CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HERBICIDAS

Introducción

Los herbicidas son compuestos complejos que tienen la capacidad de controlar las plantas indeseables o malezas en los cultivos. Estos plaguicidas como otros productos para la protección de los cultivos, deben ser utilizados de acuerdo al conocimiento de todas sus características y propiedades, para así obtener el máximo provecho de su acción, ya que por ser compuestos que producen un impacto ambiental, no se justifica su uso sin una rentabilidad acorde a dicho impacto, que en todo caso debe ser el más bajo posible. Es por ello que en este capítulo se presentan una serie de conceptos básicos y características propias de los herbicidas, los cuales permitirán crear una idea de los términos utilizados de forma cotidiana en el mundo del manejo de herbicidas, así como de los fenómenos que rigen el comportamiento de estos compuestos en las plantas y el ambiente.

1.- Conceptos básicos sobre herbicidas:

Una de las definiciones más comunes indica que un herbicida es un "químico que causa una disrupción en la fisiología o metabolismo de una planta por un tiempo suficientemente largo como para matarla o reducir su crecimiento". Si bien esta definición permite poseer una idea amplia de lo que son los herbicidas, es necesario conocer una serie de conceptos básicos asociados a estos compuestos para profundizar en el concimiento de los mismos.

1.1.- Nomenclatura de herbicidas:

Todo herbicida posee diferentes formas de denominación, las cuales se presentan a continuación:

1.1.1.- Nombre técnico:

Hace referencia al ingrediente activo (i.a.) contenido en el producto comercial. El nombre técnico es aquel aprobado por organizaciones de estandarización reconocidas, siendo la más aceptada la ISO (International Standardization Organisation). En las fases experimentales del desarrollo de un herbicida el nombre técnico puede ser el código de referencia que le asigne el fabricante. Su uso es importante para la comunicación de información de tipo técnica y científica.

1.1.2.- Nombre químico:

Se refiere al nombre de la molécula química del ingrediente activo del herbicida. Sigue las normas y regulaciones de la nomenclatura química para compuestos orgánicos dictadas por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

1.1.3.- Nombres o denominaciones comerciales:

En este caso se hace referencia al nombre que ha sido aprobado para su comercialización. Este nombre puede estar sujeto a algunas normas por la legislación de cada país. Un mismo ingrediente activo puede poseer diferentes nombres comerciales.

Como ejemplo de las diferentes formas en que puede denominarse un herbicida, podemos observar el siguiente caso:

Nombre técnico: setoxidim
Nombre químico: {2-(etoximino-butil)-5-{2-(etiltio)-propil}-3-hidroxi-2-ciclohexeno-1-ona}
Nombre comercial: NABU-S

1.2.- Formulación:

Es la forma en la que se presenta un herbicida para su preparación y uso práctico. Esta incluye el ingrediente activo y materiales inertes como solventes, diluyentes y adyuvantes que contribuyen a la acción del ingrediente activo. El tipo y las características de las formulaciones juegan un papel importante en la acción de los herbicidas y demás plaguicidas, por lo que su conocimiento y adecuada elección debe ser un punto de consideración a la hora de utilizar estos productos.

1.2.1.- Tipos de formulaciones:

En general hay dos tipos básicos de formulaciones de herbicidas: líquidas y sólidas. Las formulaciones gaseosas son de poco uso. Cada tipo de formulación suele ser expresada con un código o abreviatura (entre paréntesis en la clasificación que se presenta a continuación), que puede estar o no presente dentro de la denominación comercial del producto.

Entre las formulaciones sólidas de herbicidas más comunes tenemos:

- Polvo humectable (WP ó PM)
- Polvo seco (DP)
- Gránulo o Tableta dispersable en agua (DF ó WG)
- Gránulo (G ó GR)
- Gránulo o tableta soluble (SG)
- Polvo solubles(SP)

Por su parte, entre las formulaciones líquidas más comunes encontraremos:

- Concentado soluble (SL)
- Concentrado emulsionable (EC)
- Suspensión concentrada (SC)
- Suspensión encapsulada (CS)

1.3.- Concentración:

Se refiere a la cantidad de ingrediente activo (i.a.) o equivalente ácido que contiene el producto comercial formulado. Puede expresarse como:

- gramos de ingrediente activo (i.a.) por litro o kilogramo de producto comercial.
- % i.a. p/v: porcentaje de peso del i.a. por volumen de producto comercial.
- % i.a. p/p: porcentaje de peso del i.a. por peso de producto comercial.
- ppm: mg de i.a. por kilogramo o por litro de producto comercial.

1.4.- Dosificación:

Es la cantidad de producto que es recomendada aplicar por unidad de área. Puede expresarse como

cantidad del producto comercial o como cantidad del ingrediente activo por unidad de área, que generalmente es la hectárea. Como ejemplo podemos mencionar el siguiente caso: una dosis de 3 $l \cdot ha^{-1}$ del producto comercial Prowl 330E® (pendimetalina) se corresponde con una dosis de 990 gr de ingrediente $activo \cdot ha^{-1}$, ya que este producto comercial se formula a una concentración de 330 gr de $i.a. \cdot l^{-1}$.

1.5.- Familia química:

Los herbicidas se han agrupado dentro de diferentes familias químicas, las cuales poseen características químicas y moleculares comunes. Es importante destacar que dentro de una misma familia química pueden existir herbicidas con características de uso práctico muy divergentes, por lo que, y en especial en esos casos en particular, es necesario conocer el comportamiento de cada ingrediente activo en particular. A continuación se presenta una lista de los principales grupos de familias químicas de herbicidas:

Acetamidas
Acidos arilaminopropiónicos
Acidos bencenodicarboxílicos
Acidos clorocarbónicos
Acidos fenoxicarboxílicos
Acidos fosfínicos
Acidos piridincarboxílicos
Acidos quinolincarboxílicos
Amidas
Ariloxifenoxipropianatos
Benzamidas
Benzothiadiazinonas
Bipiridilios
Carbamatos
Ciclohexanodionas
Cloroacetamidas
Difeniléteres
Dinitroanilinas
Dinitrofenoles
Fenilpyrazoles
Fenil-pyridazinas
Fenyl-carbamatos
Fosforoamidas
Fosforodithioatos
Glicinas
Imidazolinonas
Isoxasoles
Isoxazolidinonas
N-fenilphthalimidas
Nitrilos
Organoarseniacales
Oxadiazoles
Oxazolidinedionas
Oxyacetamidas
Phthalamatos
Piridinas
Pyrazoles
Pyridazinonas
Pyridinecarboxamidas
Pyrimidindionas
Pyrimidinyl(thio)benzoatos
Sulfonilureas
Tetrazolinonas
Thiocarbamatos
Tiadiazoles
Triazinas
Triazinonas
Triazoles
Triazolinonas
Triazolocarboxamidas
Triazolopyrimidinas
Triketonas
Ureas

1.6.- Clasificación toxicológica:

Los herbicidas son compuestos que poseen diferente grado de toxicidad hacia el humano y otras especies animales, así como sobre el ambiente. Es por ello que se han propuesto diferentes formas de clasificación toxicológica, pero la más común e importante es la referida al efecto tóxico sobre mamíferos, no sobre el ambiente.

La clasificación toxicológica se define a través de la dosis letal media (DL_{50}). La DL_{50} es la dosis de un compuesto ingerida, inhalada o absorbida a través de la piel que es letal para el 50 % de los animales de experimentación de una población uniforme. Esto indica que a menor DL_{50} mayor riesgo de toxicidad. La legislación venezolana exige al fabricante que la categoría toxicológica se exprese en el envase del producto, tanto de forma escrita como a través de una franja de color particular para cada categoría.

Los diferentes niveles de toxicidad de un herbicida o de un plaguicida en general, exigen la adopción de una serie de medidas de protección y seguridad al momento de su manipulación y aplicación, las cuales están referidas en la legislación sobre el respecto y se expresa de forma clara en los envases que contiene estos compuestos.

Cuadro I.1. Clasificación toxicológica de plaguicidas.

Clasificación	DL_{50} ($mg \cdot kg^{-1}$ de peso vivo)	Color de la Franja
Extremadamente Tóxico	1 – 100	ROJA
Altamente Tóxico	101 – 250	AMARILLA
Moderadamente Tóxico	251 – 1400	AZUL
Ligeramente Tóxico	>1400	VERDE

1.7.- Selectividad:

Se refiere a la capacidad que poseen algunos herbicidas de causar perturbaciones fisiológicas o metabólicas que conllevan a la muerte a ciertas especies vegetales y a otras no. Generalmente se clasifican en selectivos y no selectivos; en ese caso, la selectividad se refiere a la capacidad de no causar daño a ciertas especies. Por ejemplo, cuando afirmamos que un herbicida es selectivo al maíz, se quiere decir que no le causa daño a ese cultivo, mientras que si lo hace sobre otras especies.

La selectividad de un herbicida depende de muchos factores, ya sean físicos, químicos, fisiológicos o metabólicos, por lo que puede ser un proceso complejo y específico para un herbicida o grupo de ellos. Algunos de los aspectos de la selectividad de herbicidas se detallarán en los capítulos II, III y IV.

1.8.- Epoca de aplicación:

Los herbicidas sólo son efectivos cuando se aplican en el momento apropiado. Este momento puede estar referido al estado de crecimiento de las malezas o al estado fenológico o etapa en la cual se encuentre el cultivo.

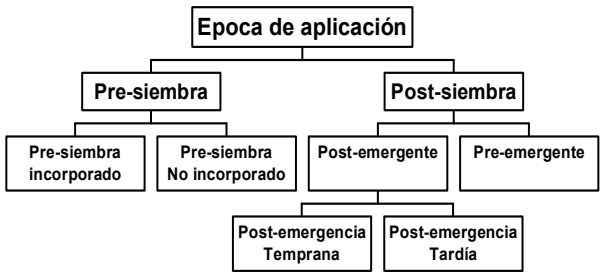

Figura I.1. Clasificación de la época de aplicación de los herbicidas con respecto al cultivo.

En presiembra incorporado el herbicida es aplicado sobre el suelo y luego es incorporado a través del laboreo del mismo, mientras que en el caso de la presiembra no incorporado el herbicida permanece sobre la superficie del suelo. En el caso de las aplicaciones pre-emergentes, el cultivo no ha emergido del suelo, pero puede haber presencia o no de plántulas de malas hierbas, mientras que en la mayoría de los casos de las aplicaciones post-emergentes tanto el cultivo como las plantas de malas hierbas se encuentran emergidas del suelo.

1.9.- Forma de aplicación:

De acuerdo a la forma como se aplican los herbicidas en el campo podemos conseguir herbicidas que se aplican al follaje o al suelo; también es posible conseguir herbicidas que se aplican sobre la lámina de agua o disueltos en el agua de riego (herbigación).

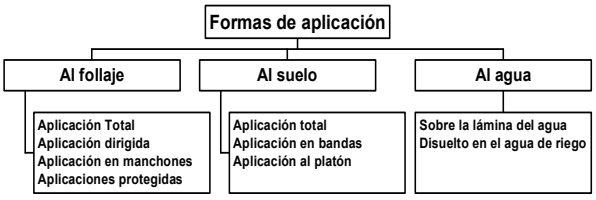

Figura I.2. Formas de aplicación de los herbicidas.

Una aplicación total se refiere al tipo de aplicación donde se impregna del herbicida el total del área que se desea tratar, lo que puede incluir tanto a las plantas del cultivo como a las malezas, mientras que una aplicación dirigida intenta colocar el herbicida en ciertas zonas (las bandas entre las hileras del cultivo o bajo los árboles o "platón") o plantas en particular del campo. Por su parte, la aplicación en "manchones o rodales" es un tipo de aplicación total, pero en pequeñas zonas del área disponible donde se encuentran las malezas que se desean controlar. Por último las aplicaciones protegidas se refieren a aquellas donde se utiliza un implemento (generalmente llamado "campana") que evita que el producto aplicado se deposite sobre el cultivo.

1.10.- Compatibilidad:

Es la propiedad de los herbicidas de poder ser mezclados o no con otros compuestos al momento de su aplicación, sin perder su efecto herbicida o su selectividad. Generalmente la etiqueta del producto comercial indica la compatibilidad del herbicida con otros productos como insecticidas, abonos foliares u otros herbicidas, así como las restricciones respectivas.

Esta es una propiedad importante para la optimización de los costos y recursos relacionados con la aplicación de productos fitosanitarios, ya que permite poder suplir al cultivo de dos o más productos en una labor única. Sin embargo, se deben conocer con exactitud los productos que pueden ser mezclados, así como la época y forma de aplicación de dichas mezclas.

2.- Características físico-químicas de los herbicidas:

La identidad y características físico-químicas de un compuesto químico son consecuencia de su estructura; esta estructura depende de la naturaleza y tipo de átomos o grupos funcionales que la conforman y del arreglo espacial de estos (Anderson, 1983).

Los herbicidas modernos son moléculas orgánicas conformadas básicamente por carbono, hidrógeno y oxígeno; también, dependiendo del herbicida, se encontrarán átomos de cloro, flúor, nitrógeno, fósforo, etc. de cuyas combinaciones y ubicación espacial dentro de la molécula depende el comportamiento del compuesto en el ambiente y la planta. Muchos herbicidas poseen un átomo halógeno dentro de su estructura o moléculas de alcoholes (R-OH), ácidos orgánicos (R-COOH) y/o ésteres (R-O-R); la presencia de cualquier sustituyente en la molécula herbicida tendrá una influencia en las propiedades químicas y estructurales del herbicida, como la solubilidad, la carga eléctrica y la volatilidad (Rao, 2002). Esta realidad debe ser considerada en el momento del estudio de los herbicidas, ya que, como se detallará posteriormente, el comportamiento de un herbicida dentro de la planta o en el ambiente esta relacionado de alguna forma con las características y propiedades estructurales de su molécula.

Aquellos herbicidas que poseen similitud en la estructura química se agrupan en familias químicas, pero esta clasificación no siempre guarda relación con el comportamiento del herbicida en las plantas y el ambiente, ya que es común encontrar casos donde moléculas herbicidas de una misma familia poseen propiedades toxicológicas, de translocabilidad y de selectividad totalmente diferentes. Por ejemplo, las formas éster de los herbicidas fenóxidos (2,4-D, MCPP, etc.) son usualmente mucho más activas que las formas aminas (Cudney, 1996), a pesar de que las diferencias en la estructura de las moléculas son mínimas. Otro ejemplo se puede observar en la Figura I.3, donde se muestran las moléculas de alacloro y metolacloro, dos herbicidas pertenecientes a la familia de las cloroacetamidas. Nótese que estructuralmente estas moléculas difieren en pocos puntos; sin embargo ambas poseen características de uso y comportamiento marcadamente diferente.

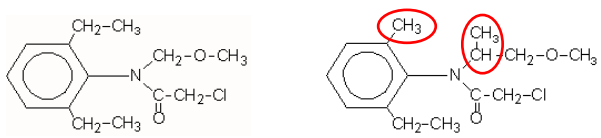

Figura I.3. Moléculas de herbicidas pertenecientes a la familia química de las cloroacetamidas. Se han resaltado las diferencias estructurales en las moléculas.

A continuación se ahondará en un conjunto de características físico-químicas de importancia propias de los herbicidas que definen el comportamiento de los

mismos en el ambiente y las plantas, en especial aquellos que afectan los procesos de absorción y translocación de estos compuestos en los vegetales.

2.1.- Solubilidad:

La solubilidad representa la cantidad máxima de una sustancia que puede disolverse en una unidad de volumen de un solvente a una temperatura determinada. La unidad común para este parámetro es partes por millón (ppm) equivalente a $mg \cdot l^{-1}$ ó $\mu l \cdot l^{-1}$. Este parámetro representa un importante factor que define en gran medida la movilidad de un compuesto, tanto dentro de las plantas como en el ambiente.

La solubilidad en agua (*S*) esta fuertemente influenciada por algunos factores, en especial el pH, la capacidad de disociación de la molécula y la temperatura. En la mayoría de los casos la solubilidad de una molécula es directamente proporcional a la temperatura, pero en el caso particular de la mayoría de los herbicidas, en el rango de temperatura entre 10 y 30 ^{O}C existen pocas variaciones en la solubilidad (Otto *et al.*, 2001). Esto no sucede así en cuanto a las variaciones del pH, ya que este factor si posee una considerable influencia sobre la solubilidad en agua de algunos herbicidas, en especial aquellos que son ácidos débiles (como las sulfonilureas o los herbicidas hormonales).

Por último, otro factor que tiene influencia sobre la solubilidad de los herbicidas es la forma química en que se presenta la molécula. Un ejemplo lo podemos observar en el 2,4-D, cuya forma ácida tiene una solubilidad de 519 $mg \cdot l^{-1}$, mientras la sal sódica de 1800 $mg \cdot l^{-1}$ y la forma dimetilamonio 3000000 $mg \cdot l^{-1}$. Otro caso es el glifosato, donde la variación en la solubilidad depende de su forma química (Cuadro I.2).

La solubilidad de una molécula herbicida juega un papel importante dentro del comportamiento de dicho producto en el ambiente (el suelo o el agua) y dentro de la planta. Las variaciones en la solubilidad de un herbicida de acuerdo al valor de pH del medio en que se disuelva pueden ser comprendidas al conocer los conceptos de constante de disociación y pK de una molécula.

Cuadro I.2. Solubilidad en agua (*S*) de algunos herbicidas. Tomado de Zimdahl (1999). Adaptado por Anzalone.

Herbicida	**Solubilidad en agua (ppm a 25 ^{O}C y pH=7)**
Glifosato ácido	15700 $mg \cdot l^{-1}$
Glifosato sal isopropilamina	900000 $mg \cdot l^{-1}$
Glifosato trimesio	4300000 $mg \cdot l^{-1}$
Paraquat	620000 $mg \cdot l^{-1}$
Metribuzina	1100 $mg \cdot l^{-1}$
Atrazina	33 ppm
Metsulfuron-metil	270 ppm (a pH 4,6) 1750 ppm (a pH 5,4) 9500 ppm (a pH 6,7)

2.2.- Constante de disociación y pK:

La constante de disociación es una característica que posee una alta influencia sobre la acción fisiológica (penetración y translocación) y el comportamiento ambiental de cada herbicida.

Este valor cuantifica la posibilidad que tiene una molécula de presentarse en forma molecular o iónica en un medio con un pH determinado, además de brindarnos una clara idea del grado de acidez o basicidad de la molécula. La constante de disociación de un herbicida tiene influencia sobre el grado de absorción del compuesto a los coloides del suelo, la degradabilidad, la solubilidad en agua, la penetración y la translocabilidad.

Los herbicidas ionizables pueden dividirse en tres grandes grupos: (1) moléculas completamente disociadas como cationes o bases fuertes (como ejemplo el paraquat); (2) moléculas que se comportan como bases débiles y (3) las que se comportan como ácidos débiles.

Si *AH* es un ácido débil y *B* es una base débil, el equilibrio de disociación se establece como sigue:

$$AH + H_2O \Leftrightarrow A^- + H_3O^+$$

$$B + H_2O \Leftrightarrow BH^+ + OH^-$$

de allí se establece que la constante de disociación ácida (*Ka*) o básica (*Kb*) será una relación entre las formas químicas del equilibrio tal que:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[AH]}$$

$$K_B = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]}$$

Debido a que la capacidad de ionización de un compuesto depende del pH del medio en que se encuentre, normalmente se utiliza como parámetro de estudio de la capacidad de ionización de los herbicidas el pK, definido como el logaritmo decimal del inverso de la constante de ionización, que en cada caso será:

$$pK_a = -\log_{10} K_a$$

$$pK_b = -\log_{10} K_b$$

Considerando que el producto iónico del agua (*Kw*) es:

$$K_W = (K_a)(K_b) = 10^{-14}$$

entonces,

$$pK_a + pK_b = 14$$

de aquí que podamos definir la acidez relativa de cualquier compuesto utilizando como base de referencia el agua, estableciendo además algunas reglas generales como "a mayor valor de pK_a, más débil es el ácido (y más fuerte la base)" (Otto *et al.*, 2001).

A su vez, la ecuación de Henderson-Hasselbach permite calcular la relación entre las formas ionizadas y no ionizadas de una molécula con respecto al pH del medio:

para un ácido: $pH = pK_a + \log[A^-]/[AH]$

para una base: $pH = pK_a + \log[B]/[BH^+]$

Así, cuando el pH del medio circundante a la molécula (suelo, solución acuosa del interior de la planta, epidermis foliar, etc.) iguala el pK_a de la molécula, el 50% de las moléculas se encuentran en forma ionizada y 50% en forma neutra *([A-]=[AH];* por lo que *log[A-]/[AH] = 0*).

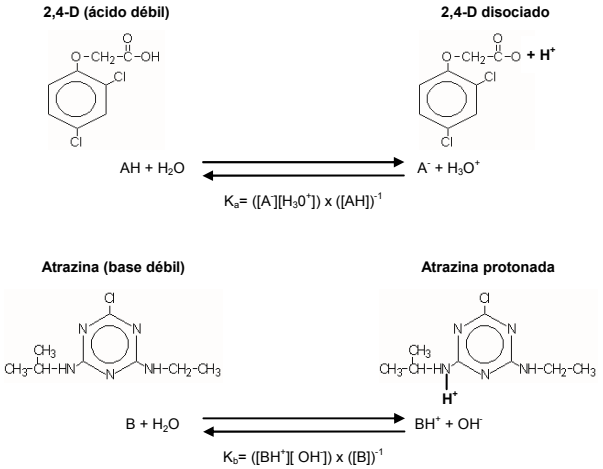

Figura I.4. Ejemplos de ionización de herbicidas ácidos y bases débiles. Tomado de Otto *et al.* (2001).

Una molécula herbicida puede poseer más de un pK_a, ya que la capacidad de ionización de los grupos de átomos que la conforman puede variar, confiriéndole diferente capacidad de ionización en diferentes puntos de su estructura molecular.

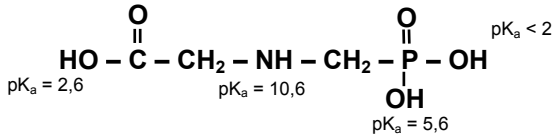

Figura I.5. pK_a de la molécula de glifosato ácido. Basado en Sprankle *et al.* (1975). Adaptado por Anzalone.

En los cuadros I.3 y I.4 se presentan diferentes formas de clasificación de herbicidas de acuerdo a su pK_a y sus propiedades iónicas.

Cuadro I.3. Clasificación de sustancias en relación a la capacidad de ionización. Tomado de Otto *et al.* (2001). Adaptado por Anzalone.

Sustancia	Capacidad de inonización	pK_a
Acido	muy fuerte	<1
	fuerte	1-3
	moderado	3-5
	débil	5-7
	muy débil	7-9
	extremadamente débil	>9
Base	extremadamente débil	<1
	muy débil	1-3
	débil	3-5
	moderada	5-7
	fuerte	7-9
	muy fuerte	>9

Cuadro I.4. Clasificación de herbicidas de acuerdo a sus propiedades iónicas. Tomado de Monaco *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

Acidos débiles	Catiónicos	Bases débiles	No iónicos
Alifáticos	Bipiridilios	Piridinonas	Amidas
Amino		Tiadiazoles	Anilidas
Organoarseniacales		Triazinas	Carbamotiatos
Fenilacéticos		Triazoles	Ciclohexanodionas
Benzoicos			Difeniléteres
Benzonitrilos			Dinitroanilinas
Fenoxipropianatos			Fenilcarbamatos
Fenóxidos			Isoxasoles
Fenólicos			N-fenilheterocíclicos
Ftalámicos			Piridazinonas
Imidazolinonas			Piridinas
Pirimidiniloxibenzoatos			Ureas
Sulfonilureas			
Triazolpirimidinas			
Uracilos			

2.3.- Coeficiente de adsorción:

El coeficiente de adsorción de un herbicida es una medida de su capacidad de adherirse a micelas coloidales. Este parámetro puede definirse a través de la siguiente expresión:

$$K_d = \frac{C_{ad}}{C_L}$$

donde K_d es el coeficiente de adsorción, C_{ad} representa la concentración del herbicida en la fase adsorbente y C_L representa la concentración del herbicida en la fase acuosa luego que se ha alcanzado el equilibrio. Así, mientras más alto sea el valor de K_d más fuertemente será adsorbido el herbicida por la fase adsorbente.

Cuando un herbicida se disuelve en el agua del suelo puede ser adsorbido por las partículas del suelo que funcionan como superficies de adsorción, ya sea la fracción mineral o la fracción orgánica del suelo con capacidad de intercambio catiónico, debido a que éstas partículas interactúan físico-eléctricamente con las moléculas disueltas en el agua del suelo. Esto supone que se establezca una relación de adsorción-desadsorción entre las moléculas herbicidas y los componentes coloidales del suelo y por ello tanto las micelas coloidales presentes en el suelo, el pH y el contenido de agua tendrán una influencia directa sobre la adsorción de los herbicidas en el suelo (NAS, 1978).

En la mayoría de los herbicidas la adsorción y la solubilidad están inversamente relacionadas; en consecuencia, a medida que la solubilidad se incrementa la cantidad de herbicida adsorbido disminuye. Hay pocas excepciones, como los bipiridilios y el glifosato que, por su condición de cationes, se adsorben a las micelas coloidales de forma irreversible a pesar de ser altamente solubles (Puricelli, 2004).

Los valores de K_d se obtienen a través de la determinación de las isotermas de absorción, una curva que indica la forma de adsorción de un plaguicida a un suelo en particular desde un medio líquido a una temperatura dada. La relación de adsorción no sigue

una función lineal (existe saturación de los puntos de interacción con las micelas) y es dependiente del pH del medio y la temperatura. Esta condición limita el uso del coeficiente de adsorción de los herbicidas, ya que pueden existir grandes diferencias en este valor dependiendo del tipo de suelo y la temperatura. Sin embargo, este coeficiente nos puede ayudar a entender de forma general los procesos de adsorción-desadsorción de los herbicidas sobre las micelas coloidales del suelo. Posteriormente en este capítulo se profundizará en este último tema en particular.

Debido a la importancia que posee la fracción orgánica del suelo en las relaciones de adsorción-desadsorción de los herbicidas en el suelo, y en los casos particulares de herbicidas que se adhieren fácilmente a la fracción orgánica del suelo (herbicidas no iónicos) o suelos ricos en materia orgánica, se debe utilizar una forma normalizada de K_d, la cual se denomina K_{OC} (coeficiente de reparto carbono orgánico-agua), que se explica a continuación.

2.4.- Coeficiente de reparto:

El coeficiente de reparto cuantifica la distribución de un compuesto químico entre dos fases separables que están en equilibrio. En el caso de los plaguicidas en general y los herbicidas en particular, son dos los coeficientes de reparto que se utilizan frecuentemente para el estudio del comportamiento de estos compuestos en el ambiente y la planta: (a) el coeficiente de reparto carbono orgánico-agua (K_{OC}), utilizado para estudiar la relación herbicida-suelo y (b) el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{OW}), muy utilizado para estudiar las relaciones herbicidas-plantas.

2.4.1.- Coeficiente de reparto carbono orgánico-agua:

El coeficiente de reparto carbono orgánico-agua (K_{OC}) mide la distribución de un compuesto entre dos fases, en este caso entre una fase sólida (carbono orgánico) y una fase líquida (agua), que representan medios abundantes en el sistema suelo. Así, el K_{OC} nos puede brindar una idea de la capacidad que posee un plaguicida de adherirse a las micelas coloidales orgánicas del suelo. Este parámetro es importante para comprender el comportamiento de los herbicidas en suelos con relativo alto contenido de materia orgánica o, como ya se comentó, en caso de moléculas no iónicas.

Es necesario aclarar que el proceso de determinación del K_{OC} es complejo y posee muchas consideraciones teórico-prácticas que no es objetivo de este texto explicar. Además, hay que destacar que la aplicabilidad práctica del conocimiento de este parámetro dependerá principalmente de la relación de carbono orgánico presente en el medio en que se encuentre el herbicida (generalmente el suelo), así como la cantidad de agua presente, el pH y la temperatura del mismo.

Ya que no se dispone de valores de K_{OC} para todos los herbicidas, se ha determinado una relación entre el K_{OC} y el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{OW}) que ha quedado descrita por varias ecuaciones, entre las que se encuentra una de las más usadas, la de Karickhoff (Otto *et al.*, 2001):

$$\log K_{OC} = \log K_{OW} - 0{,}21$$

Esta relación permite estimar el K_{OC} a partir del K_{OW}, lo cual es de gran ayuda ya que los valores de K_{OC} no se han determinado para muchos compuestos de uso como fitosanitarios debido a las dificultades para su determinación.

2.4.2.- Coeficiente de reparto octanol-agua:

Una de las principales características físico-químicas que define el comportamiento de los herbicidas dentro de las plantas es el grado de afinidad que éste posea con los compuestos lipídicos (liposolubilidad), ya que para poder atravesar la membrana plasmática con facilidad, los compuestos deben poseer afinidad con los compuestos lipídicos que conforman dicha membrana. De allí que para comprender el comportamiento y destino de un herbicida en las plantas, es necesario conocer la capacidad de distribución que posee dicho herbicida entre una fase lipídica (que representa la membrana) y una fase acuosa (que representa el entorno de la célula o el citoplasma).

Por norma se emplea el sistema octanol-agua ya que ha demostrado ser un sistema bastante conveniente para estudiar al sistema membrana celular-medio acuoso circundante (Kleier *et al.*, 1998). El coeficiente de reparto octanol-agua (K_{OW}) no es más que la relación entre la concentración de un plaguicida (*X*) en octanol y la concentración del mismo en agua en un sistema octanol-agua luego que las fases han alcanzado un equilibrio:

$$K_{OW} = \frac{[X]_{octa}}{[X]_{agua}}$$

De acuerdo a esta expresión, a mayor valor de K_{OW} mayor será la afinidad del compuesto por los lípidos. Este valor varía en gran orden para diferentes plaguicidas, por lo que normalmente se expresa como el logaritmo en base 10 de K_{OW} (denominado como $\log(K_{ow})$ ó P), cuyos valores oscilan entre –3 y 8. Para los plaguicidas que se comporten como ácido o bases débiles, el K_{OW} depende del pH del medio en que se encuentre el sistema, debido al proceso de ionización que sufre la molécula; la formas neutras son significativamente más lipofílicas que la formas iónicas (Otto *et al.*, 2001).

El coeficiente de reparto influye de forma importante sobre la capacidad de movilización de los herbicidas en las plantas, en especial por vía apoplástica. Compuestos con valores muy altos de *P* tienden a ser poco móviles por el apoplasto, debido a su alta afinidad con la membrana celular. Los plaguicidas con valores intermedios de K_{OW} son los que se mueven con facilidad por el apoplasto, debido a la capacidad de penetración de la membrana y su distribución en los medios acuosos circundantes a ésta (Kleier *et al.*, 1998).

En el Cuadro I.5 se presentan ejemplos de grupos químicos de herbicidas clasificados de acuerdo a la relación entre su movilidad y el Kow.

Cuadro I.5. Relación entre el log(K_{OW}) y la movilidad de un grupo de herbicidas.

Movilidad	log(Kow)		
	-3 a 0 Hidrofílico	0 a 3 Intermedio	3 a >6 Lipofílico
No sistémicos			Trifluralina Diflufenican
Apoplásticos		Triazinas Ureas	
Ambimóviles o simplásticos	Glifosato Aminotriazol	Auxínicos Sulfonilureas Imidazolinonas Setoxidim	

En la Figura I.6 es posible observar la forma teórica en que se distribuye un plaguicida entre las fases acuosas externas e internas a la membrana celular de acuerdo al grado de afinidad a los lípidos que posea.

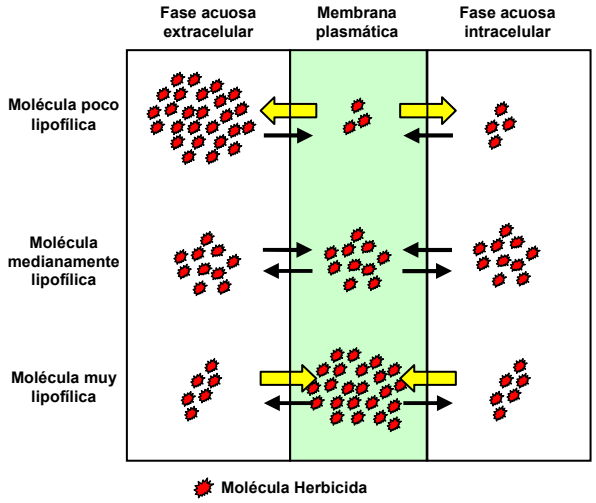

Figura I.6. Distribución esquemática de plaguicidas entre la membrana plasmática y las fases acuosas externas e internas de acuerdo a la afinidad por los lípidos. Tomado de Otto *et al.* (2001). Adaptado por Anzalone.

Otra forma en que el Kow de la molécila influye en el comportamiento de los herbicidas en las plantas ocurre durante el proceso de absorción del herbicida, en especial en la absorción foliar. Las hojas de las plantas están recubiertas por la cutícula, una capa de naturaleza lipofílica, impermeable y cerosa que le protege del ambiente; aquellos herbicidas que son lipofílicos tenderán a penetrar con mayor facilidad la cutícula, mientras los más hidrofílicos la penetrarán con mayor dificultad.

El valor de Kow también es utilizado como referencia para el estudio de riesgo ambiental de los plaguicidas, ya que nos brinda una idea de la facilidad con la que un herbicida puede ser absorbido por la piel de mamíferos o ser acumulado en grasas animales; además este parámetro esta relacionado con el coeficiente de partición carbono orgánico-agua (Koc).

2.5.- Indice de Gustafson:

El índice de Gustafson o índice de riesgo de lixiviación a aguas profundas (Groundwater Ubiquity Score – GUS) relaciona al Koc con la vida media de un herbicida en el suelo. La vida media de un herbicida ($T_{0,5}$) se define como el tiempo requerido para que la concentración del herbicida en el suelo disminuya a un valor equivalente a la mitad de la concentración inicial (Anzalone, 2000), que es una de las formas de valorar la persistencia de un herbicida en el suelo. La persistencia de un herbicida en el suelo es la cantidad de tiempo que el herbicida permanece activo en el mismo; también es denominada vida residual del herbicida en el suelo (Anderson, 1983). El GUS queda definido a través de la siguiente ecuación:

$$GUS = (\log T_{0,5}) \times (4 - \log K_{OC})$$

Este índice proporciona una idea de la capacidad que posee un herbicida de moverse en el perfil de un suelo por la acción del agua (lixiviarse), ya que tanto el Koc como el $T_{0,5}$ son los parámetros que poseen mayor importancia en la definición de la capacidad de lixiviación de un herbicida, incluso hasta las aguas profundas del suelo.

Cuadro I.6. Valores de GUS según la susceptibilidad de los herbicidas a la lixiviación. Tomado de Puricelli (2004).

GUS	Comportamiento
> 2,8	Lixiviable
2,8 – 1,8	Intermedio
< 1,8	No lixiviable

Cuadro I.7. Valores de solubilidad, K_{OC}, $T_{0,5}$ y nivel del riesgo de lixiviación para un grupo de herbicidas. Tomado de Monaco *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

Herbicida	*S* (ppm)	Koc	$T_{0,5}$ (días)	Riesgo de Lixiviación
Alacloro	240	170	15	Medio
Atrazina	33	100	60	Alto
Butilato	44	400	13	Bajo
Clomazona	1100	300	24	Medio
Clorimuron	1200	110	40	Alto
Clorsulfuron	7000	40	160	Alto
Dicamba	400000	2	14	Alto
Imazaquin	160000	20	60	Alto
Imazetapir	200000	10	90	Alto
Linuron	75	400	60	Medio
Metolacloro	530	200	90	Alto
Metribuzina	1220	60	40	Alto
Metsulfuron	9500	35	120	Alto
Pendimetalina	<1	5000	90	Bajo
Picloram	200000	16	90	Alto
Terbacil	710	55	120	Alto

Tal como se observa en el Cuadro I.7, el potencial de lixiviación también depende de otros factores como la solubilidad del herbicida, cantidad y frecuencia de lluvias, la adsorción del compuesto a las micelas colidales del suelo y la estructura y textura del suelo. Por ejemplo, la atrazina es un herbicida con baja solubilidad y mediana capacidad de adsorción a las micelas del suelo, lo que indicaría un bajo potencial de lixiviación. Sin embargo, este herbicida posee una alta vida media en el suelo ($T_{0,5}$), por lo cual el potencial de lixiviación de este compuesto es considerado alto (Puricelli, 2004).

2.6.- Presión de vapor:

La presión o tensión de vapor de un herbicida es la presión del vapor de dicho compuesto cuando está en equilibrio con su fase sólida o líquida. Es una medida de la fuerza que poseen las moléculas de vencer la fuerza de cohesión intermolecular y poder pasar a la fase gaseosa. Así, mientras mayor sea la presión de vapor de un compuesto, mayor será la tendencia del mismo a volatilizarse, esto es, a pasar a su forma gaseosa. Los herbicidas, que en la mayoría de los casos se aplican de forma líquida (ya sea en forma de solución, suspensión o emulsión), pueden volatilizarse desde una fase líquida.

Tanto la presión de vapor como la solubilidad son claves en la definición del potencial de volatilización de un herbicida desde un medio líquido y ellas se expresan de manera conjunta en la constante de la ley de Henry (K_H). Esta constante es similar al coeficiente de adsorción utilizado para describir la magnitud de la adsorción que un herbicida puede alcanzar sobre un medio adsorbente, pero en este caso el valor describe la distribución del compuesto entre el aire y el agua. Así, tenemos que:

$$K_H = \frac{C_V}{C_L}$$

donde C_V es la concentración del compuesto en el vapor de la interfase agua:vapor y C_L es la concentración del compuesto en el líquido de la interfase agua:vapor. El valor de K_H es altamente dependiente de la temperatura, de manera que a una presión dada la volatilización de un líquido o un sólido aumentará en la medida que aumente la temperatura (Monaco et al, 2002).

La volatilización también es un factor con gran influencia en la capacidad de un herbicida de penetrar la hoja de la planta, ya que define en parte la retención del herbicida en la hoja (Rao, 2002). Mientras mayor sea la volatilización de un herbicida menor será la retención del mismo sobre la hoja, lo que limitará la capacidad del compuesto de penetrarla. De similar forma, un herbicida que se volatilice con facilidad tenderá a permanecer menor tiempo en el suelo, ya que pasará desde la fase acuosa del suelo (solución del suelo) hacia la fase gaseosa del suelo o directamente hacia la atmósfera, limitando así su persistencia. En ambos casos el proceso se verá favorecido con la ocurrencia de altas temperaturas (Zimdahl, 1999).

Cuadro I.8. Escala de volatilidad de los herbicidas. Tomado de Puricelli (2004).

Volatilidad	Presión de vapor (mm Hg x 10^{-6})
Muy Baja	< 1
Baja	1 - 10
Moderada	10 - 10^2
Alta	10^2 - 10^3
Muy Alta	> 10^3

El conocimiento de la capacidad de volatilización de los herbicidas es importante, ya que de ella depende la posibilidad de los mismos de disiparse o moverse en el aire. Desde el punto de vista agronómico, los productos muy volátiles deben ser manejados tomando todas las precauciones pertienentes, ya que pueden movilizarse rápidamente al aire con probabilidades de producir efectos tóxicos en humanos, animales y aves o daños en cultivos sensibles cercanos al área de aplicación.

Cuadro I.9. Presión de vapor para algunos herbicidas de uso común. Tomado de Ross y Lembi (1999). Adaptado por Anzalone.

Presión de Vapor	Herbicidas
Alta presión de Vapor	Tiocarbamatos, clomazone, trifluralin, ésteres de ácidos fenóxidos.
Media presión de Vapor	Alacloro, benefin, butacloro, dicamba, linuron, bromoxinil, oxyfluorfen, napropamide.
Baja presión de Vapor	Acetocloro, atrazina, amitrol, bentazona, diclofop, paraquat, glifosato, imazapir, fluazifop.

2.7.- Fotosensibilidad:

Existen herbicidas que pueden sufrir cambios moleculares como consecuencia de su exposición a la energía lumínica, en especial por efecto de rayos UV (ultravioletas). Cuando los herbicidas fotosensibles se exponen a la luz pueden perder su capacidad herbicida o su capacidad de acción selectiva, por lo que es necesario tener especial cuidado con las condiciones de almacenamiento y aplicación en campo de los mismos; de igual forma algunos herbicidas requieren ser incorporados al suelo inmediatamente después de su aplicación, para protegerlos de los rayos solares.

La fotodegradación ha sido reportada en altos niveles en herbicidas del grupo de los ácidos fenóxidos, dinitroanilinas, ácidos benzoicos, entre otros; sin embargo, todas las moléculas herbicidas tienden a ser degradadas por la luz solar en alguna medida. La absorción de ondas de luz entre los 290 y 450 nm puede producir la ruptura de enlaces simples en las moléculas, o activar muchas reacciones de degradación comunes como la oxidación, reducción, hidrólisis, etc. Es por ello

que se debe evitar exponer los herbicidas, en especial inmediatamente después de la aplicación, a altas intensidades lumínicas. Otros ejemplos de herbicidas susceptibles a la fotodegradación son las triazinas, las ureas sustituidas y las dinitroanilinas (Puricelli, 2004), mientras compuestos como el bentazon o herbicidas arseniacales son muy resistentes a la fotodegradación (Rao, 2002).

2.8.- Isomería óptica:

Existen moléculas que teniendo la misma fórmula elemental y átomos unidos de forma similar, rotan de manera diferente ante la luz plano-polarizada, ya que poseen una orientación espacial diferente. Este fenómeno se comprende mejor al imaginar las moléculas vistas en un espejo; si bien poseen la misma conformación molecular, no pueden superponerse una sobre la otra (Figura I.7). A estas moléculas se les ha denominado *isómeros ópticos* y las formas ópticas de ellas pueden poseer características y propiedades físico-químicas diferentes (Fournier, 2002).

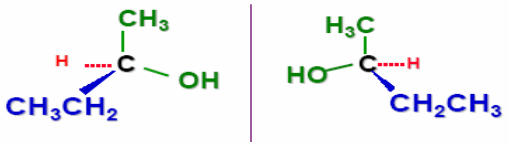

Figura I.7. Isómeros ópticos.

En las moléculas herbicidas existen isómeros ópticos que son activos como herbicidas y formas no activas. Se denomina mezcla racémica a la mezcla de ambas formas de moléculas; en la actualidad se han podido sintetizar herbicidas únicamente con moléculas en su forma activa, asegurando así que todas las moléculas herbicidas contenidas en el producto comercial son formas isómeras activas. Casos típicos son algunos herbicidas pertenecientes al grupo de los ariloxifenoxipropianatos, conocidos como los `*fop* (Ross y Lembi, 1999). En estos herbicidas, las moléculas son identificadas con terminaciones específicas para indicar la forma en la cual viene la molécula, por ejemplo, fluazifop-*P*.

CAPÍTULO II

ABSORCIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE HERBICIDAS EN PLANTAS

Introducción

Para que un herbicida pueda cumplir la misión de controlar las malezas afectando los procesos fisiológicos y bioquímicos de éstas, debe poder penetrar al interior de las plantas y moverse dentro de ella desde los sitios desde el sitio de penetración hasta el sitio donde ejerce su acción. La inmensa cantidad de plantas malezas y cultivadas con características diferentes que existen, la variedad de condiciones ambientales y de manejo de los cultivos en las que se utilizan los herbicidas y la diversidad de moléculas herbicidas que se utilizan en la actualidad, producen que el estudio y comprensión de los procesos de absorción y translocación de los herbicidas pueda ser complejo, ya que en algunos casos son bastante específicos. Sin embargo, el amplio interés que genera este tema, que se deriva de la comprensión de la importancia que estos procesos poseen en la efectividad de acción de los herbicidas, ha producido una serie de lineamientos básicos que permiten comprender estos procesos.

En este capítulo se detallan una serie de conceptos y procesos que proporcionan una idea de cómo sucede la absorción y la translocación (movimiento) de los herbicidas en las plantas.

1.- Absorción de herbicidas por las plantas:

La absorción de los herbicidas no es más que la entrada de los mismos desde el ambiente hacia el interior de la planta, ya sea a través de sus partes aéreas (hojas, tallo, etc.) o sus partes subterráneas (raíces, rizomas, bulbos, etc.).

Dependiendo de la forma de aplicación de los herbicidas los procesos de absorción serán muy diferentes. En condiciones de campo los herbicidas se aplican bajo dos formas básicas: (1) en el suelo, ya sea sobre el mismo o incorporándolo y (2) directamente sobre las partes emergidas (partes aéreas) de la planta, lo cual incluye primordialmente hojas y tallos.

1.1.- Absorción de herbicidas aplicados al suelo:

Los herbicidas que son aplicados al suelo o incorporados en este son absorbidos por las plantas a través de las raíces y otras estructuras subterráneas desde la solución del suelo (Anderson, 1983). Debido a que el suelo es un medio complejo dentro del cual se producen innumerables fenómenos físicos, químicos y biológicos que tendrán impacto sobre el comportamiento de los herbicidas, es necesario destacar algunos de los procesos que sufren los herbicidas en el suelo, de manera de entender la forma en que dichos procesos repercuten en la absorción y translocación de herbicidas por las plantas.

1.1.1.- Conceptos básicos en la relación herbicida-suelo:

Una de las propiedades más importantes del suelo que determina la dinámica de herbicidas dentro de esa matriz, es la capacidad de interactuar físico-eléctricamente con las moléculas que entren en contacto con él. Este fenómeno permite que el suelo pueda retener o liberar los diferentes compuestos con los cuales interactúa, entre ellos los herbicidas. La retención o liberación de los herbicidas por los componentes coloidales del suelo es conocido como el proceso de adsorción-desadsorción (Calvet y Charnay, 2002).

a.- La adsorción-desadsorción de herbicidas en el suelo:

La adsorción de un herbicida a las partículas de suelo se entiende como la fijación de la molécula por las cargas eléctricas externas a las partículas activas del suelo. Por el contrario, la desadsorción (o desorción) es el proceso mediante el cual el herbicida pasa de la superficie de los coloides a la solución del suelo, desde donde puede ser absorbido por las raíces de las plantas, ser evaporado, lixiviado o sufrir cualquier tipo de degradación física, microbiológica o metabólica (Anzalone, 2000).

Entre los componentes sólidos del suelo que poseen importancia en el fenómeno de adsorción-desadsorción de herbicidas por el suelo se encuentran las micelas, que pueden ser inorgánicas u orgánicas. Estos componentes del suelo tienen en sus estructuras diferentes puntos o zonas donde se establecen relaciones con los iones o moléculas ionizadas que se encuentran en la solución del suelo. En estos puntos se localizan cargas eléctricas que son capaces de "atraer" cationes y moléculas con cargas residuales positivas o de establecer puentes de agua, de hidrógeno u otras muchas formas de relaciones con aquellas que posean cargas residuales negativas o aniones (Tisdale *et al.*, 1993).

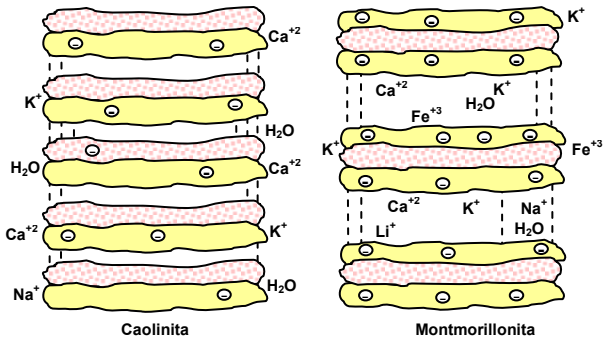

Figura II.1. Representación de las micelas coloidales inorgánicas más comunes en el suelo. Basado en Tisdale *et al.* (1993) y Dubach (1970). Adaptado por Anzalone.

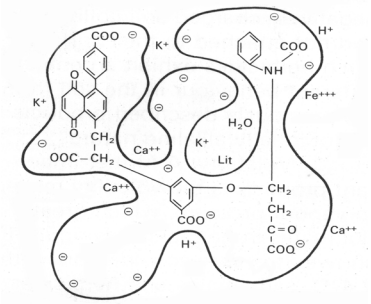

Figura II.2. Representación de una micela coloidal orgánica. Basado en Tisdale *et al.* (1993) y Dubach (1970). Adaptado por Anzalone.

De manera general es posible afirmar que las micelas orgánicas poseen una capacidad de interacción mayor que las micelas inorgánicas, debido a la gran cantidad de cargas eléctricas expuestas y la importante cantidad de relaciones (físicas, eléctricas y químicas) que pueden establecer con los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo. Por su parte, entre las diferentes formas de micelas inorgánicas que se encuentran en el suelo, aquellas que presenten mayor cantidad de cargas expuestas (como las arcillas 2:1) son las que poseen mayor capacidad de interactuar con las moléculas presentes en el suelo (García y Fernandez, 1991; Monaco *et al.*, 2002). Por ello el tipo de arcilla y la cantidad de materia orgánica presente en el suelo tendrá influencia en los procesos de adsorción-desadsorción de herbicidas en el suelo.

La adsorción y los fenómenos asociados a ella ejercen marcada influencia en la actividad biológica de los herbicidas que se aplican al suelo. La adsorción afecta el desplazamiento de los herbicidas y regula su disponibilidad para las plantas. Una vez aplicado un herbicida a un suelo, se establece un equilibrio dinámico entre la cantidad del compuesto que esta en la solución del suelo y la que se encuentra en solución. A medida que por descomposición, volatilización o absorción por la planta van suprimiéndose moléculas de la fase acuosa, se produce desadsorción como respuesta a la disrupción del equilibrio entre las dos fases, hasta que se le restablece dicho equilibrio. La desadsorción se ha demostrado en muchos herbicidas, entre los que se pueden nombrar el 2,4-D, monurón, dalapon, atrazina y simazina (NAS, 1978).

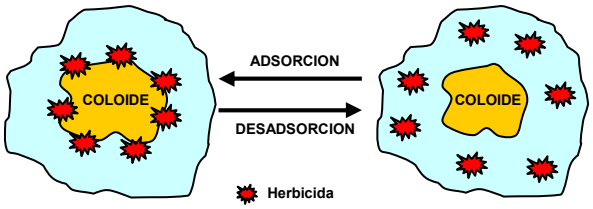

Figura II.3. Proceso de adsorción-desadsorción de herbicidas en el suelo. Tomado de García y Fernández (1991). Adaptado por Anzalone.

La relación entre la concentración de herbicida adsorbido a las micelas coloidales del suelo y la cantidad de herbicida en la solución del suelo es uno de los principales fenómenos que van a definir la dinámica de los herbicidas en el suelo, determinando factores como la persistencia, la lixiviación, la inmovilización, o la absorción por las plantas, entre otros. Por ejemplo, un herbicida adsorbido a las partículas de suelo será más persistente, ya que los herbicidas adsorbidos se descomponen más lentamente que cuando se encuentran en la solución del suelo (NAS, 1978). Las plantas sólo podrán absorber con facilidad herbicidas que se encuentren en la solución del suelo, por lo que cualquier fenómeno que afecte la relación antes descrita afectará de alguna forma la absorción de los herbicidas por las plantas.

Como se ha comentado anteriormente, la absorción de herbicidas desde el suelo por las plantas es un proceso dependiente de, entre otros factores, el comportamiento de los herbicidas en dicho suelo. Si los herbicidas se adhieren de forma irreversible sobre las micelas coloidales del suelo (como es el caso del herbicida paraquat, el cual es un dicatión), la absorción del herbicida por la planta se verá limitada, e incluso será inexistente (Asthon y Crafts, 1973). Por el contrario, aquellos herbicidas que son liberados con facilidad de las micelas coloidales y son transferidos a la solución del suelo, tendrán mayores posibilidades de ser absorbidos por las plantas.

Los factores que afectan la relación entre herbicida adsorbido/herbicida en solución de suelo se pueden agrupar de diferentes formas. En este caso se agruparán en factores que dependen o son inherentes al herbicida y factores que son inherentes a las características propias del suelo. Entre los factores inherentes al herbicida más importantes se encuentran:

- *La polaridad o capacidad de polarización del herbicida:* de acuerdo a si es un anión ó un catión, si posee cargas residuales o se encuentra en forma molecular (neutra) en el suelo. Esta característica es de alta importancia, ya que de ella depende en gran medida la posibilidad de adhesión de las moléculas a las micelas del suelo. El proceso de adsorción es fácil de visualizar para herbicidas catiónicos o con cargas residuales positivas, ya que la mayoría de las cargas expuestas de las micelas coloidales son negativas. Para los herbicidas que se disocian débilmente la materia orgánica es el componente decisivo en la adsorción. Las moléculas herbicidas sin cargas, tales como las triazinas a pH iguales o mayores de 5 o los derivados de la urea, se adsorben a los coloides por enlaces débiles como las fuerzas de "van der Waals", enlaces o puentes de hidrógeno, complejos coordinados con cationes polivalentes y complejos asociados con moléculas de agua (García y Fernández, 1991).
- *El coeficiente de adsorción del herbicida (K_d)*: este factor propio del herbicida determina el potencial reparto de las moléculas del herbicida entre las micelas coloidales del suelo y la solución del suelo. En el caso de suelos con un importante contenido de materia orgánica debe considerarse el coeficiente de reparto carbono orgánico-agua (K_{OC}), ya que, por ejemplo, aquellos herbicidas que posean altos valores de adsorción al carbono orgánico tenderán a adherirse con facilidad a las micelas orgánicas del suelo, limitándose la cantidad del compuesto en la solución del suelo (Carter, 2000), desde donde pueden ser absorbidos por las plantas.
- *El pK_a de la molécula herbicida:* que, tal como se ha comentado, determina la capacidad de ionización a diferentes pH propia de cada molécula. Esta característica es importante ya que dependiendo del pH del suelo predominarán formas iónicas o

moleculares del herbicida, lo que tiene alta influencia en las relaciones de adsorción de los herbicidas sobre las micelas coloidales del suelo.

- *La solubilidad del herbicida en agua:* que indica la capacidad del herbicida de mantenerse de forma soluble en la solución de suelo. Lógicamente un herbicida muy soluble en agua tenderá a estar en mayor concentración en la solución del suelo, por lo que se perderá más fácilmente por lixiviación, volatilización o degradación química o biológica.
- *La cantidad de herbicida aplicado (dosis):* ya que a mayor cantidad de herbicida aplicado, mayor será la proporción de herbicida en la solución de suelo y/o adherido a las micelas coloidales.

Por su parte, entre los factores con mayor importancia que afectan la adsorción-desadsorción de herbicidas a las micelas coloidales que dependen de las características del suelo tenemos:

- *La cantidad de micelas coloidales presentes en el suelo:* dependiendo de la cantidad y tipo de arcilla y de la materia orgánica presente en suelo, existirán mayor cantidad de sitios de interacción herbicida:micelas disponibles.
- *La humedad del suelo:* este es uno de los factores de mayor importancia, ya que afecta de forma definitiva no sólo el fenómeno de adsorción/desadsorción del herbicida a las micelas coloidales, sino también directamente en la absorción del herbicida, ya que de no existir agua en el suelo (solución de suelo), será imposible que la planta absorba el herbicida. Además, un estrés hídrico en la planta altera todos los procesos fisiológicos de la misma, incluyendo el proceso de absorción de agua y solutos desde el suelo.
- *El pH del suelo:* que junto al pK_a del herbicida define la proporción de moléculas del herbicida que estarán en forma ionizada o en forma molecular (neutra).
- *La temperatura del suelo:* ya que ésta tiene evidente influencia tanto en la dinámica molecular del herbicida como en la disponibilidad de agua en el suelo. La temperatura del suelo también influye sobre los procesos fisiológicos, metabólicos y de desarrollo de la raíz, por lo cual impacta directamente sobre la capacidad de absorción de herbicidas por la raíz.
- *Los microorganismos del suelo:* este es un factor de importante consideración, ya que la mayor parte de la degradación que sufren los herbicidas en el suelo se debe a la acción microbiana. También existen relaciones entre los microorganismos asociados a la raíz (micorriza, por ejemplo) y la capacidad de absorción de compuestos desde el suelo, entre ellos los herbicidas.

Estos factores, junto a otros, tienen influencia sobre los procesos de absorción de herbicidas desde el suelo por las plantas, ya que definen la disponibilidad de estos para las plantas en la solución del suelo.

b.- Persistencia de herbicidas en el suelo:

La absorción de herbicidas desde el suelo no es un proceso estático en el tiempo, sino que se extiende desde el momento del contacto entre el herbicida y las estructuras subterráneas con capacidad de absorberlos, hasta que el herbicida se disipa del suelo o la planta muere. La extensión de este período de tiempo está en función de múltiples factores y normalmente se le conoce como persistencia del herbicida en el suelo. Al definir aún más esta idea, es común que se entienda como persistencia de herbicidas en el suelo al período de tiempo en el cual el herbicida está en forma activa en el suelo (Vega, 1987), es decir, tiene la capacidad de ejercer su efecto fitotóxico sobre plantas susceptibles; esta especificación se hace ya que es posible encontrar residuos del herbicida en el suelo que no poseen capacidad fitotóxica, debido a que han sufrido algún tipo de transformación química o metabólica, o porque se encuentra en una concentración incapaz de causar daño a las plantas. También es posible que el herbicida se encuentre en forma activa en el suelo, pero fuera del alcance de las estructuras de las plantas que puedan absorberlo, ya sea por procesos de lixiviación a estratos profundos o por escorrentía (Anzalone, 2000). En este caso el proceso de absorción se ve imposibilitado por una circunstancia espacial. Esta condición se utiliza con criterio de selectividad, ya que herbicidas con potencial de causar daños a una especie cultivada en particular pueden ser utilizados en dicho cultivo siempre que se coloque fuera del alcance de las raíces y otras estructuras de absorción. A este tipo de selectividad se le conoce como "selectividad posicional" (Anderson, 1983).

Los factores que definen la persistencia de un herbicida en el suelo pueden agruparse en tres grandes grupos: (1) factores que definen la adsorción-desadsorción de herbicidas a las micelas coloidales del suelo, (2) factores climáticos y (3) características o factores dependientes del manejo del cultivo. Esta serie de factores tendrán influencia sobre el proceso de disipación de los herbicidas en el suelo. Nótese que se utiliza el término *disipación* y no *degradación*, ya que el primero es más amplio e incluye al segundo. La disipación incluye todos aquellos procesos que promuevan la reducción de la concentración del herbicida en el suelo, entre otros la lixiviación, escorrentía, volatilización, fotodescomposición y la *degradación*, que es la transformación química o metabólica de las moléculas hacia formas diferentes a la original. Entonces un herbicida puede disiparse de un suelo sin degradarse, es decir, sin sufrir modificaciones en su estructura molecular (Anzalone, 2000).

La degradación de los herbicidas en el suelo puede suceder por procesos químicos-físicos o estar mediada por procesos metabólicos. Entre los procesos de degradación química de herbicidas en el suelo más importantes se encuentran:

- *Hidrólisis:* que es la transformación de las moléculas herbicidas por efecto de la interacción con el agua. Este proceso puede verse favorecido por la adsorción de los herbicidas a las micelas coloidales, ya que éstas se comportan como una superficie catalítica. Según

este mecanismo, los ésteres pueden transformarse en ácidos y alcoholes, los nitrilos en amidas y ácidos carboxílicos, las triazinas en hidroxitriazinas y las ureas en anilinas y amidas (Puricelli, 2004).

- *Fotodescomposición:* que, como se ha comentado, es la degradación producida por la ruptura de enlaces de la molécula por la acción de la radiación ultravioleta (UV) del sol. Puede ser especialmente importante en herbicidas que son aplicados al suelo y no son incorporados, o en el caso de herbicidas post-emergentes que son aplicados sobre el follaje de las plantas en condiciones de alta intensidad lumínica.
- *Termodegradación:* que sucede cuando los plaguicidas quedan expuestos a altas temperaturas en el suelo y pueden ser degradados por efecto de la energía que se le imprime a las moléculas con la temperatura.
- *Otros procesos químicos:* que pueden ser específicos para ciertos grupos de herbicidas o más generales, actuando sobre diferentes tipos de herbicidas. Entre ellos tenemos: desalquilación, decarboxilación, rotura del enlace éster, hidroxilación, metilación, reducción o fisión de anillos (Puricelli, 2004).

El proceso de degradación biótica de herbicidas en el suelo esta ampliamente relacionado con los microorganismos del suelo, ya que esta es la principal vía para la disipación de las moléculas orgánicas en el suelo. Las principales vías que pueden tomar los microorganismos para degradar los herbicidas son similares a las descritas para la degradación química e incluyen procesos como la deshalogenación, desalquilación, descarboxilación, oxidación, hidrólisis, hidroxilación, conjugación, destrucción del anillo estructural, etc. También es posible que suceda la degradación de herbicidas por efecto de enzimas extracelulares (Rao, 2002).

Muchos géneros de microorganismos heterotrófos del suelo utilizan los plaguicidas (y entre ellos a los herbicidas) como sustratos. Especies de los géneros *Agrobacterium, Arthrobacter, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Flavobacterium, Klebsiella, Pseudomonas* y *Xanthomonas* entre las bacterias; *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Glomerella, Mucor, Penicillium, Rhizoctonia* y *Tricoderma* entre los hongos, y *Micronospora, Nocardia* y *Streptomyces* entre los actinomicetos pueden modificar una o varias de las moléculas de los agroquímicos. La diversidad de los sustratos es relacionada con la diversidad de especies. Sin embargo, en condiciones naturales es difícil predecir cual de las especies es responsable de una transformación en particular (Alexander, 1977).

Es así como el proceso de absorción de herbicidas desde el suelo por las plantas es afectado por una larga serie de factores, inclusive mucho antes de que el herbicida entre en contacto con la planta. No es el objetivo ahondar sobre los procesos de la dinámica que sufren los herbicidas en el suelo, sino sólo brindar algunos conceptos básicos para comprender mejor el proceso de absorción y posterior translocación de los herbicidas en las plantas.

1.1.2.- Estructuras con capacidad de absorción de herbicidas desde el suelo:

Una vez que un herbicida se encuentra en la solución del suelo debe ponerse en contacto con los órganos de las plantas capaces de absorberlos, para posteriormente penetrar en las células. El acercamiento de las moléculas del herbicida a los órganos que pueden absorberle puede suceder por varias vías (Dinelli y Catizone, 2001):

- *Difusión:* la difusión es el movimiento de las moléculas del herbicida desde zonas de alta concentración hacia las zonas de menor concentración, siendo un proceso pasivo. Las zonas de menor concentración del herbicida se encuentran alrededor de las raíces, ya que allí el herbicida es retirado por las plantas durante la absorción de agua y solutos del suelo o durante el intercambio de gases con el suelo, en el caso de moléculas volátiles.
- *Flujo de masas*: es el arrastre de grandes cantidades de moléculas de herbicidas hacia las raíces por efecto de la interacción físico-eléctrica entre las moléculas, que les permite movilizarse de forma conjunta. Este proceso sucede a menor escala que la difusión, y sólo ocurre en las zonas muy cercanas a la raíz.
- *El crecimiento de las plántulas:* durante el cual las raíces y otras estructuras subterráneas de las plantas interceptan las moléculas del herbicida debido al movimiento de las mismas a través del perfil de suelo.

El proceso de flujo de masas es importante para conseguir el contacto entre las estructuras absorbentes y los herbicidas en el caso de herbicidas no volátiles. La difusión es de mayor importancia en el caso de los herbicidas volátiles, en especial en suelos con poca cantidad de agua.

Posterior al contacto entre el herbicida y las partes subterráneas de la planta sucede el proceso de penetración del herbicida a la planta. No sólo las raíces tienen capacidad para absorber herbicidas del suelo, ya que existen otras estructuras subterráneas que lo hacen y, en algunos casos, esto es de importancia en la definición de la selectividad de los herbicidas. Ya que la mayoría de los herbicidas que se aplican al suelo poseen actividad sobre plantas que se encuentran en los primeros estadios de desarrollo, mucho del proceso de absorción de herbicidas lo realizan las estructuras propias de las plantas jóvenes, las cuales son comúnmente denominadas plántulas.

Las estructuras de las plantas con capacidad de absorción de herbicidas desde el suelo de acuerdo al estado de crecimiento de las plántulas pueden ser:

- *Antes de la emergencia de la plántula:* semillas en germinación, brotes y primeras raíces de las plántulas.
- *Después de la emergencia de la plántula:* raíces (en particular los pelos absorbentes y zonas no lignificadas), coleoptilo, mesocótilo o hipocótilo. En el caso de plantas con tallos subterráneos, tubérculos, bulbos, rizomas u otras estructuras subterráneas, la absorción dependerá de la conformación de dichas estructuras, pero en general es baja.

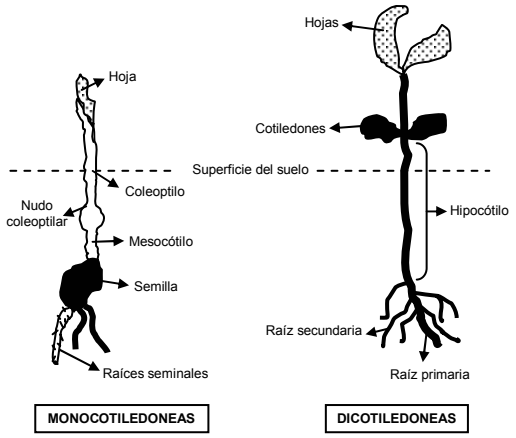

Figura II.4. Partes de plántulas de mono y dicotiledóneas. Tomado de Klingman y Ashton (1980). Adaptado por Anzalone.

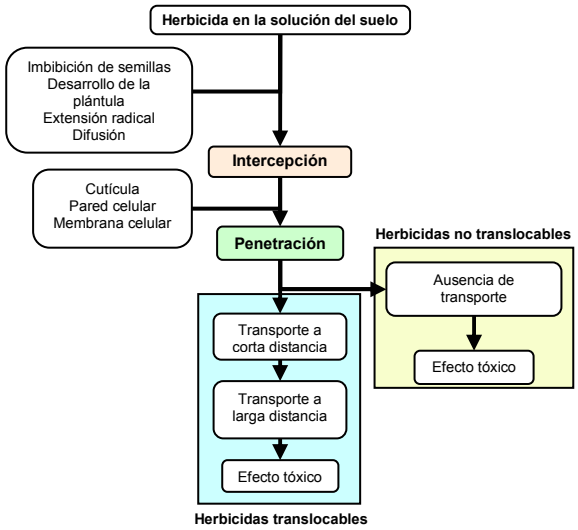

Figura II.5. Esquema general del proceso de absorción de herbicidas aplicados al suelo. Tomado de Dinelli y Catizone (2001). Adaptado por Anzalone.

Luego de que las plántulas se desarrollan en plantas adultas, es muy probable que sólo las raíces, a través de los pelos radicales, sean capaces de absorber de forma activa y eficiente herbicidas desde la solución del suelo (Anderson, 1983). Independientemente de la estructura por la cual se absorban los herbicidas, estos compuestos deben superar una serie de barreras anatómicas para poder penetrar en el citoplasma celular. Una de las más importantes de estas barreras es la cutícula, la capa cerosa que recubre las células epidérmicas de las plantas, en especial en sus estructuras aéreas. La cutícula se encuentra poco desarrollada o es inexistente en las estructuras subterráneas que absorben herbicidas de la mayoría de las plantas (Monaco *et al.*, 2002). El proceso de penetración de esta capa se detallará para el caso de herbicidas aplicados al follaje, donde la cutícula esta más desarrollada y juega un papel de mayor importancia en la entrada de herbicidas a las células.

Posterior a la entrada de herbicidas en la planta se producirá la translocación, en el caso de los herbicidas translocables, o se ejercerá el mecanismo de acción en el mismo punto donde entran en contacto con las plantas, para el caso de los herbicidas no translocables o de contacto.

a.- Absorción de herbicidas por las semillas:

Los herbicidas aplicados al suelo pueden ser adsorbidos o absorbidos por las semillas presentes en el medio y esto puede suceder antes o durante la germinación. Cuando quedan adsorbidos externamente a la cubierta de la semilla, podrán penetrar a las plántulas en el momento de la emergencia (Marcano, 2000).

Los herbicidas son absorbidos por las semillas mediante la imbibición de agua; la entrada de agua sucede con rapidez al principio del proceso, ya que existe un alto diferencial de potencial hídrico entre las semillas y el suelo, pero va disminuyendo a medida que la semilla alcanza su nivel óptimo de humedad. El proceso de imbibición permite que el herbicida logre una mayor concentración dentro de la semilla que en la solución a su alrededor.

El proceso de absorción de herbicidas por las semillas está influenciado por la solubilidad del herbicida en la solución del suelo, la velocidad de difusión del herbicida en el suelo o dentro de la semilla, la permeabilidad de la cubierta, el tamaño y contenido de lípidos y proteínas, la temperatura del suelo, la concentración del herbicida en la solución del suelo, la estructura molecular del herbicida y el pH de la solución del suelo (Marcano, 2000).

Luego de su entrada en la semilla, el herbicida puede acumularse en el tegumento o en las partes internas de las semillas. Esta distribución diferenciada de los herbicidas esta ampliamente influenciada por los valores de Kow y la solubilidad del compuesto, así como por la composición de la semilla.

b.- Absorción de herbicidas por las raíces:

Los herbicidas son absorbidos por las raíces junto a muchas otras sustancias desde la solución del suelo. La importancia de las raíces como sitio de entrada de los herbicidas está relacionada directamente con la localización de los sitios de acción de los mismos. Si el sitio de acción está localizado en un lugar diferente a la raíz el herbicida deberá ser transportado, de tal forma que además de la absorción también es importante la translocación para una efectiva acción del herbicida. En este caso el herbicida puede o no penetrar al citoplasma de las células que conforman la raíz, pero siempre será indispensable que alcance los sistemas de transporte de fluidos (xilema y floema) para poder ejercer su mecanismo de acción. Por el contrario, si el sitio de acción de los herbicidas es la misma raíz, el transporte de los herbicidas se realiza a muy corta distancia (entre

células), por lo cual la entrada de los herbicidas al interior de las células es el proceso crítico para que el compuesto pueda ejercer su mecanismo de acción.

Algunos herbicidas forman sales insolubles, acumulándose dentro de las células de las raíces de las plantas. Otros herbicidas permanecen libres y móviles y los mismos son translocados fácilmente, vía apoplasto, para ejercer su acción en la parte aérea de la planta (Marcano, 2000).

Para que los herbicidas translocables alcancen los sistemas de transporte de fluidos de las raíces necesitan vencer una serie de barreras. La mayor parte de la absorción de la solución de suelo que realizan las plantas se concreta a través de los pelos radicales. En general, un soluto que es absorbido desde la solución del suelo por las plantas puede tomar, de forma alternada o simultánea, dos vías para alcanzar los vasos del xilema y ser transportado por la corriente transpiratoria: (1) la vía apoplástica, utilizando la pared celular de la epidermis y la corteza, a través de la membranas de la endodermis o, en aquellas especies que desarrollan bandas de Caspary exodérmicas, los solutos también pueden atravesar la membrana en la región exodérmica y (2) la vía simplástica, atravesando las membranas de la células de los pelos radicales, epidermis o corteza y moviéndose hacia la estela por los plasmodesmos y/o atravesando la membrana (García y Fernández, 1991). Otros compuestos son capaces de moverse por ambas vías, por lo cual poseen movimiento apo-simplástico. Este balance en la distribución entre los compartimientos apoplásticos y simplásticos determinará el patrón de transporte del compuesto en la planta.

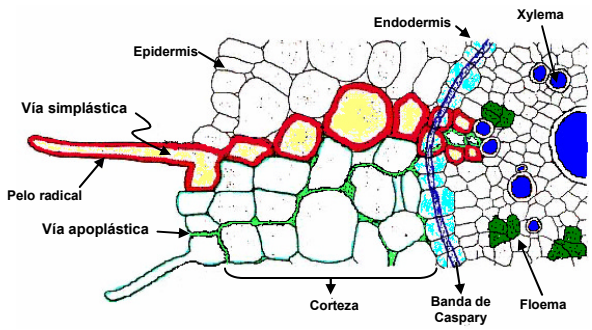

Figura II.6. Estructura de la raíz y vías de entrada de compuestos desde el suelo al xilema y floema. Tomado de Marcano (2000). Adaptado por Anzalone.

Uno de los factores cruciales en el posterior transporte de los compuestos absorbidos por las raíces es la capacidad que posean de atravesar la membrana plasmática, que actúa como barrera al flujo. Los herbicidas menos lipofílicos tenderán a tomar la vía apoplástica antes de dejar la endodermis, mientras los más lipofílicos tenderán a cruzar las membranas y se distribuirán en los tejidos lipofílicos a lo largo de la vía de transporte. Es por ello que entre las propiedades físico-químicas que intervienen en el transporte de herbicidas que sucede luego de la absorción, la afinidad por los lípidos y el grado de acidez del compuesto juegan un rol importante (Sicbaldi *et al.*, 1997).

Los herbicidas pueden penetrar las paredes de la epidermis y las células del parénquina cortical por flujo de masas, pero la absorción no se ha completado hasta que el herbicida no ha traspasado la membrana celular y se ha introducido en el citoplasma. En la mayoría de los casos los herbicidas entran a la raíz por los pelos radicales y el sistema simplástico, por la misma vía que los iones inorgánicos. En este punto encontrarán como primera barrera a la cutícula, pero debido a que las raíces están diseñadas para la absorción de agua y sales, el grosor de la cutícula de las células epidérmicas es limitado y resulta particularmente permeable (Dinelli y Catizone, 2001).

El proceso de absorción puede ser activo y pasivo; el proceso activo involucra el uso de energía en forma de ATP y la presencia de transportadores en la membrana plasmática, mientras que los procesos pasivos se concretan por fenómenos osmóticos mediante la absorción de agua y su movimiento en el apoplasto. Este último proceso es motorizado por la transpiración en las partes aéreas de la planta.

Los herbicidas pueden tomar las mismas vías de penetración de otros solutos que se han descrito anteriormente para alcanzar el protoplasma de las células y los sistemas de conducción de sustancias en la planta. En la vía apoplástica el herbicida penetra a las paredes celulares y se mueve entre ellas; sin embargo, al llegar a la endodermis estas moléculas deben entrar brevemente al sistema simplástico para superar la banda de Caspary y posteriormente alcanzar el xilema. En la vía simplástica la penetración se inicia en las paredes celulares, para luego penetrar al protoplasma de las células de la epidermis, corteza o ambas, pasando de célula en célula (vía plasmodesmos) a la endodermis, estela y luego al floema. En la vía apolástica-simplástica el movimiento se inicia en las paredes celulares, pero las moléculas pueden moverse más o menos libremente entre ambos sistemas, ya que gran parte de los herbicidas translocables aplicados al suelo traspasan con facilidad la membrana plasmática (García y Fernández, 1991), pero sólo pueden atravesar la banda de Caspary por la vía simplástica.

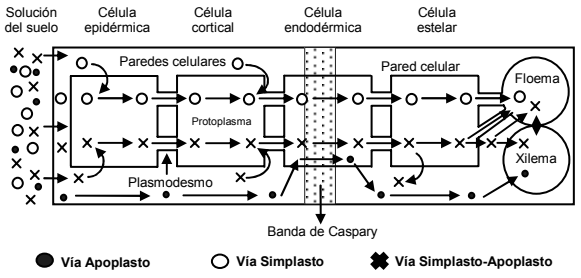

Figura II.7. Esquema general del movimiento de herbicidas desde la solución del suelo hacia el xilema y el floema. Tomado de Klingman y Ashton (1980). Adaptado por Anzalone.

Ciertos herbicidas se encuentran restringidos a una ruta de penetración y otros lo pueden realizar por las dos vías. La misma está determinada por las propiedades físico-químicas del producto. Cuando alcanzan al xilema, la translocación es rápida y en el caso del floema es muy limitada (Marcano, 2000). Un herbicida no polar puede atravesar con facilidad la banda de Caspary y difundirse en ella para alcanzar las células de la estela y así continuar moviéndose por el simplasto. Por el contrario, un herbicida polar no puede entrar con facilidad al simplasto, por lo que debe moverse junto al agua por el sistema apoplástico (Rao, 2002).

Las raíces de las plantas pueden ser selectivas en su absorción de herbicidas, de la misma manera como absorben los iones inorgánicos. Herbicidas como las s-triazinas y dinitroanilinas, tienen facilidad para ser absorbidas por las raíces. Cuando el 2,4-D es absorbido por las raíces de forma accidental (por exceso del compuesto en el suelo), tiende a reaccionar con iones de sodio presentes en las células de las raíces para formar sales insolubles de 2,4-D, las cuales se acumula en las células (Anderson, 1983). Sin embargo, en la mayoría de los casos el proceso de entrada de herbicidas a las raíces es por difusión, como en el caso de la atrazina, aunque la absorción de ciertos herbicidas puede estar relacionada con procesos metabólicos (García y Fernández, 1991).

La mayoría de los herbicidas de aplicación al suelo no alcanzan concentraciones superiores a las 400 ppm en las capas superficiales del suelo (entre 5 y 10 cm), por lo que la cantidad de herbicida que es absorbido por las plantas es muy reducida, en especial si consideramos que las raíces exploran sólo un porcentaje de la capa de suelo que está tratada con el herbicida. Es por esto que gran parte de la efectividad de los herbicidas translocables aplicados al suelo se basa en la necesidad de una eficiente absorción de los mismos desde el suelo.

c.- Absorción de herbicidas por los brotes subterráneos:

La absorción de herbicidas por los brotes subterráneos de las plantas sucede de forma diferente entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. En las gramíneas, el nudo coleoptilar y el nudo de la corona (que se formará del meristemo del mesocótilo a nivel del suelo) son los sitios de absorción más importantes, ya que en estas estructuras la cutícula y la pared celular de las células que le forman son de poco grosor, lo que facilita la entrada de los herbicidas. Además, la entrada de los herbicidas en esta zona de la plántula se ve favorecida por la ausencia de las bandas de Caspary, que son un importante impedimento cuando la entrada de los herbicidas sucede por las raíces (Dinelli y Catizione, 2001). Esta situación hace que el proceso de absorción de herbicidas por los brotes subterráneos en algunas gramíneas sea más importante para la efectividad del herbicida que la absorción realizada por las raíces. Otras estructuras como el coleoptilo, las hojas y yemas (encerradas en la vaina coleoptilar) y el epicótilo son de menor importancia en los procesos de absorción de herbicidas por las gramíneas (Marcano, 2000). En plantas dicotiledóneas, la absorción de herbicidas por los brotes subterráneos sucede, pero en general tiene poca importancia, ya que es limitada. En este grupo de plantas la mayoría de los herbicidas son absorbidos principalmente por la raíces.

Tanto la ubicación del nudo coleoptilar con respecto a la superficie del suelo y la capa de suelo tratada con el herbicida, como las diferencias en los patrones y estructuras de absorción entre especies, son importantes factores que definen la selectividad de algunos herbicidas (pendimetalina, por ejemplo). La selectividad alcanzada utilizando esto criterios puede clasificarse como "selectividad posicional". Como ejemplo tenemos el caso de las especies dicotiledóneas *Datura ferox* auca. non *L.*, *Anoda cristata* L. Schlecht. e *Ipomoea* spp. que, a pesar de ser sensibles a los herbicidas metribuzina y atrazina, escapan a la acción de estos compuestos, ya que los puntos de absorción de los herbicidas en las plantas suelen estar por debajo del perfil del suelo donde estos se ubican (Puricelli, 2004).

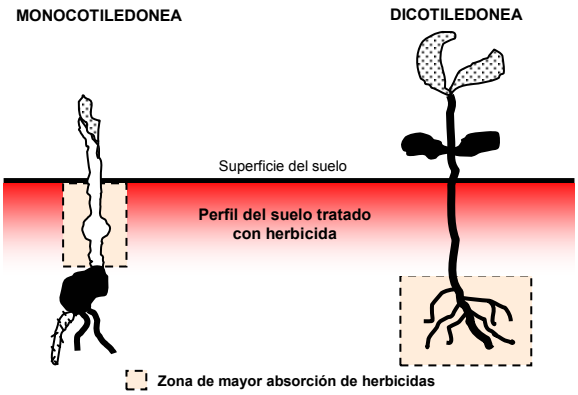

Figura II.8. Selectividad posicional lograda por la absorción diferencial de herbicidas por las estructuras subterráneas entre plantas mono y dicotiledóneas. Tomado de Gauvrit (1996). Adaptado por Anzalone.

Existe un grupo de herbicidas (como los tiocarbamatos o la trifluralina) que pueden penetrar las estructuras subterráneas en forma gaseosa. Para que estos herbicidas puedan ser efectivos juegan un importante papel las condiciones hídricas, la forma de aplicación y la temperatura del suelo, ya que los herbicidas deben ser capaces de difundirse en la película de agua que rodea a los pelos absorbentes. La penetración de herbicidas en forma gaseosa a la planta es rápida y puede suceder tanto por vía apoplástica como por vía simplástica (Monaco *et al.*, 2002). La volatilización de estos compuestos depende básicamente del valor de la presión de vapor del compuesto y de las características del suelo y el clima en el momento de su aplicación. Una vez dentro de la planta estos compuestos deben difundirse en la membrana celular para lograr su entrada al citoplasma;

este proceso dependerá de su afinidad por los lípidos de la membrana, pero en la mayoría de los casos esta afinidad es alta.

1.1.3.- Factores que afectan la absorción de herbicidas aplicados al suelo:

Todos los procesos de absorción de herbicidas están mediados por las características del suelo, las propiedades físico-eléctricas de las moléculas herbicidas y los factores que afecten el movimiento del agua dentro de las plantas. Es importante recalcar que los herbicidas son absorbidos desde la solución de suelo, es decir, desde el agua presente en el suelo y esta absorción está motorizada por el proceso de transpiración de las plantas y el estado hídrico de las mismas, esto inidca que todo factor que influya sobre el proceso de transpiración de las plantas, el estado hídrico de la planta y, por supuesto, el nivel de humedad del suelo, tendrá un efecto directo sobre la absorción y posterior movilización de herbicidas desde el suelo. Una planta que comience su desarrollo sobre un suelo seco tratado con herbicida, no podrá absorber el compuesto de forma eficiente, ya que no sólo será incapaz de desarrollarse de forma adecuada, sino que también existirá poca solución de suelo desde donde absorber el herbicida.

Las condiciones meteorológicas son factores que tienen una alta influencia sobre los procesos de evapotranspiración de las plantas, y por ello, sobre la absorción de herbicidas por las plantas. Un clima soleado, con niveles medios de humedad en al aire, temperaturas óptimas para el desarrollo vegetal (unos 25 a 30^{O}C) y brisas ligeras junto a un suelo con una apropiada humedad, son la combinación que más promueve la transpiración en la mayoría de las plantas vasculares, por lo que promoverán una rápida absorción y movilización de herbicidas.

Otro factor importante que tiene influencia sobre la absorción de herbicidas desde el suelo por las plantas es la edad de la planta. Las monocotiledóneas presentan patrones de absorción diferentes de acuerdo a la edad de la planta, debido en gran medida al desarrollo de las partes subterráneas de la planta, que absorben herbicidas de forma muy distinta. Similar situación puede observarse también en plantas dicotiledóneas; por ejemplo, Knuteson *et al.* (2002) demostraron que la especie *Myriophyllum aquaticum* Vell., utilizada en planes de fitorremediación, es capaz de absorber mayor cantidad del herbicida simazina cuando posee 2 semanas de edad que cuando posee 4 semanas, lo que indica que la "selectividad" en la absorción del herbicida varía a través del tiempo.

Probablemente el incipiente desarrollo de la cutícula de las raíces y la inexistencia de las bandas de Caspary en las raíces y brotes más jóvenes, sean la causa de que la absorción de herbicidas en las primeras etapas de desarrollo de gran parte de las plantas sea más eficiente (Klingman y Ashton, 1980). Es por ello que gran parte de los tratamientos al suelo sólo son eficientes cuando las plantas a controlar estén en proceso de germinación o se encuentren aún poco desarrolladas.

En cuanto a la absorción de herbicidas en forma gaseosa, ya se ha comentado que entre los factores más importantes que afectan su absorción se encuentran el nivel de humedad y la temperatura del suelo, ya que dichos factores afectan directamente los procesos de volatilización de los herbicidas y el intercambio gaseoso entre las estructuras subterráneas de las plantas y el suelo.

1.2.- Absorción de herbicidas aplicados a los órganos aéreos de las plantas:

Los herbicidas post-emergentes son cada vez más utilizados en la agricultura y el éxito en su uso depende de lograr una adecuada absorción de los mismos por las plantas. Estos herbicidas se aplican a los órganos aéreos de las plantas y son conocidos popularmente como "herbicidas de aplicación foliar"; sin embargo, no sólo el follaje es impregnado por los herbicidas en este tipo de aplicación, sino también lo son el tallo, los meristemas apicales y axilares e incluso las flores y frutos cuando ellos están presentes. Por supuesto, hay que considerar que el follaje es la parte aérea expuesta que predomina en las plantas, de allí que sea la hoja la estructura donde el proceso de absorción de herbicidas es más importante.

Dinelli y Catizone (2001) plantean que existen dos procesos básicos que definen la entrada de los herbicidas a las partes aéreas de las plantas: (1) la retención del herbicida por las hojas y otras estructuras aéreas y (2) la penetración al interior de las células, para lo cual el herbicida debe vencer una serie de barreras. Esta visión es bastante simple y puede ayudar a comprender el proceso inicial de acción de un herbicida, que comienza con su penetración en la planta. Sin embargo, hay que considerar que siempre suceden una importante cantidad de eventos antes de que un herbicida penetre a las células y es posible encontrar diferentes formas de organizar y describir esos eventos. El primero de estos eventos es la retención foliar del herbicida.

1.2.1.- Retención foliar de herbicidas:

La retención del herbicida por las estructuras aéreas, conocida como "retención foliar", se refiere al tiempo en el cual el herbicida permanece sobre la planta; entre otros factores, ese tiempo de interacción entre las gotas de la mezcla herbicida y las hojas va a definir la cantidad de herbicida que va a entrar en la planta, ya que el proceso de penetración del herbicida al interior de la hoja no sucede de forma inmediata.

Podemos diferenciar varios eventos en el proceso de retención de las gotas de la mezcla herbicida sobre las hojas: la adhesión de la gota a la superficie foliar, la escorrentía de las gotas, el área de contacto entre la gota y la hoja (humectabilidad) y la evaporación de las gotas del herbicida desde la superficie foliar.

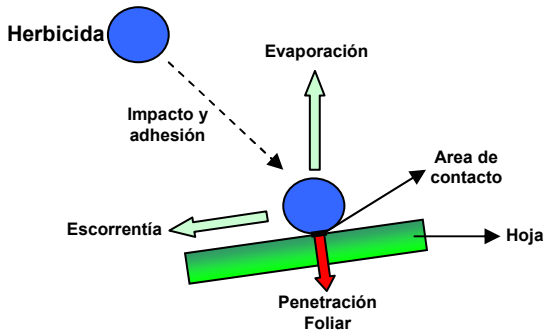

Figura II.9. Fases de la retención foliar de plaguicidas. Tomado de Dinelli y Catizone (2001). Adaptado por Anzalone.

La *adhesión de las gotas* de la mezcla herbicida a las hojas es un proceso muy rápido, que puede suceder en 3 a 6 milisegundos (Gauvrit, 2001). La complejidad de este proceso es alta y depende de diversos factores como la morfología de la planta y la hoja, las características físico-químicas del herbicida, el tipo de formulación del herbicida y las condiciones climáticas (Dinelli y Catizone, 2001). Otro factor importante que determina la adhesión foliar de herbicidas es la composición de las ceras epicuticulares y el microrelieve de las hojas. Altos niveles de irregularidades en el microrelieve de las hojas pueden producir interfaces aire-líquido y sólido-líquido, los cuales inhiben la penetración de herbicidas. Estas irregularidades son producidas por la conformación de las ceras epicuticulares, el contorno de las células epidermales, el ordenamiento de las venas en las hojas y por los pelos o tricomas. Por ejemplo, en *Sorghum halepense* L. los tricomas bicelulares inicialmente incrementan las irregularidades en el microrelieve de las hojas, pero al madurar la hoja estos tricomas descargan mucílagos sobre las ceras epicuticulares cristalinas de las hojas, disminuyendo las irregularidades y convirtiéndose en una nueva barrera a ser franqueada por los herbicidas en su penetración (Kirkwood, 1999).

Otro factor que determina la retención de los herbicidas a las hojas es la formulación del producto y el uso de adyuvantes. Los adyuvantes son productos que afectan las propiedades físicas de la mezcla aplicada y pueden actuar como emulsificantes, agentes humectantes, adherentes, antiespumantes, agentes buffer o activadores de superficie (Miller y Westra, 1998); estos últimos, además de aumentar la superficie de contacto entre las gotas y las hojas, pueden actuar como co-solventes de la cutícula. Es así como estos productos afectan la *superficie de contacto entre la gota y las hojas*. Un factor que también tiene influencia sobre la superficie de contacto herbicida-hoja es el microrelieve de la superficie foliar, algo sobre lo cual ya se ha hecho referencia.

Un aspecto importante que cabe resaltar es que la cutícula posee una carga residual negativa, lo que permite que los compuestos catiónicos se adhieran a la cutícula con mayor facilidad que los compuestos aniónicos (Asthon y Crafts, 1973). Esta interacción fisico-eléctrica puede jugar un importante papel en el proceso de adhesión y penetración de algunos compuestos a la cutícula. De hecho, esta característica ha sido aprovechada por algunos diseñadores de equipos para la aplicación de plaguicidas, que han probado sistemas que confieran una carga residual positiva a la solución de aspersión, de manera que facilite la adhesión a la planta.

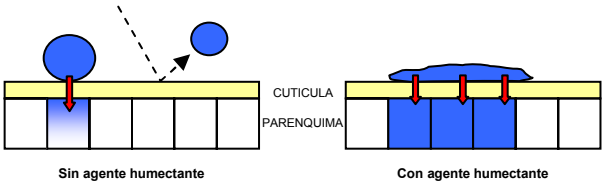

Figura II.10. Efecto del agente humectante (activador de superficie) sobre la forma en que se esparcen las gotas del caldo de aspersión sobre la superficie foliar. Tomado de Ross y Lembi (1999). Adaptado por Anzalone.

Por su parte, *la escorrentía de las gotas en la superficie foliar* es un proceso que es motorizado por la fuerza de gravedad luego que las gotas alcanzan un volumen crítico. Gotas de diámetro superior a 400 µm son mal retenidas por las hojas, no sólo por el aumento de la energía cinética que favorece su escorrentía (Gauvrit, 2001), sino también porque la oscilación que se produce luego del impacto inicial de la gota sobre la hoja puede producir el rebote de la misma, perdiéndose totalmente el contacto gota-hoja. Normalmente un diámetro menor produce una mayor retención de las gotas sobre las hojas, aunque la absorción puede verse favorecida por gotas de mayor tamaño. Por ejemplo, Feng *et al.* (2003) encontraron que, en una aplicación de glifosato sobre hojas de maíz resistente al herbicida, las gotas de menor tamaño eran retenidas en mayor proporción que las de tamaño medio o grande, aunque la absorción y la translocación del producto fue mejor cuando se aplicaron gotas de mayor tamaño.

Gauvrit (2001) indica que el proceso de *evaporación de las gotas desde la superficie foliar* se concreta como la pérdida del agua que se ha utilizado como solvente para esparcir el herbicida sobre las hojas. Esta evaporación puede traer como consecuencia que, dependiendo de las características químicas de la molécula herbicida y su formulación, el compuesto se cristalice sobre la hoja, impidiendo así su penetración. Un ejemplo de este proceso se presenta con el herbicida 2,4-D en su forma de sal: cuando sucede una rápida evaporación de las gotas de la solución herbicida por efecto de las condiciones meteorológicas (alta temperatura, baja humedad atmosférica y/o fuertes vientos) el herbicida puede cristalizar sobre la hoja, impidiéndose así su penetración. Este proceso también favorece la volatilización de los herbicidas desde las hojas.

Por último y como ya se ha mencionado anteriormente, el diámetro de la gota, que estará en función del volumen de aplicación y la presión de

operación del equipo de aspersión, también posee una fuerte influencia sobre el proceso de retención foliar de los herbicidas, ya que de este parámetro dependerá la superficie de contacto entre la gota de herbicida y la hoja, el área cubierta de la hoja y, en gran medida, la posibilidad de volatilización o deriva. Así, gotas de diámetro muy reducido tenedrán a volatilizarse con mayor facilidad o a perderse por deriva.

1.2.2.- Penetración de los herbicidas a las estructuras aéreas de las plantas:

Luego que el herbicida entra en contacto con las diferentes estructuras aéreas que son capaces de absorberlo comienza el proceso de penetración hacia las células internas de los tejidos tratados. La duración de este proceso variará de acuerdo a las características del herbicida, la especie y las condiciones climáticas, pero siempre es cierto que no es un proceso inmediato; es por ello que entre las recomendaciones de uso y manejo de los herbicidas se presenta el tiempo mínimo necesario en el que debe suceder el contacto herbicida-planta para que el producto logre un efecto aceptable. En condiciones de campo uno de las principales causas que reducen este tiempo de contacto entre el herbicida y la planta es la lluvia, ya que si ésta ocurre inmediatamente después de la aplicación del herbicida, "lavará" el producto que ha impregnado a las plantas. Otra causa importante es la volatilización (Rao, 2002).

Los herbicidas ejercen su mecanismo de acción dentro de las células de las plantas, por lo cual deben lograr penetrar a las mismas. En las hojas existen una serie de estructuras que se constituyen como barreras que deben ser superadas por los herbicidas para poder penetrar al citoplasma de las células. Estas barreras son la cutícula, la pared celular y la membrana plasmática. En el caso de los tallos lignificados se agrega una importante barrera, como lo es la corteza. Cada una de las barreras que deben superar los herbicidas para lograr la penetración a la planta a través de los órganos aéreos se detalla a continuación.

a.- Penetración de la cutícula por herbicidas:

La penetración cuticular es el proceso crítico en la absorción de los herbicidas por el follaje, ya que la cutícula es la barrera protectora de las hojas por excelencia. La cutícula es una capa continua sobre las hojas con un espesor entre 0,1 y 10 µm. Es sintetizada por las células epidérmicas y depositada sobre las paredes celulares externas. Su función no se restringe sólo a la protección física de la hoja, sino que cumple importantes funciones como regulador del proceso de reabsorción y transpiración del agua y varios solutos, protección contra rayos ultravioletas e inclusive, se ha demostrado que puede jugar un importante papel durante la delimitación de los órganos en el desarrollo de la planta (Sieber *et al.*, 2000, citados por Lequeu *et al.*, 2003).

La cutícula posee una estructura que está relacionada íntimamente con sus características funcionales. Esta capa protectora de las plantas esta formada por tres componentes básicos:

- *Ceras:* Las ceras se constituyen de largas cadenas carbonadas de entre 20 y 44 carbonos, que pueden poseer algunos grupos funcionales asociados. Su composición y disposición puede variar mucho entre especies e inclusive entre individuos, influenciadas por el ambiente o por factores propios de las plantas. Las ceras pueden encontrarse externamente (ceras epicuticulares) o embebidas en la cutina. Las ceras epicuticulares constituyen la principal barrera para la penetración de herbicidas y otros plaguicidas a las plantas, primordialmente por su característica no polar e hidrofóbica (Papa y Leguizamón, 2004). Esta barrera es particularmente difícil de superar para los herbicidas hidrofílicos; por ejemplo Tan y Crabtree (1992) encontraron que la absorción foliar de 2,4-D (un herbicida altamente soluble en agua) por la hojas de manzano aumentó 2,5 veces cuando se retiraron las ceras epicuticulares de las hojas.
- *Cutina:* Formada por cadenas carbonadas más cortas que las ceras. Es una red de derivados hidróxidos y epóxidos de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos interestratificados (Lequeu *et al.*, 2003). La cutina es una capa de naturaleza lipofílica, pero es más compatible con el agua que las ceras, ya que los grupos carboxilos e hidroxilos que presentan las cadenas le confieren esa cualidad. Algunos investigadores le comparan con una esponja porosa, la cual es capaz de absorber agua a pesar de que sus componentes son hidrofóbicos. Esta relativa afinidad por el agua se debe a los sitios polares que se presentan en su estructura; de allí que esta capa pueda absorber humedad y pueda permitir el paso de herbicidas hidrosolubles (Gauvrit, 2001).
- *Pectina:* Son "cordones" de polisacáridos ricos en ácido galacturónico localizados en la interfase cutina-pared celular o embebidos en la cutina. Es el componente más hidrofílico de la cutícula, por lo cual puede funcionar como "puente" para la penetración de la cutina por herbicidas hidrofílicos.

En la Figura II.11 se presenta un esquema de la conformación estructural de la cutícula foliar y su disposición sobre las células epidérmicas.

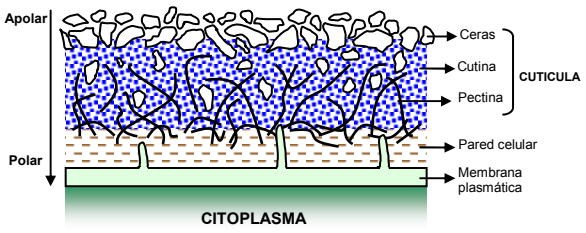

Figura II.11. Conformación estructural de la cutícula foliar. Tomado de Ross y Lembi (1999) y García y Fernández (1991). Adaptado por Anzalone.

La composición de la cutícula foliar produce que los herbicidas deban penetrarla a través de diferentes

rutas, dependiendo de la polaridad de dichos compuestos. De forma general los plaguicidas pueden seguir dos rutas para penetrar la cutícula: la ruta *lipofílica*, para los compuestos no polares y la ruta *hidrofílica*, para los compuestos polares y/o no iónicos.

La cutícula tiene la capacidad de hidratarse hasta alcanzar entre un 30% de su peso total, lo que forma una fase acuosa continua por donde los herbicidas polares pueden atravesarla. Esta fase acuosa constituye la ruta hidrofílica de penetración de la cutícula quedará establecida dependiendo del estado hídrico de la planta y las condiciones climáticas (Ashton y Crafts, 1973).

El tipo y la topografía de las ceras epicuticulares también tiene una marcada influencia en la entrada de herbicidas por la vía foliar; por ejemplo, muchas de las plantas dicotiledóneas poseen ceras epicuticulares muy irregulares, lo que permite que la cutícula se hidrate con facilidad. Por el contrario, muchas gramíneas están cubiertas por cutículas con ceras epicuticulares cristalinas, lo que hace que sean más difíciles de hidratar (Monaco *et al*., 2002).

Los herbicidas que utilizan la ruta lipofílica penetran fácilmente la cutícula, ya que se difunden en las ceras y la matriz de cutina, componentes mayoritarios de la estructura de la cutícula. Estos herbicidas penetran la cutícula a una velocidad marcadamente mayor que los herbicidas que utilizan la ruta hidrofílica (Gauvrit, 1996).

Estas vías de penetración no son exclusivas ni excluyentes, ya que existen compuestos que pueden penetrar por ambas rutas, debido a su condición de compuestos de polaridad intermedia. En este caso, los herbicidas pueden utilizar la vía lipofílica para superar las ceras epicuticulares, para luego pasar a la ruta hidrofílica y superar la capa de cutina y pectina. Este tipo de compuestos son los ideales para ser aplicados sobre el follaje, ya que compuestos totalmente apolares pueden quedar acumulados en las ceras epicuticulares de la cutícula, incapacitados de moverse desde allí, mientras que un compuesto totalmente polar tendrá mucha dificultad de penetrar la capa de ceras epicuticulares, donde el contenido de agua puede ser nulo. En el proceso de penetración de la cutícula por los herbicidas también juega un importante papel el solvente o vehículo en el que se encuentre formulado el herbicida (Asthon y Crafts, 1973; Monaco *et al.*, 2002).

Independientemente de la ruta que tome un herbicida para penetrar la cutícula, este proceso de penetración se realiza por difusión, un proceso pasivo. La velocidad de penetración es, por tanto, directamente proporcional al gradiente de concentración del herbicida entre la superficie de la hoja y las capas más profundas de la cutícula. Este gradiente de concentración depende de varios factores, pero probablemente el más fácil de controlar desde el punto de vista de manejo agronómico de los herbicidas es la concentración del herbicida en la superficie de la hoja. Esta concentración es manipulable de acuerdo al volumen de descarga de la mezcla o caldo de aspersión que se decida aplicar; así, a una dosis constante de herbicida por área, un volumen de aspersión alto implica una baja concentración del herbicida en las gotas de aspersión, que producirá un gradiente de concentración bajo, mientras que, por el contrario, un bajo volumen de aspersión, donde la mezcla estará más concentrada, implica que existirá un mayor gradiente de concentración entre la superficie de la hoja y el interior de la cutícula. Sin embargo, la influencia del volumen de aplicación (y en consecuencia la concentración del herbicida en el caldo de aspersión) no siempre es consistente para los diferentes herbicidas y bajo diferentes condiciones climáticas (Monaco *et al.* 2002). También es necesario considerar que el disminuir en exceso el volumen de aspersión implica una disminución en el tamaño de la gota o sacrificar la buena distribución de las mismas, consecuencias que pueden afectar de forma importante el desempeño y la eficacia del herbicida.

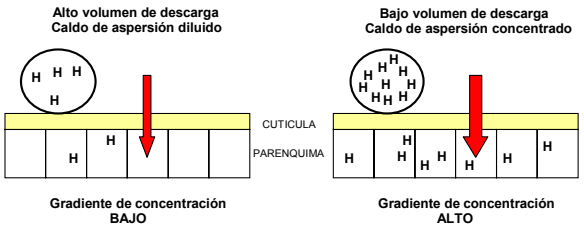

Figura II.12. Efecto la concentración de herbicida en el caldo de aspersión sobre la penetración foliar de herbicidas.

La cutícula posee una carga eléctrica total negativa a los niveles de pH normales (Ashton y Crafts, 1973). Esta condición puede tener efecto sobre la adherencia de los compuestos a esa capa protectora de las plantas. De hecho, tal como se comentó, se han desarrollado asperjadoras de plaguicidas que confieren una carga positiva al caldo de aspersión, de manera de favorecer la adherencia de las gotas de menor tamaño sobre la hoja por un efecto físico-eléctrico.

Por otra parte, el espesor de la cutícula es otro de los factores que definen la rapidez con que un herbicida es capaz de penetrar esta barrera. Una cutícula gruesa produce que el movimiento de los herbicidas a través de ella tarde más tiempo en completarse que en una cutícula con menor espesor. Normalmente las plantas más viejas poseen cutículas foliares más gruesas, por lo que siempre es recomendable aplicar herbicidas sobre plantas jóvenes, donde la penetración de la cutícula será más eficiente, debido al poco desarrollo de la misma (Kogan y Bayer, 1996). De similar forma, plantas de ambientes secos o en zonas con vientos fuertes poseen cutículas más gruesas al comprarlas con las de plantas de ambientes menos extremos. Por ejemplo, Levene y Owen (1995) encontraron que plantas de *Xanthium strumarium* L. y *Abutilon theophrasti* Medik. producen mayor cantidad de ceras epicuticulares cuando crecen en condiciones de estrés hídrico (humedad deficitaria)

que cuando lo hacen en condiciones apropiadas de humedad.

Por último es importante recalcar que el estado hídrico de la planta tiene una importante influencia en la penetración de la cutícula por los herbicidas. En este sentido, Kogan y Bayer (1996) comprobaron que existe una alta correlación entre el potencial hídrico de las hojas de *Glycine max* L. y la absorción foliar del herbicida 2,4-D, reportando una disminución en la penetración del herbicida de hasta un 40% cuando el potencia hídrico de las hojas disminuía de -0,55 a -1,21 MPa. Una planta poco hidratada presentará una cutícula con bajo porcentaje de humedad en la cutina y pectina, lo que dificulta la entrada de los herbicidas por la vía hidrofílica.

b.- Penetración de la pared celular por herbicidas:

Luego de penetrar la cutícula los herbicidas encontrarán una segunda barrera en su camino hacia las células foliares: la pared celular. Esta estructura de espesor variable (entre 200 y 400 nm) está formada básicamente por tres polímeros de polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectina. Estos compuestos se ordenan como capas de fibrillas estratificadas, que le confiere a la pared celular muchas características, entre las que destaca la resistencia mecánica. Morfológicamente la pared celular se presenta como una bicapa: la pared primaria, formada por celulosa y pectina y la pared secundaria, formada de celulosa y hemicelulosa. La pared primaria es más compacta que la pared secundaria y en las células epidérmicas de las hojas está íntimamente ligada a la pectina y cutina de la cutícula (Heldt, 1997). En la pared celular también se observan pequeños "canales" cilíndricos que atraviesan la pared celular extendiéndose desde la parte más interna de la cutícula hasta la membrana celular, a los que se les denomina *ectodesmos* (García y Fernández, 1991). Estos ectodesmos no se presentan distribuidos uniformemente y suelen ser más abundantes en los alrededores de las células guardas de los estomas y en las bases de los tricomas.

Normalmente los espacios entre las fibrillas que conforman la pared celular se encuentran llenos de agua, lo que permite a los herbicidas polares atravesar con facilidad esta barrera. Los herbicidas no polares pueden utilizar los ectodesmos como vía para atravesar la pared celular. La naturaleza general de la pared celular es hidrofílica (García y Fernández, 1991).

El proceso de penetración de la pared celular es un proceso de difusión pasiva, donde, al igual que en el caso de la penetración de la cutícula, el gradiente de concentración es el motor que impulsa el movimiento.

c.- Penetración de la membrana plasmática por herbicidas:

La penetración de la membrana plasmática por herbicidas puede completarse por la vía de la difusión o por procesos activos, tal como sucede con la entrada de otros compuestos. La naturaleza de la membrana celular es lipofílica, debido a el predominio en su composición de fosfolípidos organizados en doble capa; esta característica permite a los herbicidas apolares o medianamente polares atravesar con facilidad la membrana por procesos de difusión pasiva, gracias a su afinidad con los fosfolípidos. El proceso de penetración de la membrana plasmática por este tipo de herbicidas puede ser comparado con el proceso de penetración de la cutícula, aunque aquí la velocidad de penetración es mucho mayor, ya que la membrana celular es de poco espesor (unos 9 nm). Este proceso de difusión es reversible y es el gradiente de concentración el que define la dirección en que se moverá el herbicida.

Por otra parte, los herbicidas hidrofílicos (moléculas polares o iónicas) atraviesan la membrana celular por un proceso de transporte activo con gasto de energía en forma de ATP ó NADH. El movimiento transmembrana se completa a través de proteínas transportadoras que atraviesan la membrana celular desde el citoplasma hasta su parte externa. Este proceso es irreversible e independiente del gradiente de concentración del herbicida. Aún no se conoce con certeza los mecanismos para el transporte activo de herbicidas al interior de la célula; sólo se han documentado de manera suficiente y en algunas especies para los casos de los herbicidas fenóxidos, el paraquat y el glifosato (Dinelli y Catizone, 2001; Monaco *et al.*, 2002). El paraquat atraviesa la membrana plasmática sobre el transportador prutescina, mientras que los herbicidas auxínicos utilizan los transportadores de auxinas y el glifosato el transportador de fosfato (Monaco *et al.*, 2002); además se ha identificado el papel del calcio y el hierro en el acoplamiento de las reacciones de la bomba redox, la absorción de hierro y la absorción celular de glifosato en plantas como *Catharanthus roseus* L. G. (Anthelme y Marigo, 1998). Sin embargo, si bien se han propuesto diferentes teorías sobre como funciona el sistema de transporte de herbicidas a través de la membrana (Sterling, 1994), los mecanismos de estímulo para la activación de los procesos de transporte activo son poco conocidos para la mayoría de los herbicidas.

La penetración de los herbicidas por los estomas en las hojas es un proceso que sucede, aunque su importancia esta cuestionada por algunos investigadores (Papa y Leguizamón, 2004). Entre las razones que se plantean para restar importancia a la entrada de los herbicidas por los estomas se encuentran: (1) en la mayoría de las plantas los estomas se encuentran abundantemente en la cara inferior de la hoja, donde la gota de la mezcla herbicida llega en poca cantidad o permanece por corto período de tiempo; (2) la proporción de área foliar que esta cubierta por los estomas es pequeña, no llegando a ser mayor del 2% en la mayoría de las plantas y (3) el poro estomático es de un diámetro mínimo (menos de 5 μm) comparado con el promedio del tamaño de las gotas de un herbicida aplicado en forma correcta (de 200 a 300 μm), por lo que resulta imposible la entrada del herbicida por dicho poro, ya que la tensión

superficial del agua en la gota y la forma del poro estomático impiden que alguna cantidad de agua pueda penetrar hacia la cavidad estomática. Sin embargo, y a pesar de estos cuestionamientos, la penetración de herbicidas por la vía estomática es posible a través de las células guardas del estoma. Debido a su función de controladoras de la apertura del poro estomático, la cual realizan mediante la modificación de su tamaño por la rápida entrada y salida de agua, estas células de gran tamaño tienen una cutícula y pared celular muy delgadas, con el fin de lograr una alta elasticidad. Esta particular condición pueden convertir a las células guardas de los estomas en una vía preferencial para la entrada de herbicidas a la planta (Dinelli y Catizone, 2001), aunque, como se ha comentado, su importancia sea limitada. En la práctica la relación entre la penetración foliar de los herbicidas y los estomas estará más ligada al proceso de transpiración y el estado hídrico de las plantas, que son controlados en parte por los estomas, que a la entrada directa del herbicida por esas estructuras.

El grado de absorción de herbicidas puede definir el nivel de susceptibilidad a un herbicida entre especies cultivadas o malezas. Por ejemplo, entre las malezas *Xanthium strumarium* L., *Ipomoea purpurea* L. Roth y *Commelina difusa* Burm. existe un grado de susceptibilidad diferenciado al herbicida glufosinato, que se ha denominado como altamente susceptible para la primera especie, medianamente susceptible para la segunda y ligeramente susceptible para el tercer caso. Los estudios realizados por Neto *et al.* (2000) indican que *Xanthium strumarium* L. absorbe tres veces más glufosinato que *Ipomoea purpurea* L. Roth y alrededor de 6 veces más que *Commelina diffusa* Burm., lo que sugiere que el grado de absorción del herbicida es un factor clave en las diferencias en la susceptibilidad observada entre éstas especies.

Por último es importante destacar que en algunas especies la *absorción y penetración de los herbicidas por el tallo* puede constituir una importante vía de entrada de estos compuestos a las plantas, en especial en aquellos tallos herbáceos sin desarrollo de corteza suberificada. Al comparar el área que representa el tallo para la interacción herbicida-planta con el área foliar, es evidente que éste posee menor importancia, más aún cuando en la mayoría de los casos esta estructura se presenta perpendicular al suelo, lo que limita ampliamente el tiempo de retención del herbicida, ya que ocurrie una rápida escorrentía de las gotas que llegan al tallo.

El proceso de penetración de los herbicidas en el tallo es similar al proceso descrito para las hojas. El estado de desarrollo del tallo es un importante factor que tiene influencia en la absorción de herbicidas por esta estructura, ya que tallos jóvenes que aún no han comenzado el crecimiento secundario, no presentan peridermis, una importante barrera para la entrada de herbicidas a las plantas (Klingman y Ashton, 1980). En tallos adultos las lenticelas pueden funcionar como puertas de entrada de herbicidas al tallo, pero este proceso suele ser limitado y depende de la abundancia de estas estructuras en los tallos. En plantas jóvenes la penetración de herbicidas por el tallo puede ser importante, en especial en plantas dicotiledóneas. En las plantas con tallos herbáceos la penetración de herbicidas por esta vía puede representar una importante vía de penetración, inclusive para plantas adultas.

Se han desarrollado técnicas de aplicación de herbicidas sobre tallos que permiten sortear la corteza suberificada de los mismos. Una de dichas técnicas es la realización de heridas o anillos en el tallo, para posteriormente aplicar el herbicida sobre los tejidos expuestos; otra técnica es la inyección del herbicida al tallo, utilizando para ello inyectadoras diseñadas para dicho fin. Estas técnicas son utilizadas para la eliminación de árboles y arbustos. La aplicación de herbicidas sobre tallos cortados (tocones) es efectiva en algunos casos para evitar el rebrote de ramas (Howard y Parker, 1995).

Existe un grupo de herbicidas puede ser absorbido tanto por las estructuras aéreas como por las raíces de las plantas. Cuando ciertos herbicidas aplicados a partes aéreas de la planta son arrastrados hasta el suelo pueden ser absorbidos por la raíces (Sicbaldi *et al.*, 1997). Algunos ejemplos lo constituyen herbicidas como el dalapon, asulam setoxidim, trakolxidim, imazaquin, oxadiazon, 2,4-D, fomesafen, mesotrione, gran parte de los herbicidas sulfonilueras y algunos de los ariloxifenoxipropianatos (Rao, 2002; Cartwrigth, 2001). A pesar de esta condición, en la mayoría de los casos una de las vías de absorción (foliar o raíces) siempre suele ser más eficiente que otra.

2.- Translocación de herbicidas en plantas:

Posterior a la entrada de los herbicidas a las plantas por las raíces o por las partes aéreas, estos alcanzan las células del interior del tejido vegetal y, en algunos casos, pueden penetrar a los tejidos de transporte de sustancias en las plantas, lo que les permite moverse dentro de ellas.

Las vías de movilización de líquidos y solutos en las plantas están conformadas por dos sistemas, un sistema apoplástico y un sistema simplástico. El sistema apoplástico está constituido básicamente por el xilema, un sistema de conductos (vasos y traqueidas) formado por tejido muerto, lo cual quiere decir que no posee células vivas en su conformación básica. El sistema apoplástico también incluye los espacios intercelulares y las paredes celulares. La función principal del sistema apoplástico es el transporte de agua y diferentes solutos absorbidos por las raíces desde el suelo hasta los diferentes tejidos de la planta. Por otra parte, el sistema simplástico está representado por el floema, un tejido vivo conformado por tubos cribosos y células acompañantes que tiene como función el transporte de las sustancias elaboradas en las partes aéreas de las plantas (hojas principalmente) y su distribución hasta los centros de consumo. Las sustancias transportadas

por este sistema pueden pasar con relativa facilidad de célula a célula en los tubos cribosos gracias a la presencia de gran cantidad de *plasmodesmos* en ellos. Los plasmodesmos son pequeños conductos que atraviesan las paredes celulares de las células, poniendo en contacto directo las membranas celulares de células vecinas (Asthon y Crafts, 1973; Anderson, 1983; García y Fernández, 1991).

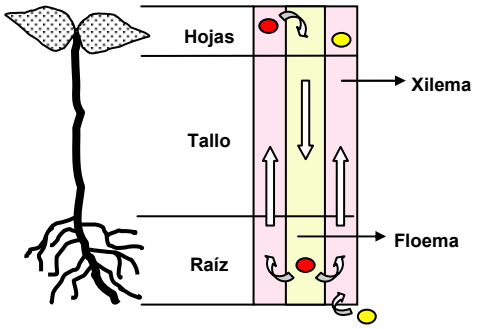

Figura II.13. Modelo simplificado del sistema de transporte de sustancias en las plantas. Tomado de Kleier *et al.* (1998). Adaptado por Anzalone.

Si bien los herbicidas pueden entrar a uno o ambos sistemas de transporte de las plantas, todos ellos ejercen su mecanismo de acción en el protoplasma vivo de las células, por lo que siempre deberán penetrar al interior de las células para ser efectivos, es decir, siempre deberán entrar al sistema simplástico.

Los herbicidas tendrán preferencia de moverse por uno u otro sistema de acuerdo a las características físico-químicas de sus moléculas. Es posible estimar la vía de movilización preferente de un herbicida de acuerdo a los valores de pK_a ó K_{WO} que posea su molécula. Estos valores, que expresan la capacidad de ionización en relación al pH del medio y la afinidad por los lípidos (y a la membrana celular) respectivamente, son factores que afectan en gran medida el proceso de translocación de los herbicidas. Por ejemplo, un herbicida con elevado valor de K_{WO} será poco móvil, ya que tenderá a quedarse absorbido a las membranas celulares (Merotto *et al.*, 2001).

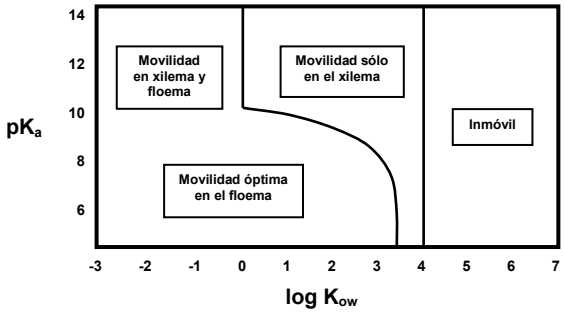

Figura II.14. Relación del pK_a y el log K_{ow} con la vía preferencial de movilización de herbicidas en las plantas. Tomado de Merotto *et al.* (2001). Adaptado por Anzalone.

Todos los herbicidas poseen cierta capacidad de movimiento dentro de las plantas, pero aquellos que lo hacen en distancias muy cortas son llamados herbicidas de contacto o no translocables, ya que el daño que producen se expresa en un punto muy cercano al sitio donde entran en contacto con las plantas. Estos herbicidas pueden tomar vías de movilización a muy cortas distancias, ya sea sólo de célula a célula o inclusive dentro de una misma célula, a través de la penetración de las membranas de los organelos internos de la célula (Gauvrit, 1996).

Los herbicidas denominados sistémicos o translocables tienen la capacidad de entrar en los sistemas de movimiento de sustancias a "grandes distancias", lo que produce que se puedan mover desde las raíces hasta las hojas o, en sentido contrario, desde las hojas a las raíces. Por supuesto, estos herbicidas también tienen la capacidad de moverse a cortas distancias, lo que permite que se distribuyan por todo el tejido.

Cuadro II.1. Capacidad de translocación de herbicidas dentro de las plantas de acuerdo a la vía de movilización.

Vía	Corta Distancia	Larga Distancia
Apoplasto	Pared celular y espacios intercelulares	Conductos del xilema (vasos y traqueidas)
Simplasto	Citoplasma, vía plasmodesmos	Conductos del floema (tubos cribosos y células acompañantes). Trampa iónica.
Intracelular	Dentro de la célula	
Membranas	Plasmalema y organelos de las membrana	

2.1.- Herbicidas con translocación preferencial por el xilema:

La principal "fuerza motriz" del movimiento del agua y los solutos disueltos en ella a través del xilema es la transpiración. La energía que genera la diferencia de potencial hídrico entre las hojas y las raíces produce un movimiento por flujo de masas del agua hacia las hojas. Otro mecanismo que produce un flujo de agua a través del xilema es la presión radical; sin embargo, este mecanismo posee una importancia reducida en el movimiento de los herbicidas dentro de las plantas (Monaco *et al.*, 2002).

Los herbicidas que se absorben por las raíces y se mueven por el xilema siguen el mismo patrón de movimiento que el agua movilizada por el proceso de transpiración, por lo que su translocación se ve afectada por los mismos factores que afectan dicho movimiento. Así, una planta con estrés hídrico, ya sea por falta o por exceso de agua, presentará un movimiento limitado del agua en el xilema, y por supuesto, una limitación en el movimiento de los herbicidas de raíces a hojas.

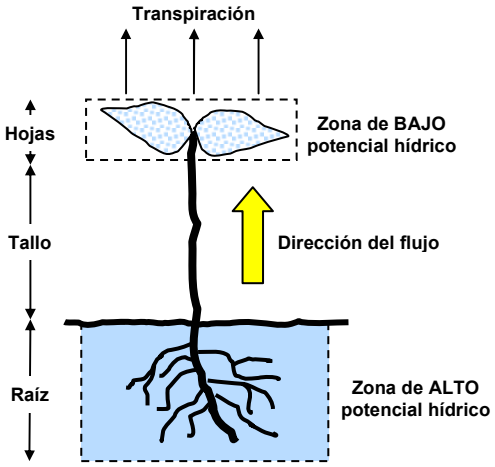

Figura II.15. Movimiento de agua y solutos desde la raíz a las hojas por transpiración. Basado en Monaco *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

Los patrones generales de translocación de herbicidas en el xilema están profundamente determinados por la afinidad de estos compuestos por los lípidos. Los compuestos no polares son pocos solubles en agua, lo que dificulta su solubilización en el contenido del xilema. A medida que los herbicidas sean más lipofílicos será menor y más lenta la entrada al xilema, por lo cual sucederá menor translocación. La mayor translocación en el xilema es alcanzada por compuestos medianamente lipofílicos y no iónicos (Sicbaldi *et al.*, 1997; Cartwright, 2001), ya que la afinidad por los lípidos les permiten entrar con facilidad al xilema atravesando la membrana celular de las células de la endodermis en la raíz, y el cierto grado de polaridad (pero no iónicos) les permite solubilizarse con facilidad en el contenido del xilema.

Los herbicidas que se mueven preferentemente por el xilema se acumulan en las zonas donde el proceso de evapotranspiración es más intenso, como son las hojas. La mayoría de estos herbicidas son de aplicación al suelo; sin embargo, algunos de ellos tienen actividad herbicida cuando son aplicados sobre el follaje. Casos como los derivados de ureas y algunas triazinas confirman la actividad foliar de compuestos que típicamente se mueven por el xilema, pero en estos casos la translocación de estos herbicidas es baja, actuando como herbicidas de contacto (Papa y Leguizamón, 2004).

2.2.- Herbicidas con translocación preferencial por el floema:

Al igual que en el caso del agua y solutos en el xilema, los productos elaborados a partir de la fotosíntesis (fotosintatos) se mueven dentro de las plantas desde los sitios de mayor potencial hasta los sitios de menor potencial. Este fenómeno se explica a través de la teoría de fuente-sumidero. Esta teoría indica que los fotosintatos se mueven por un efecto de gradiente de potencial desde las zonas donde son producidos, donde el potencial es alto (por ejemplo las hojas no senescentes), hacia las zonas donde se consumen, donde el potencial es bajo, como las raíces y nuevos brotes (Monaco *et al.*, 2002).

La principal fuente de fotosintatos en las plantas en desarrollo lo constituyen las hojas fotosintéticamente activas (hojas desarrolladas) y los sumideros son los meristemas en desarrollo, las raíces, flores y frutos. Normalmente una hoja exporta fotosintatos al punto de consumo más cercano. Las hojas de las partes superiores suelen exportar sustancias hacia los meristemas apicales, mientras que las hojas de la parte media e inferior exportan hacia los meristemas axilares y las raíces (Ross y Lembi, 1999). Los frutos son estructuras que acumulan gran cantidad de herbicidas, ya que son grandes consumidores de fotosintatos; de allí que no se recomiende la aplicación de herbicidas selectivos móviles en una época cercana a la fecha de recolección de la cosecha en frutales. Además, los herbicidas aplicados en fechas cercanas a la cosecha de frutos pueden acumularse sobre los frutos por el proceso de deriva durante la aplicación.

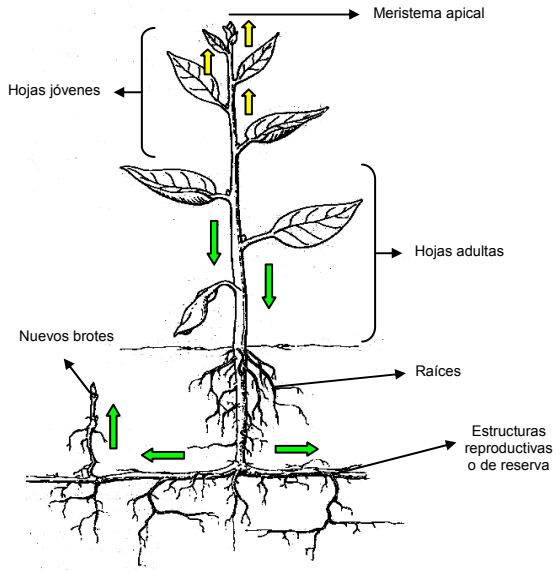

Figura II.16. Modelo del movimiento de fotosintatos en plantas. Tomado de Ross y Lembi (1999). Adaptado por Anzalone.

Es importante señalar que el patrón de movimiento de fotosintatos puede variar de manera importante de acuerdo al estado fenológico en que se encuentren las plantas, de acuerdo a la velocidad de translocación propia de cada especie e incluso a diferencias de tipo anatómicas. Por ejemplo, en *Cyperus rotundus* L. los haces vasculares primarios prominentes y los haces secundarios están presentes en las seis o siete primeras hojas formadas (hojas externas), mientras las hojas formadas posteriormente (hojas internas) tienen haces conductores primarios y secundarios y una fila de haces conductores terciarios más pequeños, debajo de la epidermis adaxial. Tanto los haces primarios y secundarios continúan hacia abajo

mediante filamentos procambiales y se conectan con los haces del bulbo basal; sin embargo, los haces conductores terciarios, que son haces de la lámina únicamente, no tienen conexiones con el bulbo en ninguna etapa (Eames, 1949), lo que impide que las hojas internas puedan exportar fotosintatos hacia los tubérculos de forma tan eficiente como las hojas externas. Este fenómeno se confirmó este realizando aplicaciones de 2,4-D sobre *Cyperus rotundus* L.

Debido a que la principal función del floema es el transporte de fotosintatos en las plantas, los herbicidas que se mueven por el floema siguen el mismo patrón de movimiento que los fotosintatos. Algunos de los factores que afectan el movimiento de fotosintatos en la planta afectan de manera directa la translocación de herbicidas, tal como la edad de la planta o las condiciones ambientales. Por ejemplo, Coetzer *et al.* (2001) reportan que la translocación del glufosinato (herbicida del grupo de los ácidos fosfínicos) en *Amaranthus rudis* Sauer, *Amaranthus palmeri* S. Wats. y *Amaranthus retroflexus* L. fue mayor cuando las malezas crecieron en un ambiente con 90% de humedad relativa que cuando lo hicieron en un ambiente con 35% de humedad, observándose un mayor daño sobre las malezas en la medida que la translocación fue más mayor.

La movilidad de un herbicida en el floema se define como la concentración del compuesto en el floema en un punto profundo de la raíz con respecto a la concentración en el punto donde se aplica. Esta relación es conocida como factor de concentración (C_F). Altos valores de C_F implica una alta movilidad del compuesto. El valor de C_F depende de factores propios de la planta, como la velocidad de transporte de fotosintatos por el floema y el pH del contenido del mismo, y de factores propios de la molécula herbicida, como el pK_a y el K_{OW}; la relación entre estos dos últimos parámetros juega un importante papel en la movilidad de los herbicidas por el floema.

En el contexto del sistema vascular de las plantas, donde el rango de pH varía de 6 en el xilema a 8 en el floema, podemos considerar un compuesto acídico como aquel que posea un pK_a menor a 7; los herbicidas acídicos como sulfonilureas, imidazolinonas o triketonas tenderán a permanecer en forma aniónica dentro del floema y en formas no disociadas en el xilema. Este fenómeno ocurre debido a la diferencia de pH que existe entre el floema y el tejido circundante, lo que induce a que los compuestos acídicos sufran un alto grado de disociación dentro del floema, resultando compuestos con carga negativa. Estos compuestos quedarán "atrapados" dentro del floema, ya que la membrana celular es poco permeable a compuestos cargados eléctricamente (Ross y Lembi, 1999; Monaco *et al.*, 2002); el proceso se conoce como "trampa iónica" y explica porque la mayoría de los herbicidas que se mueven principalmente por el floema son herbicidas acídicos (Kleier *et al.*, 1998). Cuando este proceso sucede los herbicidas pueden moverse por grandes distancias sin salir de los conductos floemáticos.

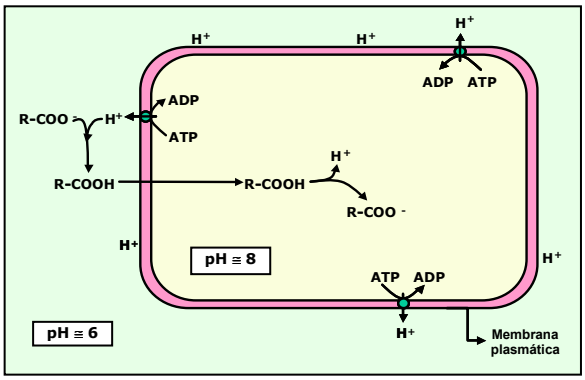

Figura II.17. Mecanismo de funcionamiento de la trampa iónica para herbicidas ácidos débiles. Tomado de Ross y Lembi (1999). Adaptado por Anzalone.

Así, los herbicidas ácidos débiles se mueven con rapidez y facilidad en el floema, mientras los herbicidas básicos no; sin embargo, algunos compuestos no ácidos pueden poseer gran movilidad en el floema si poseen valores de K_{OW} óptimos para desplazarse por este medio. Herbicidas como el diuron no son móviles por el floema debido a la combinación de altos valores de pK_a y K_{OW}. La presencia en la molécula herbicida de sustituyentes ionizables de naturaleza ácida ($pK_a < 6$) asociada a una afinidad por los lípidos intermedia ($0 < \log K_{OW} < 3$), resultan ser los requisitos indispensables para que los herbicidas se transporten a largas distancias por el floema (Kleier *et al.*, 1998).

Una excesiva afinidad de un herbicida por los lípidos ($\log K_{OW} > 4$), lo que se traduce en una alta afinidad por la membrana plasmática, produce un transporte neto del herbicida por el apoplasto. Si bien este herbicida puede encontrarse en el simplasto, la facilidad con que atraviesa la membrana celular produce que este se difunda eventualmente en el apoplasto, y la mayor velocidad del flujo en el apoplasto produce que el movimiento neto del compuesto sea en la dirección del flujo del apoplasto (Dinelli y Catizone, 2001). Este es uno de los procesos que producen que la velocidad de movimiento de los herbicidas en los conductos de transporte de sustancias sea diferente a la velocidad que posee el conducto en sí.

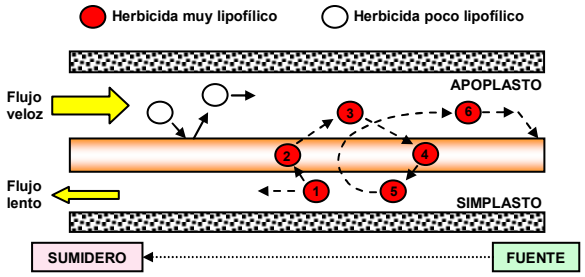

Figura II.18. Transporte de herbicidas con alta afinidad por los lípidos en el apoplasto. Tomado de Dinelli y Catizone (2001). Adaptado por Anzalone.

En la Figura II.19 se presenta un gráfico que puede brindar una idea de la capacidad de movilidad de los herbicidas en el floema en base a la relación de C_F, como una función de pK_a y $logK_{OW}$. Los límites descritos en esta figura deben ser interpretados como referencias teóricas, ya que el movimiento de los herbicidas en las plantas puede verse ampliamente influenciado por otros factores.

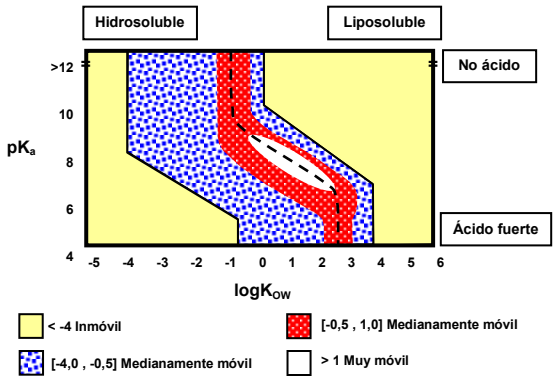

Figura II.19. Mapa de contorno para valores de Cf como función de pK_a y $logK_{OW}$. Para los compuestos acídicos el $LogK_{OW}$ hace referencia de la forma no disociada. Tomado de Kleier *et al.* (1998). Adaptado por Anzalone.

Por último es importante señalar que se ha observado que algunos herbicidas que se mueven por el floema pueden dañar a las células que conforman este sistema, afectando así al propio movimiento del herbicida (Ashton y Crafts, 1973). Otra forma como la acción un herbicida puede afectar su propio movimiento por el floema sucede cuando el herbicida produce una limitación en la formación de fotosintatos. Esta limitación genera una disminución en la velocidad de translocación de estos compuestos, ya que se disminuye el gradiente de potencial entre las fuentes y los sumideros. Esta "autolimitación" del movimiento ha sido observada en herbicidas como el glifosato. Como ejemplo tenemos los estudios realizados por Geiger *et al.* (1999), que indican que la disminución del metabolismo de los compuestos de tres carbonos inducida por la acción del glifosato bajo altas densidades de luz en la remolacha azucarera, es un factor clave en la inhibición de la fotosíntesis y en la translocación del mismo herbicida.

2.3.- Herbicidas que se translocan por el xilema y el floema:

Existen herbicidas que poseen la capacidad de translocarse tanto por el xilema como por el floema, ya que sus características moleculares les confieren esa capacidad. Estos herbicidas se conocen como ambimóviles y su uso y desarrollo es cada vez mayor en la agricultura. Este tipo de herbicidas pueden ser aplicados al suelo o al follaje y poder expresar su capacidad herbicida, ya que, como se comentó, pueden utilizar ambas vías de movilización. Según Rao (2002) dos de los requisitos necesarios para que un herbicida pueda ser ambimóvil es que posea una ácidez media (pK_a entre 2 y 6) y una afinidad media por los lípidos (log K_{OW} entre 0 y 3).

Los procesos de movimiento de los herbicidas en ambos sistemas son similares a los descritos con anterioridad. Los herbicidas ambimóviles que se absorben por las raíces se movilizan a las hojas en la corriente transpiratoria; ya estando allí pueden atravesar las membranas plasmáticas de las células del floema para entrar al sistema apoplástico y movilizarse por éste. Un proceso inverso también es posible.

El grupo químico de las sulfonilureas es el grupo químico de herbicidas que más se ha desarrollado en los últimos años, y una de las principales razones de ello es la capacidad que tienen muchos de los herbicidas de este grupo de poder moverse tanto por el xilema como por el floema (Rao, 2002). Esta característica permite su uso tanto en pre-emergencia como en post-emergencia temprana, una inmensa ventaja para su uso práctico, ya que permite la utilización de estos herbicidas en diferentes etapas de crecimiento de la maleza o el cultivo.

2.4.- Herbicidas de translocación limitada:

Como se comentó al inicio de esta sección, los herbicidas que se translocan a cortas distancias en las plantas son llamados herbicidas de contacto. Probablemente el término más apropiado sea el de "herbicidas de translocación limitada", ya que muchos herbicidas altamente translocables producen daños por contacto, debido a que sus moléculas o las formulaciones que se utilizan son abrasivas a las hojas.

Los herbicidas de translocación limitada pueden ser aplicados al suelo (ej. pendimetalin) o al follaje (ej. paraquat). En ambos casos estos herbicidas deben penetrar hasta el interior del citoplasma para ejercer su mecanismo de acción. La limitada translocación de los herbicidas puede deberse a una serie de causas, que pueden presentarse juntas o no; entre ellas tenemos:

- Un sitio de acción muy cercano al área donde entran en contacto con las plantas, por lo cual tienden a acumularse en dicha zona.
- Una veloz acción fitotóxica, lo que destruye el tejido conductor y con ello las posibilidades de translocación.
- Alta afinidad por los lípidos (log K_{OW} > 4), que produce una fuerte absorción por la membrana citoplasmática, con pocas posibilidades de ser liberados desde allí.
- Baja solubilidad en agua, imposibilitando su disolución en el contenido citoplasmático o el xilema.

Debido a su baja translocabilidad, estos herbicidas deben ser muy bien distribuidos en el campo, ya que sólo controlarán aquellas plantas (o las partes de ella) con las que entren en contacto; esta condición también permite su uso en aplicaciones dirigidas, generando una selectividad posicional. Normalmente estos herbicidas producen su efecto tóxico rápidamente, en especial aquellos que son aplicados sobre el follaje.

Cuadro II.2. Movilidad relativa y vías de translocación primaria para diferentes herbicidas o sus grupos químicos. Tomado de Monaco *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

Buena movilidad		
Apoplasto	*Simplasto*	*Ambos*
Bentazón	Glifosato	Amitrol
Carbamotioatos		Arseniacales
Carbamatos[a]		Asulam
Cloroacetamidas		Clopiralid
Diclobenil		Dicamba
Napropamide		Fosamine
Norflurazon		Imidazolinonas
Pirazon		Piridinas
TCA		Setoxidim
Triazinas		Sulfonliureas
Uracilos		
Ureas		
Movilidad limitada		
Bromoxinil	Oxadiazon	Ariloxifenoxis
Difenzoquat	Fenoxiacéticos	Endotal
Diquat		Naptalam
Etofumesato		Propanil
Fluridona		
Paraquat		
Inmóviles		
	Bensulide	
	DCPA	
	Dinitroanilinas	
	Difeniléteres	

[a]excepto el asulam

Los mecanismos de absorción o translocación diferenciada de herbicidas entre especies pueden ser procesos claves en el establecimiento de la selectividad para algunos herbicidas. Por ejemplo, una absorción y posterior translocación diferenciada del sulfentrazone desde las raíces hasta los puntos de crecimiento ha sido propuesta por Bailey *et al.* (2003) como el principal mecanismo de tolerancia diferenciada entra la papa *Solanum tuberosum* L. y las malezas *Chenopodium album* L. y *Datura stramonium* L. Por su parte, Hoss *et al.* (2003) indican que la respuesta diferenciada de algunas especies de malezas a herbicidas puede ser causada por variación en la translocación de los mismos y reportan que el herbicida glifosato causa un mayor daño que el glufosinato o el imazetapir sobre las especies *Ambrosia trifida* L. e *Ipomoea hederacea* L. en estado adulto debido a su mayor movilidad dentro de éstas plantas.

Para otras especies, la selectividad no parece estar ligada a la absorción y translocación de herbicidas. Por ejemplo, la malezas ciperáceas *Kyllinga brevifolia* Rottb. y *Kyllinga gracillima* Miq. son controladas más eficientemente por el herbicida trifloxisulfuron que por halosulfuron, dos herbicidas del grupo químico de las sulfonilureas; McElroy *et al.* (2004) demostraron que no existen diferencias en la absorción, translocación y el metabolismo de los herbicidas entre ambas especies, por lo que ninguno de estos fenómenos puede explicar la diferencia entre éstas especies en la susceptibilidad ante los herbicidas.

CAPÍTULO III

METABOLISMO DE HERBICIDAS EN PLANTAS

Introducción

El metabolismo de los herbicidas en las plantas es definido como el conjunto de reacciones químicas que sufren los herbicidas luego de su entrada a la planta y que derivan en la modificación de sus características físico-químicas iniciales. Estas reacciones pueden estar mediadas por enzimas o no. La complejidad de las reacciones bioquímicas que se suceden en el metabolismo de las plantas hace del estudio de estos procesos un campo fascinante, en especial por la variedad de dichas reacciones.

De manera general, el metabolismo de compuestos tóxicos en los organismos tiene como función principal disminuir la capacidad tóxica del compuesto y aislarlo o expulsarlo, para así evitar el daño que el mismo pueda causar. A este proceso comúnmente se le denomina "detoxificación". De igual forma, las reacciones metabólicas de los herbicidas en las plantas incluyen procesos que generan la activación de ciertos compuestos inicialmente no tóxicos (llamados "proherbicidas") y su transformación a formas tóxicas (Asthon y Crafts, 1973; Monaco *et al.*, 2002).

El estudio del metabolismo de los herbicidas en las plantas ha permitido comprender el fenómeno de selectividad de los herbicidas, ya que en muchos de los casos se ha demostrado que la propiedad de algunas plantas de soportar la acción de un herbicida está íntimamente relacionada con la capacidad de metabolización del herbicida. Por último es importante resaltar la poderosa herramienta en la que se ha convertido el conocimiento del metabolismo de los herbicidas en las plantas para el desarrollo de cultivos mejorados genéticamente, capaces de ser tolerantes a la acción de herbicidas.

En el siguiente capítulo se detallan los procesos metabólicos más importantes que sufren los herbicidas dentro de las plantas, de manera de brindar conocimientos que permitan profundizar en el estudio de las relaciones herbicida-planta.

1.- Detoxificación de herbicidas en plantas

El proceso general de detoxificación de compuestos electrofílicos en las plantas se completa en tres fases básicas, cada una de ellas mediadas por un grupo de enzimas. En la Fase I o fase de transformación, procesos de hidrólisis catalizados por esterasas o amidasas u oxidaciones catalizadas por enzimas como peroxidasas, lipooxigenasas o el conjunto enzimático citocromo P450 mono-oxigenasa, introducen grupos funcionales en la molécula original, generando metabolitos más polares. Posteriormente, durante la Fase II o fase de conjugación, enzimas como la glucosil tranferasa, malonil transferasa o la glutationa-*S*-transferasa utilizan el grupo funcional introducido en la fase I como punto de "anclaje" para la conjugación de moléculas de glucosa, malonil o glutationa con el metabolito, resultando un compuesto conjugado menos tóxico y más soluble en agua. Por último, en la fase III o fase de conjugación secundaria y compartamentalización, complejos proteicos específicos ubicados en la membrana plasmática y con función dependiente del ATP, reconocen y transfieren los conjugados formados a través de la membrana para su excreción o inmovilización. Tanto en plantas como en animales, estos complejos proteicos, reconocen a los compuestos tóxicos conjugados para su transferencia a través de la membrana; en animales este paso inicia los procesos de excreción del cuerpo por la orina o heces, pero en plantas, al no poseer sistemas tan eficientes de excreción, los metabolitos conjugados son secuestrados en la vacuola (en el caso de ser metabolitos solubles), o son transferidos al apoplasto (si son metabolitos insolubles). A estos últimos procesos se les ha denominado de forma genérica como "excreción por almacenaje" (Marrs, 1996).

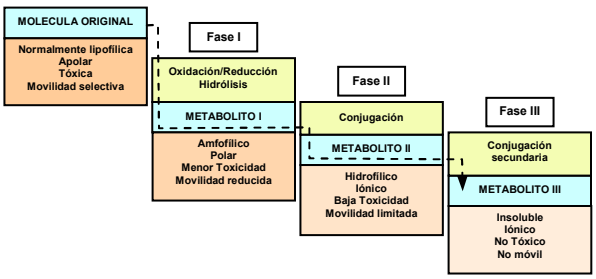

Figura III.1. Fases en el proceso de detoxificación de compuestos tóxicos por las plantas. Se describen los cambios en las características de las moléculas xenobióticas a lo largo del proceso. Basado en Duke (1985).

Algunos autores han descrito procesos de excreción directa (exudación) de compuestos tóxicos por algunas plantas (Vega, 1987; Vicari *et al.*, 2001), pero de forma general es posible afirmar que este sistema es limitado y poco común en el caso de herbicidas. El estudio de los sistemas de almacenaje de compuestos tóxicos conjugados (metabolitos) está acaparando la atención de muchos investigadores, ya que la acumulación de dichos compuestos en las partes comestibles de las plantas puede ser motivo de la desaprobación de su uso, además de ser uno de los parámetros que recomienda la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) debe ser evaluado en los alimentos originados de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas.

Para el caso específico de los herbicidas, existen un conjunto de diversas reacciones que intervienen en la detoxificación de herbicidas en las diferentes fases del proceso, las cuales varían ampliamente entre especies y grupos químicos de herbicidas. Un ejemplo típico de la secuencia de eventos que producen la detoxificación de herbicidas es descrita por Tecle *et al.* (1993) para imazaquin e imazetapir, dos herbicidas del grupo de las imidazolinonas. En este trabajo se caracterizan los metabolitos de estos herbicidas, los cuales en primer lugar sufren una oxidación, posteriormente una conjugación y por último se inmobilizan dentro de las plantas, sugiriéndose por los autores que este proceso

de detoxificación define la selectividad de este herbicida en soya (*Glycine max* L.).

Existen muchas reacciones involucradas en la detoxificación de herbicidas, pero, de forma general, es posible agrupar las reacciones básicas de detoxificación de herbicidas en reacciones de oxidación/reducción, hidrólisis y conjugación (Duke, 1985 citado por Karam, 1998; Catizone y Dinelli, 2001). Estos procesos de degradación pueden suceder sin intervención de enzimas, estar mediados por enzimas específicas que actúan sobre un herbicida en particular (como el caso de la enzima aril acil amidasa que actúa en la degradación del herbicida propanil en plantas de arroz) o por complejos de enzimas no específicas, las cuales actúan sobre un amplio número de moléculas tóxicas, entre ellos los herbicidas.

Cuadro III.1. Principales reacciones metabólicas de detoxificación de herbicidas en plantas y algunos de los grupos químicos afectados. Tomado de Zimdahl (1999).

Reacción metabólica	Grupos químicos afectados
Hidroxilación	Triazinas, ácidos fenóxidos, imidazolinonas
Oxidación	Acidos fenóxidos
Descarboxilación	Acidos benzóicos, ácidos picolínicos
Desaminación	Derivados de urea, dinitroanilinas
Desalquilación	Dinitroanilininas, triazinas
Hidrólisis	Carbamatos, sulfonilureas, imidazolinonas
Conjugación	Acidos benzóicos, imidazolinonas

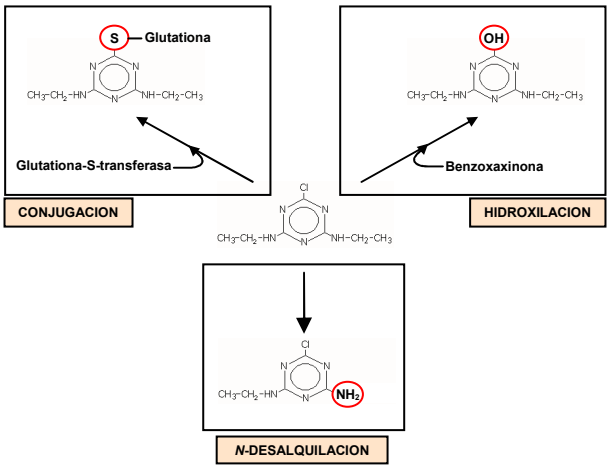

Figura III.2. Diferentes vías de detoxificación de simazina en maíz. Tomado de Dinelli y Catizone (2001). Adaptado por Anzalone.

Es necesario destacar que una misma especie de planta utiliza diferentes rutas metabólicas para la degradación de diferentes compuestos, por lo que el proceso de detoxificación puede, en muchos casos, ser más o menos específico para un herbicida en particular. Un ejemplo de ello se ha observado en arroz, especie que posee un sistema detoxificador de herbicidas complejo y variado, el cual incluye muchas vías de degradación, específicas y no específicas. Las reacciones de detoxificación de herbicidas más comunes en este cultivo son la hidroxilación, la *O* y *N*-desmetilación, reacciones de hidrólisis y la conjugación con glucosa y glutationa; algunas de las enzimas involucradas en estos procesos son diferentes tipos de oxidasas, las P450 mono-oxigenasas, esterasas, acilamidasas, glucosil transferasas y glutationa transferasa (Tecle *et al.*, 1993).

1.1.- Reacciones de oxido-reducción en la detoxificación de herbicidas:

La oxidación es uno de los procesos iniciales en la detoxificación de compuestos tóxicos en las plantas, entre ellos los herbicidas. De forma general la oxidación de un herbicida puede suceder por la remoción de un protón (H^+) o la adición de un oxígeno bajo la forma de ión hidroxilo (OH^-). La oxidación del herbicida puede causar diferentes modificaciones estructurales de la molécula, como la ruptura del enlace covalente (*N*-desalquilación, *O*-desalquilación, hidroxilación bencénica), la sustitución de radicales (deshalogenación, amino-sustitución) o la pérdida de sustituyentes (descarboxilación, desaminación) (Catizone y Dinelli, 2001).

Existen tres tipo de oxidación, dependiendo del punto de la cadena en que se produzca la modificación: alfa (α), beta (β) y omega (ω) oxidación. La β-oxidación es un importante proceso de detoxificación del herbicida 2,4-D, el cual se degrada a 2,4-diclorofenol y CO_2. También este tipo de oxidación es la principal ruta de activación del proherbicida 2,4-DB en algunas especies de malezas (Rao, 2002).

La oxidación de los grupos sulfuros, denominada comúnmente sulfoxidación o *S*-oxidación es común en las metiltiotriazinas (SCH_3-triazinas) y tiocarbamatos, reacción que es catalizada por el citocromo P450.

No se conoce con exactitud cuales de las enzimas que intervienen en los procesos de oxidación son las más importantes en las plantas (Stiborová *et al.*, 2000), ya que variados tipos de enzimas oxidativas como oxigenasas, peroxidasas, lipooxigenasas y el conjunto citocromo P450 pueden estar envueltos en un mismo proceso, o actuar de manera distinta entre especies diferentes. También se pueden producir hidroxilaciones sin la intervención de enzimas, como es el caso de la hidroxilación de las triazinas gracias a la benzoxazinona. Sin embargo, muchos estudios indican que el citocromo P450 es uno de los principales protagonistas en la detoxificación de herbicidas, en especial en especies gramíneas. Este conjunto de enzimas mono-oxigenasas juegan un papel básico en las fases iniciales de la biotransformación de herbicidas en muchas plantas.

1.1.1.- El citocromo P450 y el metabolismo de herbicidas:

El citocromo P450 es un conjunto de enzimas que tienen la capacidad de promover la degradación de muchos herbicidas, funcionando de igual forma como una vía importante de metabolización de muchos otros

compuestos en la célula. En la actualidad se considera el sistema de enzimas más importante en la fase I del metabolismo de compuestos tóxicos en las plantas y su acción junto a la glutationa-*S*-transferasa (que actúa en la fase II de detoxificación), completan los procesos de metabolización de una gran parte de los químicos que entran a la planta desde el exterior. El nombre P450 proviene del espectro de absorción característico de la forma reducida de la enzima, la cual está ligada a una molécula de monóxido de carbono (CO); este complejo enzima reducida-CO posee su máxima absorbancia de luz a los 450 nm y su núcleo hemo (con una molécula de Fe como eje central) le provee su característico comportamiento como citocromo, de allí su nombre P450, donde "P" significa "pigmento". El CO unido a la molécula puede actuar como inhibidor de la enzima y esta inhibición es reversible por la luz (Barrett, 2000).

Las principales enzimas P450 son hemoproteínas que funcionan como mono-oxigenasas; ellas utilizan electrones del NADPH para activar el oxígeno y reaccionar con sustratos hidrofóbicos para producir compuestos más hidrofílicos. La típica reacción de este sistema enzimático implica la incorporación de un átomo de oxígeno molecular (O_2) al sustrato, mientras el otro es reducido a H_2O por el NADPH (Siminszky *et al.*, 1999). Una forma general de la reacción catalizada por el citocromo P450 oxigenasa es la siguiente (Rao, 2002):

$$NADPH + H^+ + O_2 + XH \rightarrow NADP^+ + H_2O + XOH$$

donde *XH* es el sustrato inicial y *XOH* es el sustrato transformado. Este mecanismo es la puerta de entrada de los procesos de detoxificación de agentes tóxicos en plantas, ya que modifican la molécula inicial hacia una forma molecular más polar y soluble. El mecanismo de acción de este grupo de enzimas se resume en la Figura III.3.

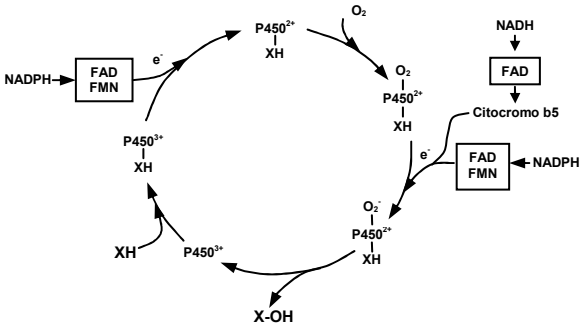

Figura III.3. Mecanismo de reacción para las citocromos P450 monoxigenasas. XH = sustrato inicial; X-OH = sustrato transformado. Tomado de Preston y Mallory-Smith (2001). Adaptado por Anzalone.

Un segundo grupo de enzimas P450 lo constituye el citocromo P450 reductasa, las cuales interviene en el ciclo catalítico del P450. El complejo citocromo P450 reductasa-NADPH reduce al citrocromo P450 transfiriéndole electrones desde el NADPH citosólico; este complejo es una flavoproteína que se encuentra ligada a la membrana plasmática del retículo endoplasmático (Rao, 2002). Las plantas contienen dos o más tipos de P450 reductasas, en contraste con los animales, que sólo poseen un solo tipo. Las P450 en las plantas se ubican en el lado del citoplasma de la membrana del retículo endoplasmático, ancladas por su terminal *N*. En la Figura III.4 se presenta un esquema general del funcionamiento conjunto de las enzimas P450 reductasa y mono-oxigenasa.

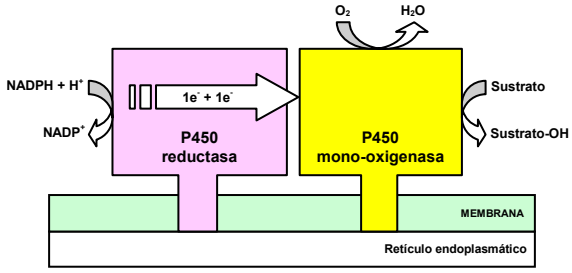

Figura III.4. Esquema general del funcionamiento de las enzimas P450 reductasa y mono-oxigenasa. Basado en Rao (2002). Adaptado por Anzalone.

Las enzimas P450 mono-oxigenasas también intervienen en la biosíntesis de compuestos importantes en la planta como hormonas (Werck-Reichhart *et al.*, 2000), fenilpropanoides, ácidos grasos y terpenoides (Siminszky *et al.*, 1999), a través de un amplio rango de reacciones que incluyen la dimerización, deshidratación e isomerización; además actúan como enzimas desulfurasas en el metabolismo de insecticidas organofosforados (Barret, 1994; Baerg *et al.*, 1996, citados por Barret, 2000). También se ha determinado el importante papel que juegan las enzimas P450 mono-oxigenasas en la biosíntesis de los ácidos cíclicos hidroxámicos DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona) y DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxa-zin-3-ona), importantes compuestos en la defensa química de algunos cereales contra insectos y patógenos (Glawischnig *et al.*, 1999).

Existe una amplia variedad de formas de las enzimas P450. El tamaño de estas enzimas puede variar de 45 a 62 kDa y se presentan grandes diferencias en la secuencias de aminoácidos entre los diferentes tipos de P450; en algunos casos la similitud en la secuencia de aminoácidos puede ser de tan sólo el 16%. Sin embargo, en todos los casos las P450 mantienen una conformación estructural terciaria similar, así como la región de unión hemo y secuencias de aminoácidos comunes. Además de las secuencias homólogas entre las P450, existen un grupo de criterios que nos indican la actividad enzimática común a las diferentes formas de las P450 (Werck-Reichhart *et al.*, 2000):

- Reacciones dependientes del O_2 y el NADPH.
- Inhibición por el monóxido de carbono (CO) y reversión por efecto de la luz.
- Localización de la reacción en el retículo endoplasmático.

- Inhibición por compuestos que afecten la función de la P450 reductasa.

La gran diversidad de formas de las P450 que se originan de la elevada cantidad de genes codificantes de P450 que hasta ahora se conocen en las plantas, hace pensar que las enzimas P450 son la mayor clase de proteínas en plantas. Esta gran cantidad de tipos de enzimas ha hecho necesario la adopción de una nomenclatura especial para su denotación, agrupando tipos de enzimas P450 en familias, subfamilias e isoformas de acuerdo a la similitud entre ellas. En *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. se han identificado y codificado más de 180 genes pertenecientes a la familia de las P450, lo que hace pensar en la posibilidad de que ciertos herbicidas en particular puedan ser metabolizados por formas específicas de P450 (Preston y Mallory-Smith, 2001) y no por formas multifuncionales del complejo enzimático.

Si bien en los herbívoros la función principal de las P450 es la detoxificación de los metabolitos secundarios que se encuentran en plantas, en las plantas estas enzimas se utilizan para sintetizar muchos de dichos compuestos secundarios, entre los que destacan, tal como se ga comentado, los compuestos para la defensa de la planta. La mayoría de las funciones de los genes P450 estudiados hasta ahora es desconocida y Barret (2000) indica que es muy probable que el metabolismo de herbicidas en las plantas se produzca por el ajuste fortuito del herbicida en el sitio activo de las P450 que están envueltas en el metabolismo secundario. De hecho, muchas enzimas P450 que intervienen en rutas de biosíntesis del metabolismo secundario son capaces de utilizar a los herbicidas como sustratos. También se ha observado que un mismo herbicida puede ser metabolizado por diferentes formas de P450, inclusive de familias diferentes, lo que implica que múltiples P450 en una planta pueden ser responsables del metabolismo de un herbicida en particular. De igual manera se ha comprobado que una P450 puede utilizar a múltiples herbicidas como sustrato, ya sean de la misma familia química o no. Toda esta situación produce que la determinación de cual tipo de enzima P450 es responsable en la metabolización de cierto herbicida en particular sea difícil, en especial en experimentos *in vivo*.

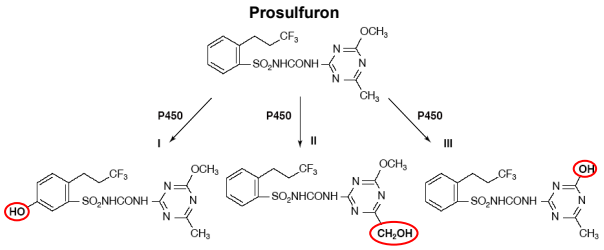

Figura III.5. Diferentes formas de metabolización del prosulfuron por enzimas citocromo P450. Se indican los puntos donde se producen las hidroxilaciones. Tomado de Werck-Reichhart et al. (2000). Adaptado por Anzalone.

En la Figura anterior se presenta un ejemplo de lo complejo que puede ser conocer exactamente el mecanismo de detoxificación de ciertos herbicidas por las P450. El herbicida prosulfuron puede ser transformado a diferentes formas de acuerdo al tipo de P450 que actúe sobre él, pero aún no se conoce si estas diferentes reacciones son catalizadas por una misma o por diferentes isoformas de P450, aunque se poseen evidencias de que el metabolismo de este producto en trigo, maíz y sorgo parece que es llevado a cabo por diferentes formas de P450 (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

Las primeras enzimas P450 involucradas en el metabolismo de herbicidas que fueron aislados de plantas fueron la CYP76B1 y la CYP71A10 de *Helianthus tuberosus* L. y *Glycine max* L. respectivamente. Ambas enzimas metabolizan herbicidas fenilureas (no otra clase de herbicidas), presentándose diferencias en las regiones específicas para los sustratos, siendo la CYP76B1 la más activa. Posteriormente, y utilizando un método similar de inductibilidad por herbicidas (en este caso 2,4-D), las enzimas CYP81B2 y CYP71A11 que metabolizan clorotoluron fueron aislados de plantas de tabaco (Morant *et al.*, 2003). En los reportes hechos por Siminszky *et al.* (1999) un aumento en la expresión de CYP71A10 en tabaco aumentó la capacidad de las plantas de metabolizar los herbicidas fluometuron, linuron, diuron y clorotoluron (todos del grupo de las fenilureas), aunque sólo fue posible conferir niveles de tolerancia aceptables a linuron y clorotoluron. En la Figura III.6 se observa que la acción de la enzima P450 sobre la molécula de los herbicidas linuron y clorotoluron puede suceder en más de un punto, lo que probablemente contribuya en la mayor efectividad de detoxificación de estos compuestos por la soya.

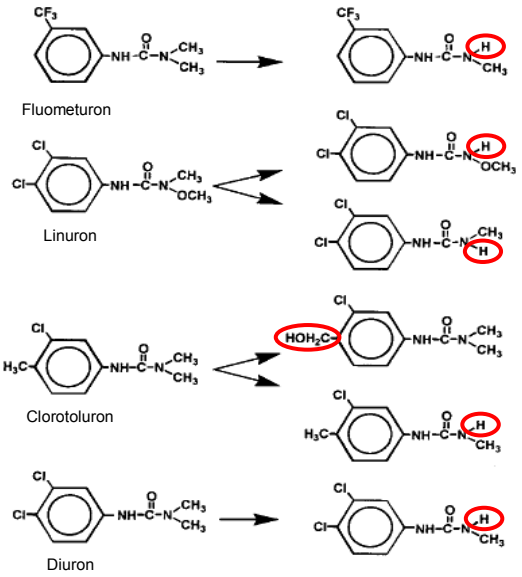

Figura III.6. Estructuras químicas de los herbicidas fluometuron, linuron, clortoluron y diuron y sus metabolitos detectados en ensayos utilizando microsomas con enzimas P450 (CYP71A10) de soya (*Glycine max* L.). Tomado de Siminszky *et al.* (1999). Adaptado por Anzalone.

Las experiencias obtenidas de la expresión de diferentes genes codificadores de P450 y su relación con la tolerancia de plantas a herbicidas han promovido la búsqueda de genes que codifiquen enzimas P450 con alta capacidad de detoxificación de herbicidas y otros compuestos tóxicos en diferentes organismos, obteniéndose así bases de datos sobre estos genes y enzimas P450, extendiendo las posibilidades de uso de esta información para la inducción de la síntesis de compuestos para la protección en plantas, fitorremediación, farmacología, etc.

1.1.2.- El citocromo P450 y la selectividad de herbicidas:

Algunas de los tipos de enzimas P450 se encuentran en muchas plantas y cumplen funciones similares entre sí; sin embargo, está claro que la mayoría de las P450 presentes en una planta específica esta envuelta en el metabolismo de esa especie en particular, lo que diferencia las especies en la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos. Esta condición es particularmente importante en el metabolismo de herbicidas, ya que existen evidencias de que la actividad de metabolización diferenciada de herbicidas por las enzimas P450 puede producir que algunos cultivos sean más tolerantes que otros cultivos o especies malezas a ciertos herbicidas en particular (Siminszky *et al.*, 1999). Esto quiere decir que de la acción de las enzimas P450 puede quedar definida la *selectividad* del herbicida entre especies.

La mayoría de las reacciones de detoxificación de herbicidas que están mediadas por las P450 suceden en herbicidas donde las dosis de aplicación son bajas o muy bajas ($g \cdot ha^{-1}$), ya que para los herbicidas aplicados en altas dosis ($kg \cdot ha^{-1}$) el mecanismo típico de detoxificación se produce a través de la glutationa-*S*-transferasa o procesos de degradación química. Debido a que la importancia de la actuación de las enzimas P450 sobre la detoxificación de compuestos tóxicos sea particularmente relevante sólo para aquellos aplicados a bajas dosis, constituye un obstáculo para la caracterización de su acción sobre los herbicidas y ha producido que el avance en esta área sea relativamente lento (Morant *et al.*, 2003).

Los metabolitos de la detoxificación comunes a una gran parte de los herbicidas son los compuestos aril o alquil hidroxilados y *N*-, *S*- u *O*- dealquilado y sus conjugados con glucosa (Werck-Reichhart *et al.*, 2000). La acción general de la P450 sobre los herbicidas comienza por la formación de un metabolito hidroxilado de la molécula original. En la desmetilación y desalquilación de herbicidas, el mecanismo de hidroxilación antes descrito es seguido de una eliminación del grupo metil hidroxilado (alquil) como aldehido. En muchos casos luego de la monoxigenación el metabolito obtenido se conjuga con moléculas hidrosolubles como la glucosa (Okhawa *et al.*, 1999) o la glutationa, proceso que sucede durante la fase II de detoxificación.

El herbicida clorotoluron (feniluera) permite observar un ejemplo que ilustra como la acción de las P450 define la selectividad de herbicidas en el control de ciertas especies. La detoxificación del clorotoluron se concreta por vía de la hidroxilación del anillo metil o la di-*N*-demetilación; en *Alopecurus myosuroides* Huds., una especie susceptible a este herbicida; el principal metabolito que se forma es el compuesto mono-*N*-demetilado del clorotoluron, el cual posee una toxicidad asociada a su vida media mayor a 24 horas. En contraste, en la especie tolerante *Veronica persica* Poir. el herbicida posee una vida media de sólo 6 horas y es rápidamente convertido al metabolito di-*N*-demetilado del producto, que no posee capacidad fitotóxica (Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Si bien en el caso de *Alopecurus myosuroides* Huds. las P450 transforman el herbicida, lo hacen de forma lenta y el metabolito que se produce aún sigue siendo tóxico para la planta, mientras que en *Veronica persica* Poir. la detoxificación es mucha más rápida y se obtiene como producto un metabolito no fitotóxico.

Otra forma en la cual las enzimas P450 intervienen en la selectividad de herbicidas es a través del uso de productos inhibidores de las P450 o productos que estimulen su acción. Algunos de los inhibidores de las P450 son utilizados como sinergistas de herbicidas y los compuestos que estimulan la acción de estas enzimas son desarrollados como antídotos de herbicidas.

El inhibidor de P450 más comúnmente utilizado como sinergista a la acción de herbicidas es el 1-aminobenzotriazol (ABT); este producto es un inhibidor irreversible de las enzimas P450 y se comporta con poca selectividad entre las diferentes isoformas, en especial cuando es utilizado en altas concentraciones (>100 mM) (Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Otro ejemplo del uso de sinergistas de herbicidas que inhiban las enzimas P450 son algunos insecticidas organofosforados (como el malatión o el terbufos y sus metabolitos), cuya acción inhibidora sobre el P450 disminuye la tolerancia de ciertas especies al herbicida. El piperonil butóxido y el CO también son inhibidores de las P450 (Davies, 2001).

Algunos productos que estimulan la acción de detoxificación de herbicidas son utilizados en la actualidad como antídotos de plantas a la acción de herbicidas, conocidos comúnmente como "safeners", "protectores" o "fitoprotectores". Teóricamente, los antídotos ejercen su efecto gracias a la interacción que establecen con las enzimas que son objeto de la acción del herbicida, ya que muchos de ellos se asemejan estructuralmente a los herbicidas para los cuales protegen al cultivo. Otra forma en que los antídotos cumplen su función es evitando que los herbicidas lleguen al sitio donde ejercen su mecanismo de acción, ya sea reduciendo su absorción o afectando la movilidad del herbicida en la planta. Por último, existen indicios de que los antídotos también pueden actuar estimulando los mecanismos de detoxificación de herbicidas en las plantas (Hatzios y Burgos, 2004), para formar así metabolitos menos tóxicos.

Los antídotos comerciales son utilizados para la protección de cultivos de gramíneas como maíz, sorgo y arroz en aplicaciones presiembra incorporadas o preemergentes de herbicidas de la familia de los tiocarbamatos y las cloroacetanilidas. Estos productos también han sido desarrollados para la protección de cultivos de invierno como trigo y avena para herbicidas ariloxifenoxipropianatos y sulfonilureas. El uso de antidotos para la protección de maíz y arroz contra herbicidas sulfonilureas, imidazolinonas, ciclohexanodionas, isoxasoles y triketonas ya es común en muchos países (Hatzios y Burgos, 2004).

Muchos antídotos parecen incrementar la tolerancia del cultivo al herbicida a través de la estimulación de la detoxificación de herbicidas por oxidación, lo que sugiere un estimulo a la acción de las enzimas P450. Al menos para 10 de estos productos se ha comprobado el incremento del metabolismo de herbicidas por oxidación de las moléculas (en especial sulfonilureas e imidazolinonas), en cultivos como maíz, sorgo y arroz. Este incremento de la oxidación de los herbicidas se ha atribuido al estímulo en la acción de las enzimas P450. En ensayos con extractos de membranas de plantas tratadas con los antídotos en presencia de NADPH y O_2, se producen metabolitos oxidados del herbicida en mayor proporción y velocidad que en plantas no tratadas. En muchos casos el antídoto puede causar un aumento en la producción de metabolitos oxigenados en el orden de 30 veces cuando se compara con plantas no tratadas y este efecto es inhibido por compuestos como el 1-aminobenzotriazol (ABT) y el CO, inhibidores comprobados de la acción de las P450. Estas observaciones crean una fuerte evidencia de que la forma como actúan los antídotos en estos casos es a través de la estimulación de la acción de las P450 en la oxidación de la molécula herbicida (Davies y Caseley, 1999). Entre los ejemplos de antídotos que se conoce actúan primordialmente induciendo la acción de las enzimas P450, se pueden nombrar el cloquintocet-mexil, el fenclorazol-etil y el 1,8-anhídrido naptálico (NA). Una información más amplia sobre los antídotos, sus usos y mecanismos de acción puede encontrarse en Davies (2001), Abu-Qare y Duncan (2002) y en Hatzios y Burgos (2004).

Investigadores como Abu-Qare y Duncan (2002) indican que es necesaria mayor cantidad de evidencias que permitan definir la inducción de las enzimas P450 como mecanismo de acción de algunos antídotos, ya que el mecanismo de estímulo sobre las enzimas P450 aún es desconocido. De hecho, es muy probable que la acción de la mayoría de los antídotos sobre el metabolismo de herbicida ocurra en más de una forma a la vez, por lo que la comprensión del proceso es compleja. Werck-Reichhart *et al.* (2000) sugieren que la forma en que actúan los antídotos incluye una serie de procesos que como consecuencia final producen un aumento en la capacidad de detoxificación de los herbicidas en las plantas. Estos procesos suceden por efecto de la inducción de las enzimas P450 oxigenasas, glutationa-*S*-transferasa, glucosil transferasas, glutationa peroxidasa y por el aumento en procesos de síntesis de glutationa, transporte vacuolar y asimilación de sulfatos.

Conociendo las complicadas interacciones químicas que suceden entre las plantas y los compuestos químicos presentes en el medio, es fácil hacerse solidario con el planteamiento hecho por Werck-Reichhart y sus colaboradores, que sugieren como mecanismo de funcionamiento de los antídotos una respuesta múltiple de la planta a la presencia de estos compuestos, que desemboca en la tolerancia al herbicida. Es evidente que el desarrollo de la tecnología en el uso de antídotos deberá pasar irremediablemente por comprobar cuáles son los mecanismos metabólicos que funcionan en la acción de los antídotos para cada caso en particular, ya que ello permitirá un mejor uso de ésta opción en el manejo de malezas.

De manera similar a la forma como las enzimas P450 pueden transformar herbicidas en compuestos no tóxicos a las plantas, este sistema enzimático también tiene la capacidad de transformar moléculas "pro-herbicidas" no tóxicas en herbicidas activos dentro de las plantas. Cuando la isoforma de P450 que produce esta transformación es específica de especies de malezas, este mecanismo puede ser utilizado como criterio de selectividad, ya que al aplicar el *proherbicida* sólo se verán afectadas aquellas especies que posean la enzima P450 que le transforme en un herbicida activo.

1.1.3.- El citocromo P450 y la resistencia de plantas a herbicidas:

La resistencia de plantas a herbicidas puede producirse por tres mecanismos básicos: (1) la modificación de las enzimas que son inhibidas por los herbicidas en las plantas resistentes, (2) el aumento en la capacidad de detoxificación de herbicidas en dichas plantas y (3) alteración en la absorción, translocación o compartamentalización de los herbicidas. Los dos primeros mecanismos han sido ampliamente demostrados en plantas y las enzimas P450 cumplen un importante papel en muchos casos de resistencia a herbicidas por aumento en la capacidad detoxificadora en las plantas (Ohkawa *et al.*, 1999). De hecho, el creciente número de casos de especies de malezas con resistencia múltiple o cruzada a herbicidas parece apoyar la idea de que un mecanismo no específico de metabolización de herbicidas (como es el caso de las P450) puede estar funcionando en dichas especies. Así, el estudio de la relación entre la acción de las P450 y la resistencia a herbicidas es una nueva área para los investigadores del metabolismo de herbicidas, que, de forma general, posee dos líneas de investigación íntimamente ligadas: (1) la identificación de genes codificadores de enzimas P450 para su aprovechamiento en el diseño de plantas transgénicas resistentes a herbicidas y (2) la comprensión y caracterización de los mecanismos de resistencia de especies de malezas.

Existen un número importante de genes ya identificados que codifican un aumento de la capacidad de metabolización de herbicidas, generando resistencia a herbicidas en las plantas donde son transferidos. Estos genes pueden ser de origen vegetal o de origen animal (mamíferos herbívoros); inclusive se han identificado genes P450 en humanos con potencial para la transferencia de resistencia a plantas, pero su uso está fuertemente cuestionado y, en algunos casos, prohibido. El aumento de la actividad detoxificadora de las P450 como mecanismo de resistencia fue demostrado por primera vez en biotipos de *Lolium rigidum* Gaudin de Australia y en biotipos de *Alopecurus myosuroides* Huds. en Europa. Más recientemente poblaciones de *Phalaris minor* Retz. resistentes a fenilureas han sido descritas en Asia. Debido a que el aislamiento de fracciones microsómicas de malezas es difícil, la evidencia de que las enzimas P450 están envueltas en casos de resistencia se han obtenido de experimentos *in vivo*, utilizando inhibidores de P450. En la mayoría de los casos la resistencia parece estar ligada al incremento en la capacidad de metabolización de herbicidas, ya que las enzimas P450 envueltas en el proceso también son detectadas en los biotipos susceptibles al herbicida; incluso muchos de los metabolitos del herbicida formados por las plantas resistentes son los mismos que los formados en las plantas susceptibles (pero lógicamente, en mayor proporción), lo que hace pensar que las enzimas P450 que intervienen en el proceso son las mismas en ambos casos (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

1.1.4.- Otros usos del citocromo P450 en la mejora de plantas:

El aumento de la actividad de enzimas P450 en plantas obtenidas por ingeniería genética o por mejora tradicional es un campo que se encuentra en crecimiento, aunque aún su desarrollo es bajo. Las múltiples funciones de las P450 y la gran cantidad de isoformas de estas enzimas permiten innumerables posibilidades en la utilización de plantas como agentes detoxificadores, tecnología incluida dentro de la fitorremediación.

Otra función conocida de las P450 que posee utilidad en la mejora de plantas es el papel que desempeñan en la síntesis de los mensajeros químicos de las plantas ante ataques de plagas y patógenos. Los ácidos grasos hidroperóxidados son generados por la acción coordinada de lipasas y lipoxigenasas; estos ácidos grasos hidroperóxidados son sustratos para enzimas P450 de la familia CYP74, que los transforman en oxilipinas, compuestos que poseen función mensajera en el desarrollo de la defensa de plantas. Muchos de estos compuestos poseen una actividad antimicrobiana y antifúngica. Cuatro enzimas P450 de la subfamilia CYP74 controlan la entrada de los ácidos hidroperóxidados en las diferentes vías metabólicas que generan los compuestos de defensa, lo que provee una contribución complementaria y de sinergia a la defensa de las plantas (Morant *et al.*, 2003).

Por último, es necesario destacar el importante potencial que posee la manipulación de las enzimas P450 en plantas para la biosíntesis de compuestos farmacéuticos cuya síntesis química es costosa, como es el caso del taxol diterpenoide, un potente antimicótico utilizado para el control de carcinomas, melanomas y sarcomas, y los alcaloides indol terpenoides, con actividad antineoplásica. El aumento de la producción de estos compuestos en plantas de donde han sido aislados, puede suponer que un importante número de personas puedan tener acceso a estos fármacos, que hasta ahora están restringidos a las personas que puedan pagar su elevado precio.

La manipulación de las rutas metabólicas de las plantas con capacidad de sintetizar compuestos útiles al hombre y que hasta ahora eran consideradas como poco útiles o malezas, llevará a redefinir el interés y la forma de estudiar a las plantas arvenses, en especial aquellos casos de poblaciones resistentes a herbicidas, donde ha quedado comprobado la alta capacidad de adaptación de las plantas por la modificación de sus procesos metabólicos de detoxificación.

1.2.- Reacciones de hidrólisis en la detoxificación de herbicidas:

Si bien desde el punto de vista químico la hidrólisis puede considerarse como una reacción de oxido/reducción, la importancia de este tipo de reacción en la detoxificación de herbicidas justifica su estudio de forma separada. La hidrólisis es común en herbicidas que se formulan como ésteres del ácido carboxílico, como éster fosfato o como amidas; esto incluye muchos herbicidas del grupo de los tiocarbamatos, triazinas, ácidos piridincarboxílicos, nitrilos, ácidos fenolalcanoicos y otros (Rao, 2002). Un ejemplo clásico de herbicida muy susceptible a la degradación por hidrólisis es el propanil.

La hidrólisis puede suceder por acción de enzimas específicas (hidrolasas) o puede ocurrir sin la acción catalítica de las enzimas. Las enzimas carboxilesterasas juegan un papel importante en la hidrólisis de herbicidas; ellas pueden actuar sobre los grupos metil-éster, etilexil-éster, etoxibutil-éster o sobre los grupos de ácido carboxílico de muchos herbicidas. Como resultado de esta acción el herbicida puede ser inactivado (como en el caso de los ácidos fenoxicarboxílicos) o activado a partir de un proherbicida, como en el caso del herbicida diclofop-metil, que es transformado por hidrólisis a ácido diclofop, la forma activa como herbicida de la molécula. La hidrólisis de los enlaces con el grupo amido es similar a la que sucede con los grupos éster y es catalizada por enzimas amidasas (Monaco *et al.*, 2002). Luego de que las moléculas de herbicidas sufren hidrólisis, los metabolitos que se forman suelen ser conjugados con otros compuestos para así completar los procesos de detoxificación (fase II del proceso de detoxificación).

La hidrólisis de herbicidas sin la acción catalítica de enzimas puede suceder por efecto del pH del medio acuoso donde se encuentre dicho herbicida. Debido a que este tipo de hidrólisis puede suceder tanto dentro como fuera de la planta, este fenómeno tiene una importancia desde el punto de vista práctico. En el interior de la planta la hidrólisis sin acción enzimática puede suceder en el xilema o en el citoplasma, de acuerdo a la condición de pH de estos sistemas, lo que puede producir la inactivación o activación del herbicida, definiendo así en muchos casos la selectividad del herbicida para especies en particular (Anderson, 1983). De similar forma, este tipo de hidrólisis puede suceder fuera de la planta, en especial durante la preparación del caldo de aspersión del herbicida, de acuerdo a las características químicas del agua que se utilice para su preparación. La hidrólisis alcalina ha sido propuesta como un mecanismo importante de inactivación de herbicidas en aguas con valores de pH superiores a 7. Este proceso produce que, si no se toman las medidas preventivas apropiadas, una parte del herbicida que se aplica se encuentre ya desactivado, lo que reduce su efectividad. Un ejemplo puede ser el caso del quizalofop-*P*-etil, que puede alcanzar un 50 % de degradación cuando permanece 24 horas en aguas con pH de 9 (Petroff, 2000).

1.3.- Reacciones de conjugación en la detoxificación de herbicidas:

La conjugación de los compuestos tóxicos con otras moléculas produce una alteración de las características físico-químicas del mismo, transformándolo, en la mayoría de los casos, en un compuesto no tóxico, hidrofílico y estructuralmente muy diverso de la molécula original. Esta estrategia de modificación de compuestos potencialmente peligrosos a las células se lleva a cabo en la fase II del proceso de detoxificación y es común en las plantas y animales. Normalmente la conjugación se completa luego de la oxidación o hidrólisis de la molécula original; estas reacciones iniciales del proceso de detoxificación permiten generar un punto en la molécula del herbicida que permita la unión del compuesto que se conjugará con el metabolito. Los principales compuestos que se conjugan con los metabolitos primarios de los herbicidas son azúcares, diferentes aminoácidos y péptidos. La conjugación con lípidos puede suceder, pero es muy poco común. Esta conjugación es catalizada por diferentes enzimas, dependiendo del tipo de compuesto que se una con el herbicida (Duke, 1985; Rao, 2002).

1.3.1.- Conjugación glucosídica:

La conjugación de moléculas de carbohidratos (en especial glucosa) con los metabolitos de herbicidas se produce comúnmente en grupos hidroxílicos, carboxílicos, tiol o aminos; de allí que existen diferentes formas de conjugación glucosídica: *O*-glucosidación, *N*-glucosidación y *S*-glucosidación, según el sustrato tenga un grupo funcional hidroxilo, amino o tiol respectivamente. Muchos de los herbicidas que son hidroxilados en las fase I de la detoxificación son conjugados con glucosa para formar *O*-β-*D* glucósidos. El azúcar más común en la conjugación es la glucosa, pero otros azúcares pueden unirse a las moléculas de herbicidas, aunque en la mayoría de los casos estos azúcares se unen a una molécula de glucosa previamente conjugada con el metabolito del herbicida, es decir, se unen con el glicósido formado. Es necesario que la glucosa a conjugar esté activada en forma de UDP-Glucosa. Las enzimas que intervienen en la incorporación de la glucosa al metabolito del herbicida son las glucosil-transferasas. Cualquier grupo hidroxil libre en cualquier posición de la cadena del herbicida o de uno de sus metabolitos es susceptible de ser utilizado para la conjugación con glucosa, aunque algunas posiciones del grupo favorecen más la unión que otras (Rao, 2002).

El β-*D*-glucopiranósido es uno de los glicósidos más comúnmente formado en la detoxificación de herbicidas; otros compuestos como los *O*-glucósidos pueden formarse, pero son menos comunes.

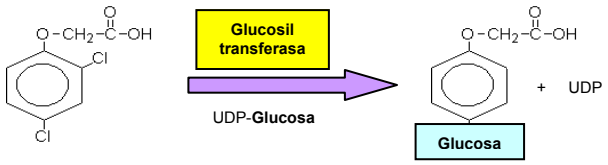

Figura III.7. Conjugación del 2,4-D con glucosa. El compuesto formado es un éster glucosa-2,4-D. Tomado de Rao (2002). Adaptado por Anzalone.

Como ejemplo del proceso de conjugación con glucosa que sufren los herbicidas, en plantas tolerantes a metribuzina inicialmente se forma un *N*-glucósido por la acción de la enzima *N*-glucosil transferasa; posteriormente a este glucósido se le agrega una molécula de malonil por acción de la enzima arilamina *N*-glucosil transferasa, lo que hace el compuestos mucho más soluble para su compartamentalización. La molécula de glucosa fijada inicialmente sirve de "base" para la unión de otras moléculas, que en definitiva modificarán de tal manera la molécula original hasta convertirla en un compuesto no tóxico.

1.3.2.- Conjugación con polipéptidos:

La conjugación polipeptídica más común e importante que sucede en la detoxificación de herbicidas sucede con la glutationa. La glutationa (GS) o glutatión es un tripéptido formado por glutamil-L-cistinil-glicina, el cuál está presente en el citoplasma de las células de todos los organismos, principalmente en su forma reducida (GSH). Durante la fase II de la detoxificación de compuestos tóxicos, el grupo SH de la glutationa tiene la capacidad de reaccionar con una gran variedad de sustratos hidrofóbicos y electrofílicos tóxicos a la célula, reduciendo así la toxicidad de los mismos. La molécula de glutationa reducida posee dos péptidos, dos grupos de ácidos carboxílico, un grupo

amino y un grupo thiol; el gran número de grupos funcionales hidrofílicos y el bajo peso molecular de este compuesto produce una alta solubilidad en agua (Karam, 1998).

La conjugación de compuestos tóxicos con la glutationa es catalizada por un grupo de enzimas denominadas glutationa transferasas o glutationa-*S*-transferasas (GSTs), las cuales han sido encontradas en prácticamente todos los organismos y fueron identificadas por primera vez en plantas de maíz hace unos 25 años (Marrs, 1996; Zajc *et al.*, 1999). Estas enzimas catalizan el enlace del grupo reactivo thiol de la cisteína de la glutationa con sustratos hidrofóbicos y electrofílicos. Posteriormente a su unión con glutationa, la mayoría de estos compuestos son rápidamente metabolizados por enzimas peptidasas para producir conjugados con cisteína. En el caso particular de los metabolitos de herbicidas conjugados con cisteína, el proceso se completa con la unión de una molécula de malonil CoA, para formar un conjugado herbicida-malonilcisteína, que en muchos casos se acumula en la vacuola (cuando la solubilidad en agua es alta) o es asociado con componentes de la pared celular como la pectina, hemicelulosa o lignina (en el caso de poseer baja solubilidad) y "marcados" así para su deposición extracelular en el apoplasto como un conjugado insoluble. De hecho, se han identificado conjugados con malonilcisteina de herbicidas como el propacloro, metolacloro, butacloro, EPTC, PCNB y fluorodifen, lo que sugiere que este tipo de metabolito se forma a partir de diferentes formas de conjugados con glutationa (Marrs, 1996). Los conjugados que entran en la vacuola celular a través de los transportadores, sufren una serie de reacciones que permiten su degradación en diferentes grados de acuerdo al compuesto tóxico en cuestión y a la especie, que puede permitir inclusive la utilización de los residuos del tóxico en la síntesis de compuestos naturales en el metabolismo vegetal.

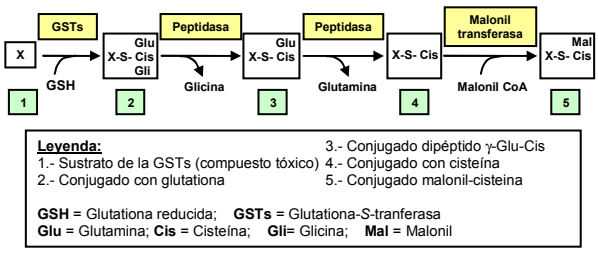

Figura III.8. Metabolismo de los compuestos conjugados con glutationa. Tomado de Marrs (1996). Adaptado por Anzalone.

Los complejos proteicos responsables del transporte transmembrana de los metabolitos conjugados con glutationa no se han caracterizado en detalle, pero se conoce que son transportadores similares a los tipo ABC encontrados en mamíferos y son dependientes del ATP y el Magnesio para su funcionamiento (Edwards y Dixon, 2000).

Además de las funciones en la detoxificación, las enzimas glutationa-*S*-transferasas cumplen múltiples funciones dentro de las células vegetales, que si bien suelen ser complejas y variadas, poseen en común la función de reconocimiento y transporte de una gran cantidad de compuestos reactivos electrofílicos, ya sean de origen externos (xenobióticos) o de origen interno, como metabolitos secundarios con potencial tóxico a la célula. La conjugación con glutationa "marca" numerosos compuestos endógenos y exógenos para que sean reconocidos por la bomba de glutationa y permitir así el paso transmembrana de estos compuestos; como ejemplo, la conjugación con glutationa es esencial para el transporte de antocianinas hacia las vacuolas, que en exceso en el citoplasma pueden ser tóxicas a las células (Marrs, 1996). Se ha comprobado el papel de las GSTs en la respuesta al estrés producido por el ataque de patógenos, sus funciones como proteínas de enlace y como receptores de auxinas, regulando así la actividad de las hormonas a través de su conjugación con glutationa y el transporte entre las células (Zajc *et al.*, 1999). La glutationa cumple a su vez funciones de detoxificación de compuestos originados durante el estrés oxidativo producido por diferentes causas, como los propanoles y los compuestos derivados de la peroxidación de lípidos. De igual forma se ha comprobado la inducción de las GSTs por metales pesados, ozono, lesiones y etileno (Karam, 1998). Estas evidencias sugieren que las GSTs poseen un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad celular en situaciones de estrés oxidativo.

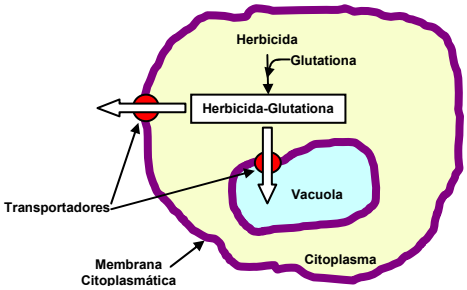

Figura III.9. Función de los transportadores de metabolitos conjugados con glutationa en la detoxificación de herbicidas en células vegetales. Tomado de Edwards y Dixon (2000). Adaptado por Anzalone.

Las GSTs solubles presentes en el citosol son enzimas de alrededor de 50 KDa, compuestas por dos subunidades de masa molecular entre 20 a 25 KDa cada una (Edwards y Dixon, 2000). Estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a las similitudes de sus secuencias de aminoácidos y su capacidad reactiva inmunológica en 5 clases: Alpha, Mu, Pi, Sigma y Theta. Las estructuras determinadas por rayos X de las cinco clases muestran una topología dimérica similar. Cada sub-unidad contiene un sitio activo independiente con un residuo tirosina conservado, el cual está envuelto en las catálisis (Zajc *et al.*, 1999). Sin embargo, en la clase

Theta, a la cual pertenecen la mayoría de las GSTs de las plantas, es un residuo de serina el que está envuelto en la catálisis. Existe una clasificación para las GSTs de las plantas basadas en la secuencia de aminoácidos y la conservación del intron:exon, la cual divide este grupo Theta en tres sub-clases; de estas subclases, las GSTs tipo I son las que en su mayoría intervienen en la detoxificación de herbicidas.

a.- Mecanismo de catálisis de las enzimas glutationa-*S*-transferasas:

Tal y como se ha comentado, las GSTs catalizan el ataque del átomo de sulfuro de la glutationa reducida (GSH) al centro electrofílico de una amplía variedad de sustratos. En cada una de las subunidades de la enzima, el sitio activo consiste en un dominio de unión de la GSH (sitio G) localizado en la zona terminal *N* del polipéptido; en el caso de las GSTs de las plantas el residuo de serina estabiliza el anión thiolato de la GSH durante la reacción (Prade *et al.*, 1998; Edwards y Dixon, 2000). Por otra parte, en la zona terminal *C* de la subunidad se encuentra el dominio del sitio de unión de los compuestos hidrofóbicos (sitio H), que es lugar donde se unen los herbicidas y otros tóxicos. La especificidad del sustrato para el sitio G es alta, siendo exclusivo para la GSH o para moléculas estructuralmente relacionadas. En contraste, las GSTs poseen muy poca especificidad para los sustratos del sitio H (Marrs, 1996; Edwards y Dixon, 2000), de allí su capacidad de catalizar la unión de la glutationa a múltiples moléculas. En el caso de herbicidas, se ha comprobado que diferentes formas de GSTs actúan en la conjugación de atrazina, metolacloro (Marrs, 1996), fenoxaprop-etil (Cummins *et al.*, 1999) y herbicidas de grupos químicos como tiocarbamatos, acetamidas y difenilétres (Prade *et al.*, 1998) con la glutationa, conformando éste el mecanismo que permite reducir el potencial tóxico de estos herbicidas y jugando así un papel determinante en la selectividad de los mismos.

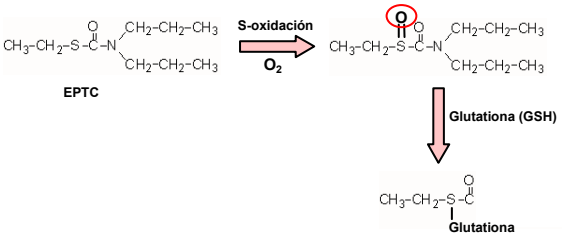

Figura III.10. Metabolismo del herbicida EPTC en diferentes plantas. Luego de sufrir una oxidación, el EPTC genera un metabolito más tóxico que la molécula original, pero muy inestable; la rápida conjugación con glutationa forma un compuesto inactivo. Tomado de Rao (2002). Adaptado por Anzalone.

b.- La glutationa-*S*-transferasa y la selectividad de herbicidas:

Como se ha discutido hasta el momento, la GST posee un papel importante en muchos de los procesos de detoxificación de herbicidas en plantas; ese rol detoxificador de estas enzimas puede definir la selectividad de herbicidas. Las diferentes formas de GST no se distribuyen equitativamente entre las diferentes especies de plantas, por lo cual aquellas que posean alta actividad de GST podrán soportar mejor la exposición a ciertos herbicidas que, por el contrario, eliminarán las especies que posean baja actividad de GSTs. Como ejemplo se puede mencionar el caso de la alta tolerancia que poseen el maíz y el sorgo a la atrazina, la cual está demostrada que sucede por los altos niveles de GST que poseen estos cultivos. Estas GSTs catalizan la conjugación atrazina-GSH, lo que produce un metabolito no tóxico y soluble en agua. Cultivos sensibles a este herbicida no poseen la alta actividad de la GST, lo que les imposibilita la detoxificación de la atrazina, tornándolas susceptibles a la acción herbicida del compuesto. De forma semejante se ha determinado que las GSTs son responsable de la tolerancia del maíz al alacloro, metolacloro y EPTC; la soya adquiere su tolerancia al acifluorfen gracias a la alta tasa de conjugación de GSH al herbicida; el arroz es tolerante al herbicida pretilacloro como producto de la efectiva conjugación del herbicida con glutationa (Usui, 2001) y los altos niveles de GSTs en sorgo le confieren la tolerancia al metolacloro (Marrs, 1996).

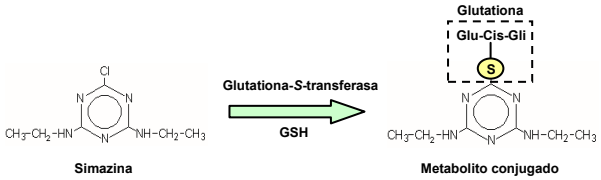

Figura III.11. Detoxificación de simazina por conjugación con glutationa en maíz, sorgo y caña de azúcar. Basado en Marrs (1996). Adaptado por Anzalone.

La conjugación con glutationa también es una de las principales vías de detoxificación de herbicidas en las malezas, pero normalmente las tasas de metabolización en estas especies es menor que en los cultivos. Para herbicidas como las clorotriazinas inclusive es posible predecir con exactitud la tolerancia al herbicida de acuerdo a la tasa relativa de conjugación del herbicida con glutationa. La especie maleza *Setaria faberi* Herrm. posee tolerancia a herbicidas cloro-triazinas por efecto de las GSTs, pero la forma de estas enzimas en la maleza es diferente a la encontrada en maíz, lo que sugiere que la diversidad en las formas de GSTs entre las plantas juega un papel importante en la respuesta ante los herbicidas.

Otra forma en que las GSTs intervienen en la selectividad de los herbicidas es a través del uso de antídotos. El uso de estos compuestos, tal como se ha comentado, ha sido estudiado especialmente en cultivos de cereales, donde en el caso particular de las GSTs pueden actuar aumentando el metabolismo de la conjugación con glutationa; este aumento puede conseguirse por dos mecanismos: (1) incremento en la disponibilidad de la glutationa reducida para la

conjugación e (2) incrementando el contenido de glutationa-*S*-transferasa. Los antídotos que actúan aumentando la disponibilidad de glutationa lo hacen aumentando la actividad de la ATP-sulfurilasa y la adenosin-5-fosfosulfato sulfotransferasa, dos enzimas claves en la asimilación de sulfuro, así como la actividad de la γ-glutamil-cisteina sintetasa. Por otra parte, los antídotos que inducen la actividad de las GSTs parecen actuar debido a la combinación del aumento en la concentración de las enzimas junto a la síntesis de nuevas isoenzimas; esto ha sido demostrado en estudios hechos sobre maíz, sorgo y trigo. Un ejemplo de antídoto que se sospecha actúa aumentando la actividad de las GSTs es el dichlormid, el cual se utiliza en la protección del maíz contra herbicidas cloroacetamidas, setoxidim y clorosulfuron (Edwards y Dixon, 2000; Abu-Qare y Duncan, 2002).

c.- La glutationa-*S*-transferasa y la resistencia de plantas a herbicidas:

Algunas especies de malezas presentan resistencia a diferentes grupos de herbicidas, lo cual se denomina de forma general como "resistencia múltiple". La mayoría de los mecanismos de resistencia de malezas a un herbicida en particular son originados por cambios en las enzimas sobre las que actúan los herbicidas; sin embargo, en muchos de los casos de resistencia múltiple aún no se conocen con exactitud los mecanismos involucrados, pero muchos investigadores coinciden en afirmar que este tipo de resistencia se produce por un aumento en el metabolismo detoxificador de los herbicidas, entre ellos la acción de las GSTs. En la especie *Alopecurus myosuroides* Huds., los estudios hechos por Cummins *et al.* (1999) han arrojado fuerte evidencia de que la actividad de las GSTs puede contribuir a la resistencia de esta especie a múltiples herbicidas por detoxificación por conjugación con glutationa, jugando también un importante papel en la tolerancia al estrés oxidativo. De similar forma, en poblaciones de *Abutilon theophrasti* Medik. resistentes a atrazina se ha demostrado que el aumento en la capacidad detoxificadora de las GSTs (de hasta 4 veces con respecto a las poblaciones no resistentes) es la causa de la resistencia a ese herbicida (Edwards y Dixon, 2000) y es posible que intervenga en el desarrollo de resistencia a otros grupos químicos.

1.3.3.- Conjugación con aminoácidos:

Algunos aminoácidos como glutamato, asparagina, cisteína, alanina, leucina, prolina, etc. pueden unirse a los herbicidas o a sus metabolitos a través de enlaces alfa-amida. Estas uniones normalmente suceden luego de conjugaciones primarias del metabolito, en especial con glutationa. Tal como se ha descrito, también pueden formarse metabolitos conjugados con aminoácidos como consecuencia de la acción de enzimas peptidasas que actúan sobre conjugados de glutationa:herbicida que normalmente forman compuestos con una unión cisteína-S-metabolito; sin embargo, estos compuestos se metabolizan rápidamente por su unión con malonil. El 2,4-D es especialmente susceptible de unirse a aminoácidos (Rao, 2002).

2.- La activación de proherbicidas en plantas:

Tal como se comentó anteriormente, algunos herbicidas son aplicados en forma de compuestos inactivos y, luego de sufrir algún tipo de modificación dentro de las plantas, pasan a formas activas, generando así su acción herbicida. Es por ello que a estos productos se les denomina *proherbicidas*. Cada vez se reportan nuevos casos en los que este fenómeno ocurre y el estudio del mismo ha permitido conocer mejor los procesos de transformación de herbicidas dentro de las plantas, en especial los complejos enzimáticos involucrados.

La activación de un proherbicida normalmente no sólo produce un aumento en la fitotoxicidad de la molécula, sino también un aumento en la movilidad del mismo. Uno de los casos típicos de activación de proherbicidas lo representan algunos de los herbicidas llamados comúnmente como 'fops' (ariloxifenoxi-propianatos) o graminicidas post-emergentes. El diclofop-metil se formula comercialmente como un éster, debido a que bajo esta forma química su absorción es más efectiva. La forma éster de este herbicida posee baja toxicidad a las plantas y sólo la forma ácida del producto posee fitotoxicidad. La transformación a la forma ácida del herbicida se produce por la acción de enzimas esterasas, las cuales se encuentran en la pared celular de las plantas sensibles. La forma ácida del compuesto presenta mayor solubilidad en agua y movilidad en el floema y sólo bajo esta forma puede penetrar a la célula.

Otros ejemplos importantes de activación de proherbicidas son los casos de la transformación de 2,4-DB y el MCPB en 2,4-D y MCPA respectivamente por β-oxidación en algunas especies malezas. La avena salvaje (*Avena fatua* L.) es controlada por el imazametabenz como resultado de la rápida de-esterificación del metil éster inactivo hacia la forma ácida del compuesto, que es fitotóxico, mientras que la avena cultivada metaboliza este herbicida hacia una forma inactiva (Monaco *et al.*, 2002). Por último cabe mencionar como ejemplos de activación de proherbicidas en plantas la biotransformación del bialafos a fosfinotricina o la sulfoxidación de herbicidas tiocarbamatos, como el EPTC, dialato o trialato, en cuyos casos el metabolito sulfa-oxidado posee una capacidad fitotóxica de hasta 10 veces mayor a la de la molécula original (Rao, 2002).

Con el aumento del interés en el uso de productos de origen natural para el control de malezas, la importancia del estudio y caracterización de los procesos de biotransformación y activación será cada vez mayor, ya que en muchos casos la base de la selectividad de estos compuestos se encuentra en la capacidad de metabolización de las plantas, ya sea para su activación como para su detoxificación.

CAPÍTULO IV

MECANISMOS DE ACCIÓN DE HERBICIDAS

Introducción

Como mecanismo de acción de herbicidas se entiende la acción que ejercen estos compuestos sobre el metabolismo de las plantas produciendo un nivel de desequilibrio en el normal funcionamiento de los procesos vitales, que trae como consecuencia la merma en el crecimiento o la muerte de las especies susceptibles.

El conocimiento del mecanismo de acción de los herbicidas es importante para poder manejar estos productos de forma adecuada. De la comprensión de los procesos que son afectados por los herbicidas deriva la comprensión de los síntomas típicos que se producen en las plantas susceptibles, la selectividad de los productos, la toxicidad hacia especies que no son objeto de control y otras características que todo técnico debe evaluar al momento de utilizar un herbicida.

El aumento en el número de especies de malezas resistentes a herbicidas ha acelerado y profundizado la investigación sobre los mecanismos de acción de los herbicidas, ya que allí radica una de las principales claves para comprender el porque algunas poblaciones de malezas pueden derivar hacia poblaciones resistentes a herbicidas. De hecho, entre las acciones recomendadas para el manejo de poblaciones de malezas resistentes y la prevención de su aparición destaca la "rotación de herbicidas con mecanismos de acción diferentes", lo que supone que el conocimiento de estos mecanismos es básico para poder planificar el manejo de herbicidas y malezas.

La clasificación de los herbicidas de acuerdo a su mecanismo de acción utilizada en este capítulo se basa en la clasificación propuesta por el Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC por sus siglas en inglés), el cual, junto a otras agrupaciones de investigación sobre malezas, han hecho un esfuerzo en organizar los herbicidas de acuerdo a su mecanismo de acción.

Los herbicidas comúnmente poseen más de un mecanismo de acción, pero suelen ser clasificados de acuerdo al mecanismo de acción primario, aquel que más contribuya a la alteración de los procesos metabólicos de las plantas hasta producir su muerte.

1.- Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis:

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas autótrofas son capaces de generar energía química a partir de energía lumínica. Este proceso tiene lugar en los cloroplastos, que se encuentran en el parénquima fotosintético de la mayoría de las plantas. Cada cloroplasto está rodeado por un sistema de doble membrana o envoltura, que controla la salida y entrada de moléculas desde y hacia el cloroplasto. En el interior del cloroplasto se encuentra el material amorfo, gelatinoso y rico en proteínas llamado *estroma*, el cual contiene las enzimas que convierten el CO_2 en carbohidratos. Embebidos por todo el estroma están los *tilacoides* (del griego "tilakos", saco o bolsita) que contienen los pigmentos y en los cuales se utiliza la energía de la luz para oxidar agua y formar ATP y NADPH, ricos en energía, necesarios a su vez para que en el estroma se convierta el CO_2 en carbohidratos (Salisbury y Ross, 1992).

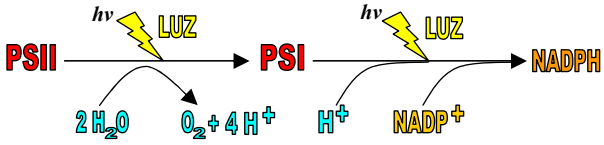

Figura IV.1. Resumen esquemático de la transferencia cooperativa de electrones entre los Fotosistemas I y II en la membrana tilacoidal. Tomado de Salisbury y Ross (1992). Adaptado por Anzalone. PSII = Fotosistema II; PSI = Fotosistema I.

En la membrana del tilacoide se encuentran los sistemas encargados de realizar el transporte de electrones generados en la fotólisis del agua por la acción de la luz, los cuales proporcionan la energía necesaria para la formación del ATP y NADPH. Estos sistemas se han separado en dos grupos de pigmentos y proteínas asociadas a ellos, denominados fotosistemas I y II. Así, el efecto cooperativo de estos dos fotosistemas permite utilizar la energía luminosa para oxidar H_2O y transferir los electrones disponibles al $NADP^+$ para formar NADPH.

La formación de ATP en el cloroplasto se realiza por la acción del complejo denominado ATP sintetasa, que se encuentra embebido en la membrana tilacoidal; allí se genera ATP a partir del ADP + *Pi* utilizando la energía que se produce por el movimiento de protones que pasan de un lado a otro de la membrana tilacoidal, gracias al potencial transmembrana presente. Este proceso es conocido como fotofosforiliación

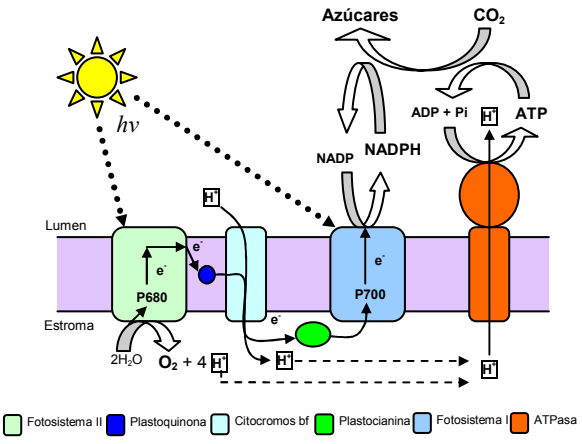

Figura IV.2. Resumen esquematizado del proceso fotosintético en la membrana tilacoidal del cloroplasto. Basado en Salisbury y Ross (2000) y Buchanan *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

Según Rao (2002) los herbicidas que inhiben o modifican la fotosíntesis pueden clasificarse como: inhibidores del transporte de electrones, desacopladores, inhibidores de la transferencia de energía, inhibidores-desacopladores y aceptores (o secuestrado-

res) de electrones. La fijación y asimilación de carbono en la fotosíntesis no son mecanismos de acción primarios de los herbicidas. De los mecanismos de acción antes nombrados sólo se han comprobado como importantes para los herbicidas, hasta el momento, la inhibición del fotosistema II y el desvío o secuestro de electrones a nivel del fotosistema I.

El fotosistema II:

El proceso fotosintético comienza en el fotosistema II y no en el fotosistema I; no por una razón fisiológica en particular, sino por singularidades en la nomenclatura de dichos fotosistemas debido al orden de su descubrimiento (Rao, 2002). La función general del fotosistema II (PSII) es utilizar energía luminosa para reducir plastoquinona (PQ) oxidada a su forma completamente reducida (PQH_2) utilizando los electrones del agua. Esta plastoquinona transferirá los electrones al complejo de citrocomo para continuar la transferencia al fotosistema I (Salisbury y Ross, 1992).

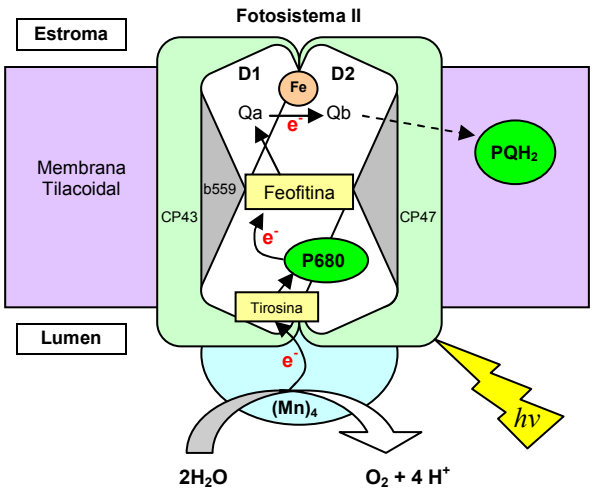

Figura IV.3. Conformación estructural hipotética del fotosistema II. Tomado de Buchanan *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

El complejo del fotosistema II se compone de más de quince polipéptidos y por lo menos nueve diversos componentes redox (clorofila, feofitina, plastoquinona, tirosina, manganeso, hierro, citocromo B559, carotenoides e histidina). Sin embargo, solamente se conoce de cinco de estos componentes redox que están implicados en la transferencia de electrones desde el agua (H_2O) a la plastoquinona: el conjunto de manganeso que oxida el agua $(Mn)_4$, el aminoácido tirosina, la clorofila del centro de reacción P680, la feofitina y las moléculas de la plastoquinona (plastoquinona A y plastoquinona B). De estos componentes redox esenciales, se ha demostrado que la tirosina, el P680, la feofitina, la plastoquinona A y plastoquinona B están ligados a dos polipéptidos dominantes que forman la base heterodimérica del centro de reacción del fotosistema II (Whitmarsh y Govindjee, 2001); tales polipéptidos se conocen como D1 y D2, con pesos moleculares cercanos a 33 KDa y 31 KDa respectivamente. Además, el PSII tiene asociado un conjunto de complejos para la captura de luz.

1.1.- Herbicidas inhibidores del fotosistema II:

Los herbicidas que inhiben el fotosistema II (ej: las triazinas), parecen ejercer una acción detrimental sobre el proceso de transporte de electrones desde la *plastoquinona A* a la *plastoquinona B*, deteniendo de esta forma el flujo normal de electrones en la cadena de transferencia. Se sabe que este efecto lo logran uniéndose a la proteína D1 en el sitio de unión para la *plastoquinona B*.

En la proteína D1 la *plastoquinona B* se une por dos enlaces de hidrógeno, uno con la serina 264 y otro con la histidina 215; después de aceptar dos electrones de la *plastoquinona A*, ambos enlaces son rotos y la *plastoquinona B* deja el sitio como *plastoquinona B* reducida. Ahora una *plastoquinona B* no reducida ocupa este lugar vacante en la proteína D1 y el transporte del electrón continúa. Si un herbicida del grupo de las triazinas está presente en el sistema, la molécula del herbicida actuará como un análogo no reducible de la *plastoquinona B*, uniéndose a D1 por dos enlaces de hidrógeno, uno con la serina 264 y otro con la fenilalanina 265. Debido a su mayor afinidad a estos lugares, la molécula del herbicida no puede ser sustituida por la *plastoquinona B* y, puesto que la molécula del herbicida es no reducible, no podrá recibir el electrón de la *plastoquinona A* (Tharayil-Santhakumar, 2003), concretándose así la inhibición del flujo de electrones. La especificidad del sitio de acción quedó demostrada porque la unión de los herbicidas a ésta proteína no ocurrió en experimentos con mutantes resistentes a triazinas (Hess, 2000).

Esta interrupción en el flujo de electrones detiene el proceso fotosintético, por lo cual la planta entrará en un período de muerte progresiva debido a la falta de los compuestos básicos para su desarrollo.

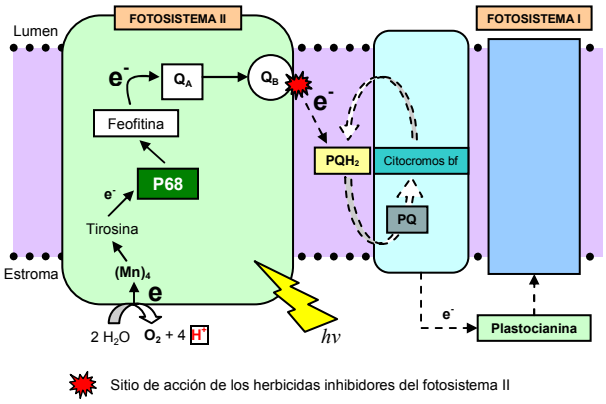

Figura IV.4. Sitio de acción de los herbicidas inhibidores del fotosistema II en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis. Tomado de Anzalone (2000).

La observación hecha sobre la rápida muerte de las plantas tratadas con herbicidas inhibidores del

fotosistema II hizo pensar en que un proceso alterno a la inhibición de la transferencia de electrones tenía que suceder en estos casos. La necrosis que se desarrolla luego del tratamiento con el herbicida es consecuencia de daños a la membrana. Cuando la clorofila acepta energía lumínica cambia de un estado de energía base (CHL) a un estado de energía más alto (^{1}CHL). Esta energía extra es normalmente transferida al centro de reacción P680, y la clorofila regresa a su estado base de energía. Cuando la cadena de electrones es bloqueada por la acción del herbicida, la clorofila en su estado de energía alto (^{1}CHL) no puede transferir dicha energía al centro de reacción; estas moléculas de clorofila que normalmente poseen un período de vida muy corto se van acumulando, y algunas de ellas pueden convertirse en moléculas con un estado de energía aún más alto (^{3}CHL). Algunas formas de ^{3}CHL se generan durante el proceso de fotosíntesis en condiciones normales, pero la energía de estas moléculas es disipada por los carotenoides. Cuando la producción de ^{3}CHL es muy alta, la capacidad del sistema de disipación de esta energía a cargo de los carotenoides es sobrepasada, quedando las móleculas de clorofila sobrexcitadas (^{3}CHL) dentro del sistema (Hess, 2000).

El exceso de ^{3}CHL causa la peroxidación de los lípidos por dos mecanismos: (1) la formación directa de radicales lipídicos en ácidos grasos insaturados y (2) la reacción de las moléculas de ^{3}CHL con el oxígeno, produciendo oxígeno activado ($^1O_2$) que reaccionará con los lípidos para formar radicales lipídicos. Bajo condiciones normales durante el proceso fotosintético algunas moléculas de $^1O_2$ son producidas, siendo disipadas por la acción de los carotenoides; sin embargo, en presencia de inhibidores de la fotosíntesis el sistema disipador de energía de los carotenoides se ve altamente desbordado por las moléculas de clorofila excitadas, lo que origina un exceso de formas activas de O_2, generando la destrucción de los lípidos a través de la formación de radicales lipídicos en ácidos grasos polinsaturados (Hess, 2000).

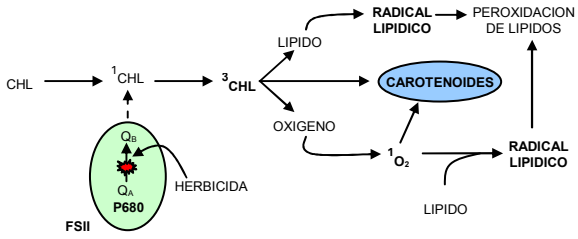

Figura IV.5. Proceso de inducción a la producción de formas de oxígeno activo y peroxidación de lípidos por herbicidas inhibidores del fotosistema II. Tomado de Hess (2000). Adaptado por Anzalone.

El proceso de peroxidación de los lípidos se cumple en varias fases y éste, además de generar la destrucción de la membrana plasmática, deriva en la acumulación de compuestos tóxicos a la planta; todo este proceso deriva en una destrucción del tejido.

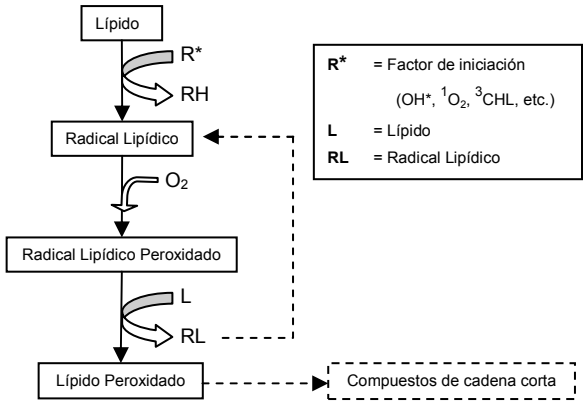

Figura IV.6. Proceso de peroxidación de lípidos. Tomado de Ross y Lembi (1999). Adaptado por Anzalone.

Los herbicidas inhibidores del fotosistema II han sido clasificados de acuerdo al sitio y al efecto que producen sobre la proteína D1, ya que se ha demostrado que el punto de unión de éstos a la D1 puede variar. Por ejemplo, el sitio de unión de las ureas sustituidas al fotosistema II se conoce como "el sitio de la úrea" y es diferente al lugar donde se unen las triazinas; esta diferencia en el sitio de unión es una de las causas por las cuales las ureas sustituidas son inhibidores más potentes de la fotosíntesis que las triazinas. También se ha comprobado un sitio de unión específico para el grupo de las benzotiadiazinonas y las piridazinonas (pirazon).

Los herbicidas llamados inhibidores "clásicos" de la fotosíntesis (triazinas y ureas sustituidas) producen cierta estabilidad en la proteína D1 luego de su unión a ésta, lo que evita la descomposición de la proteína en presencia de la luz, proceso natural en dicha proteína. Por otra parte, los herbicidas inhibidores "no clásicos" de la fotosíntesis (como el ioxynil) no protegen a la proteína D1 de la degradación por efecto de la luz (Fufezan *et al.*, 2002), lo que produce, además de la inhibición de la fotosíntesis, la destrucción de la proteína D1 seguida de un severo daño a la membrana; de allí que estos herbicidas se han denominado "inhibidores de la fotosíntesis de acción rápida".

Algunos autores como Thompson *et al.* (1969 y 1974) indican que los herbicidas del grupo de las triazinas pueden inhibir el estado 3 de la respiración; sin embargo, Brewer *et al.* (1977) citados por Rao (2002) indican que este grupo de herbicidas no funcionan como desacopladores del proceso respiratorio, sino primordialmente como inhibidores del transporte de electrones. La inhibición de la respiración puede ser un mecanismo de acción secundario para estos herbicidas, aunque el aporte de este mecanismo de acción secundario en el efecto tóxico total es pequeño. En la práctica se observa el rápido efecto que producen estos herbicidas sobre el tejido foliar jóven (inclusive en las hojas cotiledonares); estos daños poseen mayor concordancia con la actuación del proceso de peroxidación de lípidos explicado anteriormente que con un desacople

de la respiración, en cuyo caso la visualización de daños y la muerte del tejio sería mucho más lento.

Cuadro IV.1. Herbicidas inhibidores del fotosistema II.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
C1	Triazinas	Ametrina Atrazina Cianazina Desmetrina Dimetametrina Prometon Prometrina Propazina Simazina Simetrina Terbumeton Terbutilazina Terbutrina Trietazina
	Triazinonas	Hexazinona Metamitron Metribuzina
	Uracilos	Bromacil Lenacil Terbacil
	Triazolinonas	Amicarbazone
	Piridazinonas	Pirazon=cloridazon
	Fenilcarbamatos	Desmedifam Fenmedifam
C2	Ureas	Clorobromuron Clorotoluron Cloroxuron Dimefuron Diuron Etidimuron Fenuron Fluometuron (grupo F3) Isoproturon Isouron Linuron Metabenztiazuron Metobromuron Metoxuron Monolinuron Neburon Siduron Tebutiuron Tidiazuron
C2	Amidas	Propanil Pentanoclor
C3	Nitrilos	Bromofenoxim (grupo M) Bromoxinil (grupo M) Ioxinil (grupo M)
	Benzotiadiazinonas	Bentazon
	Fenil-piridazinas	Piridato Piridafol

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Los daños que manifiestan las plantas susceptibles tratadas con herbicidas inhibidores del fotosistema II no aparecen hasta que las primeras hojas (del cotiledón o verdaderas) comienzan el proceso de fotosíntesis; las hojas anchas susceptibles presentan una clorosis intervenal que evoluciona hasta necrosis, comenzando desde los bordes de las hojas hacia el centro; en las especies gramíneas la clorosis comienza en la punta de las hojas y se va extendiendo hasta la base de las mismas. La necrosis se acelera en condiciones de alta humedad y calor (Peterson *et al.*, 2001), lo cual es fácil de evidenciar en campo cuando se realizan aplicaciones de estos productos sobre suelos con buena humedad y dicha aplicación es seguida de días soleados, calurosos y con vientos suaves.

La tolerancia de plantas a herbicidas inhibidores del fotosistema II sucede, en la mayoría de los casos, gracias a procesos de degradación o inactivación de los herbicidas por el metabolismo de la planta, como en el caso de la atrazina y el maíz, donde se han identificado hasta cuatro diferentes mecanismos de metabolización del herbicida en esta especie (Ross y Lembi, 1999). Sin embargo, Molin y Khan (1996) han sugerido que, en el caso del algodón, la tolerancia se obtiene gracias a un mecanismo aún desconocido que permite la protección o la rápida reparación del fotosistema II ante la presencia de la prometrina, lo que reduce el daño por el exceso de energía que se produce por la inhibición del flujo de electrones. Por su parte, se ha comprobado que un importante número de especies de malezas resistentes a inhibidores del fotosistema II como *Portulaca oleracea* L., *Senecio vulgaris* L. ó *Amaranthus hybridus* L., logran adquirir dicha resistencia por modificaciones en diversos aminoácidos de la proteína D1, lo que evita la unión del herbicia con dicha proteína (Maertens *et al.*, 2004; Devine y Shukla, 2000).

Debido a que la fotosíntesis es un proceso ajeno a los mamíferos y otros organismos, la inhibición del transporte de electrones a nivel del fotosistema II es un interesante mecanismo de acción para herbicidas, ya que implica una baja potencialidad de ser tóxicos para estos seres. Por ello, actualmente se desarrollan herbicidas inhibidores del transporte de electrones en el fotosistema II con mayor capacidad de inhibición que los conocidos hasta ahora. El compuesto 2-(4-halo-genobenzilamina)-4-metil-6-trifluorometil-1,2,5 triazina, se ha probado como fuerte inhibidor del transporte de electrones, ya que se une de forma fuerte a la proteína D1. Al parecer, este producto es capaz de controlar especies de malezas que han desarrollado resistencia a herbicidas del grupo de las triazinas por su capacidad de unirse a la D1 en un punto diferente a los herbicidas clásicos (Wakabayashi y Böger, 2004a).

Otro grupo de herbicidas que inhiben la fotosíntesis tienen como mecanismo de acción la inhibición del fotosistema I.

El fotosistema I:

El complejo del fotosistema I cataliza la oxidación de la plastocianina y la reducción de la ferredoxina, una pequeña proteína ligada a FeS. El fotosistema I se compone de un grupo de proteínas que actúan como acopladores para la mayoría de los portadores del electrón (Krauss *et al.*, 1993). Entre este grupo de

proteínas destaca la PsaC, por su papel crítico en la transferencia de electrones a la ferredoxina para su reducción (Fleck y Vidal, 2001). El centro de reacción es alimentado por un sistema de antena que recolecta los fotones y que consiste en cerca de doscientas moléculas de clorofila (principalmente clorofila *a*); la fotoquímica primaria es iniciada por una clorofila *a* dimérica, llamada P700 (Whitmarsh y Govindjee, 2001).

La transferencia de electrones desde el complejo *citrocomo bf* al fotosistema I es mediada por la plastocianina (PC). La plastocianina es soluble en agua y funciona en el espacio interno de la membrana tilacoidal (lumen). Cuando la antena receptora de energía lumínica del fotosistema I transfiere energía a P700, el electrón es excitado y lanzado hacia un grupo de transportadores (A_0, A_1, Fx, Fa/Fb) y finalmente a la ferredoxina (Fd). La Fd transfiere el electrón a la Fd-$NADP^+$ oxido-reductasa (FNR), una flavoproteína periférica que funciona adherida a la superficie externa de la membrana fotosintética y que alternadamente cataliza la reducción del NADP a NADPH. Tanto la ferredoxina como el $NADP^+$ son solubles en agua y se encuentran en la fase acuosa externa (estroma). Este proceso se ha resumido de forma esquemática en la Figura IV.7.

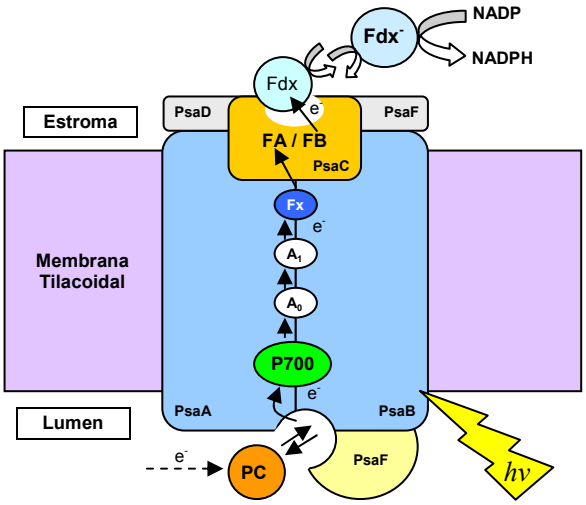

Figura IV.7. Conformación estructural hipotética del fotosistema I. Tomado de Buchanan *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

1.2.- Herbicidas secuestradores de electrones en el fotosistema I:

Los herbicidas del grupo de los bipiridilios (paraquat y diquat) "secuestran electrones" a nivel del fotosistema I, desencadenando una serie de eventos que producen la rápida muerte de las plantas sensibles. El paraquat y el diquat son herbicidas catiónicos y se aplican como solución catiónica bivalente (PQ^{++} y DQ^{++}). Estos herbicidas parecen interactuar con la proteína PsaC del fotosistema I (Hess, 2000).

El potencial redox del PQ^{++} es de -446 mV, el del DQ++ es de -349 mV y el de Fa/Fb es -560 mV; esta diferencia de potencial eléctrico permite al paraquat y al diquat actuar como competidores con la ferredoxina para el flujo de electrones desde Fa/Fb. Así, Fa/Fb donará electrones a PQ^{++} ó DQ^{++} en vez a la ferredoxina, por lo cual muchos investigadores afirman que estos herbicidas poseen la capacidad de "secuestrar" los electrones en ese nivel de la cadena de transporte del fotosistema I (Ashton y Crafts, 1973).

Después de recibir el electrón, el PQ^{++} (ó DQ^{++}) se convierte en el catión monovalente PQ^+ (en el caso de paraquat, coloreado de un intenso azul). Estos cationes monovalentes son muy reactivos y pueden reducir el oxígeno al superóxido y en el proceso se regenera el catión divalente. El oxígeno activo ($^1O_2$) puede reaccionar con el $2H^+$ para formar H_2O_2 (agua oxigenada), que es capaz de degradar rápidamente las paredes celulares (Cobb, 1992; Ross y Lembi, 1999).

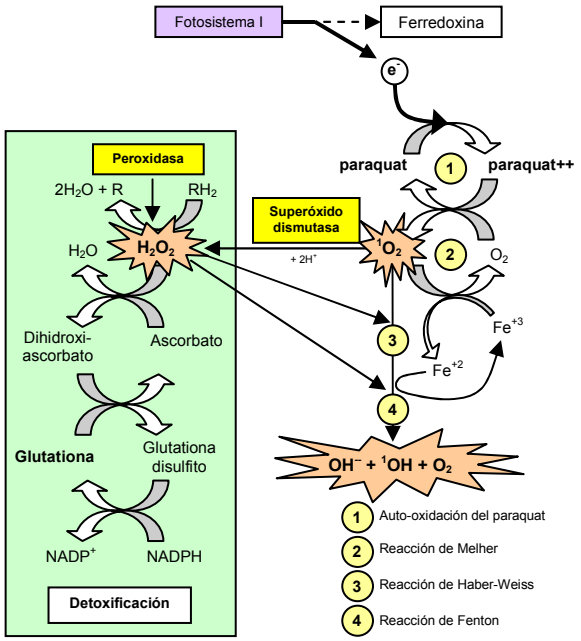

Figura IV.8. Proceso de formación y detoxificación de radicales libres por efecto del paraquat. Basado en Ashton y Crafts (1973) y Cobb (1992).

En condiciones normales (sin la presencia de herbicidas), las plantas, ya sea por razones bióticas o abióticas, generan una cierta cantidad de radicales libres como el $^1O_2$, lo que se conoce como "estrés oxidativo". Muchos de estos radicales pueden ser reorientados para la formación de $NADP^+$ a través de la acción de detoxificación de la glutationa. Cuando este sistema de disipación de radicales libres se ve sobrepasado (en presencia de paraquat, por ejemplo), la planta es incapaz de manejar la alta concentración de estos radicales, que a su vez generan otros compuestos químicos altamente reactivos (OH^-, $^1OH^-$ y ^2O), los cuales contribuyen a la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, produciendo una rápida destruí-

ción del tejido. De allí que el daño que producen los bipiridilios sobre las plantas susceptibles se manifiesta rápidamente, siendo evidente en las primeras 2 a 4 horas luego de la aplicación. De hecho, el conocido efecto de "contacto" que poseen estos herbicidas se debe a la rapidez con que destruyen el tejido foliar, lo que impide su translocación a través de la planta. Los daños comienzan a manifestarse con signos de deshidratación del tejido tratado, seguido de un "bronceado" de las hojas (adquieren una coloración oscura), que se tornará en poco tiempo en una necrosis.

Los trabajos con plantas resistentes a paraquat indican que la resistencia a este herbicida se origina en la modificación de la cadena transportadora de electrones. Chase *et al.* (1998) indican que las plantas de *Solanum americanum* Mill. resistentes producen valores de fluorescencia más altos que las plantas susceptibles en la ausencia del herbicida, lo que sugiere que existe una modificación en la cadena transportadora de electrones y que dicha modificación juega un papel crucial en el mecanismo de resistencia al herbicida, ya que limita el flujo de electrones entre los fotosistemas II y I, reduciendo significativamente el daño que produce el herbicida, al igual que la capacidad fotosintética de la planta.

Cuadro IV.2. Herbicidas secuestradores de electrones a nivel del fotosistema I.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
D	Bipiridilios	Diquat Paraquat

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Los herbicidas que secuestran electrones a nivel del fotosistema I son conocidos como herbicidas "fotodinámicos" o herbicidas que necesitan luz para ejercer su mecanismo de acción; esto se explica por la necesidad de que el sistema de transferencia de electrones en el proceso fotosintético esté en funcionamiento para "suplir" de electrones al sistema de formación de radicales libres por efecto de la presencia de herbicidas bipiridilios. Una aplicación de estos herbicidas sobre plantas susceptibles en ausencia de luz no genera el rápido daño descrito. Sin embargo, puede ocurrir la muerte de las plantas sobre las que se han aplicado estos herbicidas y se mantienen en oscuridad, ya que estos herbicidas pueden actuar sobre el transporte de electrones en el proceso respiratorio, afectando la respiración celular (Rao, 2002). Algunos autores afirman que el proceso de transporte de electrones en el proceso de respiración puede proveer electrones para que el proceso de formación de radicales oxidantes antes descrito suceda (Fleck y Vidal, 2001), por lo que el daño a las membranas celulares por efecto de dichos radicales pudiera producirse también en células no cloroplásticas.

Las aplicaciones nocturnas de bipiridilios pueden permitir una translocación limitada del herbicida dentro de la planta; esta mejor distribución del herbicida en la planta puede favorecer la destrucción del tejido al momento de recibir la luz solar (Ashton y Crafts, 1973). Esta técnica ha sido utilizada con éxito en algunos países (por ejemplo U.S.A. y Canadá), pero una fuerte limitación a su aplicación es la relativa alta toxicidad de estos herbicidas, ya que, por ejemplo, las formas comerciales de paraquat están clasificadas como altamente tóxicas en la mayoría de los países donde esta permitido su uso, lo que supone un riesgo de intoxicación muy alto para los operadores cuando la aplicación se realiza en condiciones nocturnas.

2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos:

Los lípidos son compuestos de gran importancia para el metabolismo vegetal, siendo componentes básicos de la estructura de la membrana celular. Cualquier proceso que afecte la síntesis de lípidos bloquea la formación de glicerolípidos y fosfolípidos, que resulta en una fuerte inhibición de la formación de la membrana celular, afectando en especial el desarrollo de los tejidos jóvenes. Otros compuestos importantes que dependen de los ácidos grasos para su síntesis son los compuestos de almacenamiento de muchas semillas y las ceras cuticulares (Heldt, 1997).

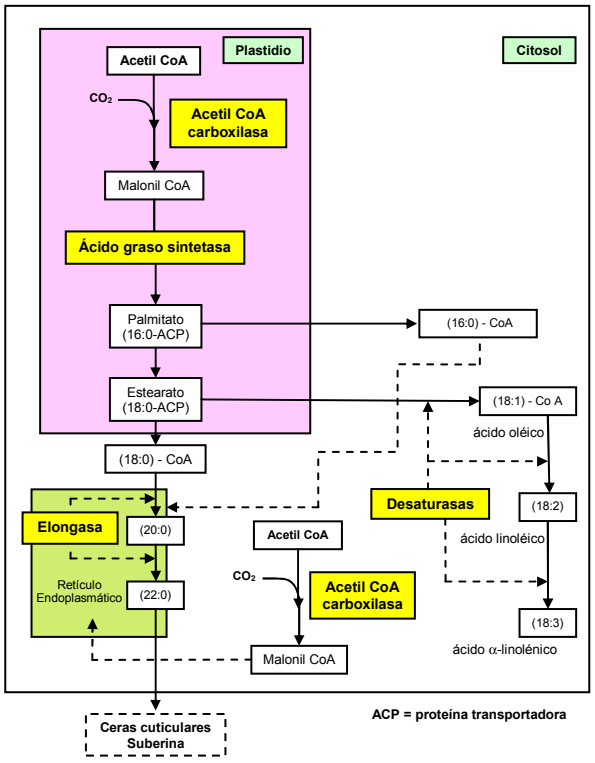

Figura IV.9. Esquema general de la síntesis de ácidos grasos en células vegetales. Basado en Salisbury y Ross (1992) y Buchanan *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

La síntesis de lípidos comienza con la síntesis de ácidos grasos, que luego de sufrir una serie de uniones y condensaciones, producen cadenas más o menos

largas de lípidos, saturados o no. El proceso comienza en los plastidios con la formación de Malonil CoA a partir de la Acetil CoA; este Malonil CoA se condensará con Acil-ACP para la formación de Malonil-ACP, que luego de un grupo de cuatro ciclos formará las cadenas básicas de 16 ó 18 carbonos para la formación de ácidos grasos. Gran parte de estas cadenas de 16 y 18 carbonos serán exportados al citoplasma, donde se convertirán en ácidos grasos de cadena larga (20 ó más carbonos) o sufrirán subsecuentes insaturaciones por el efecto de enzimas "elongasas" o "desaturasas", respectivamente (Salisbury y Ross, 1992; Buchanan *et al.*, 2002). Varios grupos químicos de herbicidas intervienen en la síntesis de lípidos, diferenciándose en el punto y la forma de la intervención.

2.1.- Herbicidas inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa:

La enzima acetil coenzima A carboxilasa es una enzima determinante en la síntesis *de novo* de ácidos grasos y es responsable de la conversión de Acetil CoA a Malonil CoA. Como otras enzimas carboxilasas, esta enzima contiene una secuencia de unión al biotin, un alto contenido de prolina y el típico mecanismo de "ping-pong" para las enzimas carboxilasas asociadas al biotin (Incledon y Hall, 1997). La Acetil CoA carboxilasa se encuentra tanto en los plastidios como en el citoplasma de las células vegetales cloroplásticas (Sasaki *et al.*, 1995). La Acetil CoA carboxilasa presente en los plastidios cataliza la formación de Malonil CoA a partir de Acetil CoA y que, luego de una larga serie de reacciones enzimáticas, formarán lípidos de cadena corta. Estos lípidos de cadena corta son transportados fuera del plastidio para su posterior elongación. La Acetil CoA carboxilasa presente en el citoplasma cataliza la reacción para la formación del Malonil CoA necesario para la elongación de los lípidos, que se realiza en la membrana del retículo endoplásmatico (Duke y Dayan, 2001).

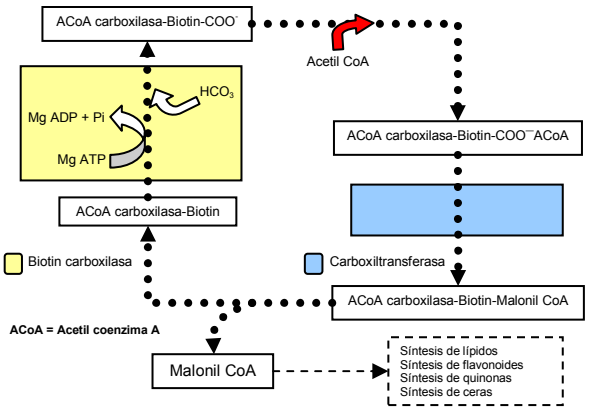

Figura IV.10. Funcionamiento hipotético de la acetil coenzima A carboxilasa. Tomado de Cobb (1992). Adaptado por Anzalone.

La reacción que cataliza la Acetil CoA carboxilasa sucede en dos pasos básicos: (1) la carboxilación del biotin covalente (actividad biotin carboxilasa) y (2) la transferencia del grupo carboxil al Acetil CoA (actividad carboxiltransferasa). Estudios hechos por Zagnitko *et al.* (2001) indican que los ariloxifenoxi-propianatos y las ciclohexanodionas compiten por el sitio de la transcarboxilasa (carboxiltransferasa), uniéndose en un punto muy cercano a ese dominio en la enzima Acetil CoA carboxilasa, lo que inhibe su acción.

Está ampliamente demostrado que los herbicidas ariloxifenoxipropianatos y las ciclohexanodionas actúan inhibiendo la Acetil Coenzima A carboxilasa, pero existen discrepancias en si este es el único mecanismo de acción importante de los herbicidas pertenecientes a estos grupos. Posteriormente se detallarán otras formas de cómo estos herbicidas actúan sobre el metabolismo de las plantas.

De acuerdo a la sensibilidad de la enzima Acetil CoA carboxilasa para ser inhibida por herbicidas, se ha planteado que existen dos formas: una forma resistente a la acción herbicida y una forma sensible a herbicidas, que es un polipéptido multifuncional y es semejante a la presente en las células eucarióticas (Sasaki *et al.*, 1995; Incledon y Hall, 1997; Vidal y Merotto, 2001). En las dicotiledóneas predomina el tipo de enzima resistente a herbicidas, en especial en los plastidios, mientras que las gramíneas poseen la forma sensible de la enzima en ambos compartimentos celulares, haciendo que este grupo de plantas sea altamente sensible a la acción de herbicidas que inhiben la Acetil CoA carboxilasa. De hecho, se ha demostrado que algunas especies de plantas dicotiledóneas sensibles a la acción de los inhibidores de la Acetil CoA carboxilasa (ej: *Erodium moschatum* L.) poseen dicha sensibilidad por la presencia de la enzima del tipo sensible en plastidios, tal como la presente en células eucarióticas (Christopher y Holtum, 1998).

Entre los síntomas iniciales que producen los ariloxifenoxipropianatos sobre las plantas susceptibles se incluyen: (1) inhibición del crecimiento en los meristemas apicales e intercalares dentro de las 2 a 4 horas posteriores al tratamiento, con clorosis en el área tratada; (2) rápido e irreversible daño (6 a 8 horas después del tratamiento) sobre toda la planta en condiciones de campo; (3) pérdida de la integridad de la membrana plasmática a 12 horas después del tratamiento en condiciones de campo; (4) Inhibición de la ATPasa; (5) inducción de etileno; (6) rápidos cambio en los perfiles de lípidos con inhibición de la síntesis de lípidos, la cual muchas veces es leve y (7) antagonismo en la fitotoxicidad con compuestos auxínicos, ácido abscísico, estrés hídrico, antioxidantes e inhibidores de la lipoxigenasa (Shimabukuro *et al.*, 2001). Es común que en los primeros 10 a 12 días luego del tratamiento, las hojas ya desarrolladas de las plantas tratadas no presenten signos de daño; sin embargo, en las hojas jóvenes se observarán daños en las bases, lo que permite removerlas con facilidad. Posteriormente la planta tratada se tornará de color púrpura, con aparición de necrosis, aunque las hojas adultas pueden

permanecer verdes por un largo tiempo. Dosis subletales de estos herbicidas pueden producir en gramíneas susceptibles clorosis en bandas a lo largo de la hoja, daño en entrenudos y tallos y paralización del crecimiento en brotes jóvenes, dependiendo de la dosis y del estado de crecimiento de la planta (Peterson *et al*., 2001). Muchos de estos efectos no poseen relación directa con la síntesis *de novo* de lípidos, por lo que se han propuesto diferentes modelos para el mecanismo de acción de herbicidas como el diclofop-metil y otros ariloxifenoxipropianatos.

Estudios de la acción herbicida del diclofop-metil apuntan hacia una acción sobre el ensamblaje de la membrana plasmática que implica el colapso del gradiente transmembrana de protones, resultando en una rápida respuesta múltiple que incluye catabolismo de los lípidos y estrés oxidativo (Shimabukuro y Hoffer, 1996; Shimabukuro *et al.*, 2001).

La pérdida de la integridad de la membrana y la inactivación de la proteína ATPasa, entre otras respuestas de la planta a la presencia de estos herbicidas, pueden estar envueltas en la conocida inducción a la senescencia que se atribuye a los compuestos de este grupo y que puede ser iniciada por el efecto sobre la membrana plasmática. La peroxidación de los lípidos y la oxidación por radicales libres, reacciones básicas de la senescencia, están implicadas en la acción de los ariloxifenoxipropianatos para causar el rápido daño celular reportado. Al parecer, el incremento de la producción de etileno en plantas susceptibles tratadas con herbicidas ariloxifenoxipropianatos está relacionado con la "senescencia acelerada" que produce la acción de estos compuestos sobre las membranas (Cobb, 1992). Así, la acción antiauxínica de los ariloxifenoxipropianatos y la acción detrimental de estos compuestos sobre la membrana plasmática parecen poseer una especial importancia en algunas plantas, ya que en estos casos predominan los signos de daños asociados a una "senescencia acelerada" sobre los típicos síntomas ocasionados por la inhibición de la síntesis de lípidos (Barnwell y Cobb, 1993).

La acción antiauxínica de los herbicidas ariloxifenoxipropianatos posee importancia dentro de su acción fitotóxica total sobre las gramíneas y merece una consideración agronómica que es importante resaltar: está contraindicada la mezcla de estos productos con herbicidas de tipo hormonal o auxínicos, ya que esto resulta en fallas en el control de las gramíneas y daños al cultivo (Barnwell y Cobb, 1993). También es necesario considerar la separación de las aplicaciones de estos tipos de herbicidas con al menos 7 días de diferencia, para así evitar el efecto antagónico.

Las formas ester de los ariloxifenoxipropianatos son las más utilizadas en la actualidad por su capacidad de ser fácilmente absobidos por las plantas; sin embargo, se estudia la capacidad de los ácidos libres de los ariloxifenoxipropianatos como herbicidas y el aprovechamiento de los cambios entre las formas (S) enantiómeros y las mezclas racémicas hacia las formas (R), que son siempre más activas (Ross y Lembi, 1999).

Cuadro IV.3. Herbicidas inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
A	Ariloxifenoxipro-pianatos	Clodinafop-propargil Cihalofop-butil Diclofop-metil Fenoxaprop-P-etil Fluazifop-P-butil Haloxifop-R-metil Propaquizafop Quizalofop-P-etil
	Ciclohexanodionas	Alloxidim Butroxidim Clefoxidim Cletodim Cicloxidim Profoxidim Setoxidim Tepraloxidim Tralkoxidim

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Especies de malezas gramíneas como *Sorghum halepense* L. Pers., *Cynodon dactylon* L. Pers. *Echinochloa crus-galli* L. Beauv. y especies de los géneros *Digitaria* y *Setaria* son eficientemente controladas por herbicidas como el fluazifop-P-butil (Mamarot y Rodríguez, 2003; Monaco *et al*., 2002).

2.2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos sin inhibición de la acetil coA carboxilasa o inhibidores de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga:

Los ácidos grasos de cadena larga se sintetizan por enzimas denominadas "elongasas", que agregan dos moléculas de carbono por vez a una molécula base de Acil CoA por medio de una serie de pasos donde se utiliza al Malonil CoA como fuente de carbono. Las elongasas se encuentran unidas a la membrana del retículo endoplasmático y, como se comentó, catalizan la elongación de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos para formar largas cadenas de ácidos grasos saturados.

Los lípidos de cadena larga (más de 20 carbonos) y algunos compuestos derivados poseen un papel muy importante en la estructuración de la membrana plasmática, su estabilización (como ácidos grasos polinsaturados o cerebrosidos) y en la protección de las hojas, por la formación de ceras cuticulares (Schmalfuß *et al.*, 2000; Duke y Dayan, 2001). Además, los lípidos y sus derivados pueden constituirse como importantes compuestos de reserva energética de las plantas.

Existen discrepancias en la clasificación de los herbicidas que inhiben la síntesis de ácidos grasos de cadena larga; sin embargo, los estudios sobre este tema indican que tanto los herbicidas agrupados como "inhibidores de la síntesis de lípidos sin inhibición de la Acetil CoA carboxilasa" y los herbicidas "inhibidores

de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga" parecen actuar de la misma forma, inhibiendo el complejo de enzimas elongasas. Así mismo, los herbicidas pertenecientes al grupo de las cloroacetamidas y otros herbicidas (incluídos en el grupo K3 del Cuadro IV.4) son clasificados como "herbicidas inhibidores del crecimiento", pero su acción principal la ejercen sobre la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Duke y Dayan, 2001), si bien puedan tener mecanismos de acción secundarios que en algunos casos puedan contribuir en la acción tóxica de estos productos.

Cuadro IV.4. Herbicidas inhibidores de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
N	Tiocarbamatos	Butilato Cicloato Dimepiperato EPTC Esprocarb Molinato Orbencarb Pebulato Prosulfocarb Tiobencarb=bentiocarb Tiocarbazil Triallato Vernolato
	Fosforoditioatos	Bensulide
	Benzofuranos	Benfurasato Etofumesato
	Acidos cloro-carbónicos	Dalapon Flupropanato TCA
K3	Cloroacetamidas	Acetocloro Alacloro Butacloro Dimetacloro Dimetanamida Metazacloro Metolacloro S-metolacloro Patoxamida Pretilacloro Propacloro Propisocloro Tenilcloro
	Acetamidas	Difenamida Napropamida Naproanilida
	Oxiacetamidas	Flufenacet Mefenacet
	Tetrazolinonas	Fentrazamida
	OTROS	Anilofos Cafenstrole Piperofos

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Es importante resaltar que, de acuerdo al nivel de conocimiento del que se dispone en la actualidad, parece incorrecto denominar a las cloroacetamidas, las acetamidas, oxiacetamidas y otros herbicidas como inhibidores del crecimiento, ya que esta forma de denominar el mecanismo de acción es inespecífico del sitio donde actúan dichos herbicidas. Además, prácticamente todos los mecanismos de acción de los herbicidas desembocan en la inhibición del crecimiento de las plantas tratadas como efecto general, por lo que se debe evitar utilizar la denominación de inhibidores de crecimiento en adelante.

Los herbicidas del grupo de los tiocarbamatos y las cloracetamidas son los grupos más importantes que poseen como mecanismo de acción la inhibición del complejo de enzimas elongasas. Estudios de cinética sugieren que estos herbicidas se unen de forma fuerte e irreversible al sistema de condensación de la enzima elongasa (Duke y Dayan, 2001). Por su parte, Gronwald (1991) sugiere que debido a la conformación estructural de las moléculas del grupo de los tiocarbamatos, estos herbicidas poseen la capacidad de inhibir la síntesis de Acetil CoA, mientras otros autores aseguran que es el derivado sulfóxido de los tiocarbamatos el que produce este efecto, que desequilibra el proceso de síntesis de lípidos.

Las cloroacetamidas tienen la capacidad de disminuir el contenido de ácido linolénico e incrementar los niveles de ácido línoléico y ácido oleico (Cobb, 1992), por lo que se especula que las cloroacetamidas también pueden inhibir la actividad de las enzimas desaturasas, que catalizan el proceso de desaturación de los ácidos grasos. Diferentes estudios han confirmado que las cloroacetamidas, en especial el alacloro y metolacloro, afectan múltiples procesos metabólicos como la síntesis de ARNm o el metabolismo de la Coenzima A (Rao, 2002). Estos herbicidas también poseen efecto sobre la síntesis de proteínas en plántulas y semillas en germinación, por lo que se consideran inhibidores del crecimiento y se utilizan en aplicaciones al suelo. Otro grupo de herbicidas, las piridazinonas sustituidas, poseen como mecanismo de acción secundario la inhibición de la síntesis de lípidos. Ellos pueden inhibir la Δ_{15}-desaturasa para evitar la síntesis del ácido α-linoléico; en otros casos pueden inhibir la formación de trans-Δ_3-hexadecanoato por la inhibición de la Δ_9-desaturasa.

Entre los daños que destacan en plantas gramíneas tratadas con tiocarbamatos se encuentran fallas en la emergencia de los brotes desde el coleoptilo y en la emergencia de plántulas desde el suelo. En hojas anchas es común observar cotiledones alargados, poco desarrollo de las primeras hojas verdaderas, que manifiestan un color verde oscuro; las raíces se desarrollan muy poco y con malformaciones evidentes. Los daños causados por las cloroacetamidas son similares a las descritas para los tiocarbamatos, pero su efecto sobre la emergencia de las plántulas desde el suelo es mucho mayor, de allí que en un principio se les denominara como inhibidores del crecimiento.

Las plantas tratadas con herbicidas que inhiben la síntesis de lípidos también presentan una cutícula más delgada y menos hidrofóbica, que facilita la penetración

de los herbicidas que se apliquen con posterioridad. A este proceso se le denomina "sensibilización" o "pre-acondicionamiento" de las plantas (Dinelli y Catizone, 2001) y puede ser utilizado para el control de especies que posean cutícula foliar muy gruesa que impida la penetración de los herbicidas vía foliar.

La enzima linolato monogalactosildiacilglicerol desaturasa ha sido reportada como el punto de acción de algunos herbicidas inhibidores de la síntesis de carotenoides, específicamente aquellos que actúan sobre la fitoeno desaturasa. Esta enzima cataliza la síntesis de linolato a partir de (C18:3)-linolenato (Wakabayashi y Böger, 2004b), lo que representa una oportunidad de estudio como nuevo mecanismo de acción para herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos.

3.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos:

La síntesis de aminoácidos es un proceso complejo que incluye varias rutas y procesos. Se puede considerar que el final del proceso de la asimilación de nitrógeno en las plantas es la síntesis de una gran cantidad de aminoácidos, que serán la base para la síntesis de las proteínas. Las proteínas cumplen funciones básicas dentro de las células, destacando de entre ellas la capacidad catalítica de las enzimas, que son la base del metabolismo celular y controlan los múltiples y complejos procesos que se suceden en todas las rutas de anabolismo y catabolismo celular.

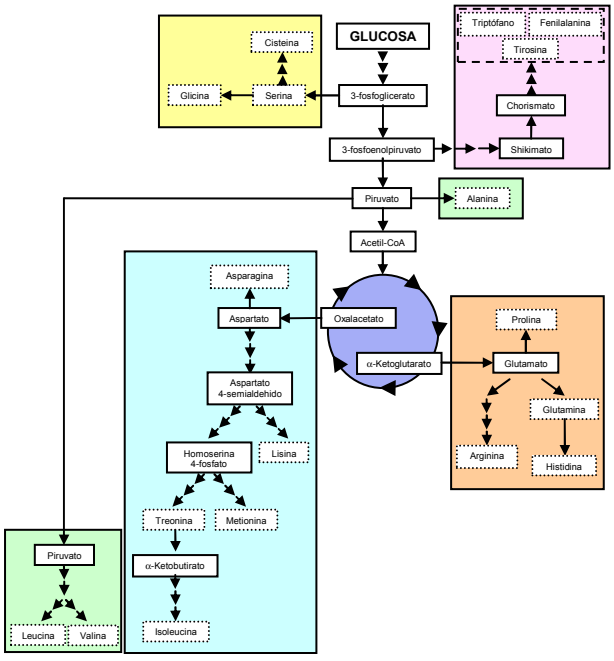

Figura IV.11. Esquema general de la síntesis de aminoácidos. Tomado de Buchanan *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

No se ha demostrado que algún herbicida inhiba la síntesis de proteínas de manera directa; ellos afectan este proceso de manera indirecta, a través de la inhibición de la síntesis de los aminoácidos constitutivos de las proteínas. La asimilación del CO_2 en el proceso fotosintético en las plantas y el ensamblaje de los compuestos carbonados en el ciclo de Calvin suplen los esqueletos carbonados que servirán de base para la formación de los aminoácidos, ya sea por exportación directa desde los cloroplastos o por la respiración de moléculas de azúcares originadas en la fotosíntesis.

3.1.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de amino-ácidos de cadena ramificada:

Los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina, también llamados aminoácidos hidrofóbicos, se producen por la acción catalítica de la enzima acetolactato sintetasa (ALS), conocida también como acetohidroxibutirato sintetasa (AHAS). La reacción catalizada por la ALS consiste en la condensación de dos moléculas de piruvato para formar α-Acetolactato, el precursor de la leucina y valina. La enzima también puede llevar a cabo la misma reacción con piruvato y α-Ketobutirato para formar α-Aceto-α-Hidroxibutilato, el precursor de la isoleucina (Osuna *et al.*, 2001).

La ALS es la primera enzima común en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (Stidham, 1991). Cuando esta enzima es inhibida, la mayoría de las plantas se ven afectadas directamente por la inhibición en la síntesis de los aminoácidos antes descritos, pero otras plantas también se ven afectadas por la acumulación del α-Ketobutirato, un sustrato fitotóxico de la ALS que es utilizado sólo en la síntesis de la isoleucina.

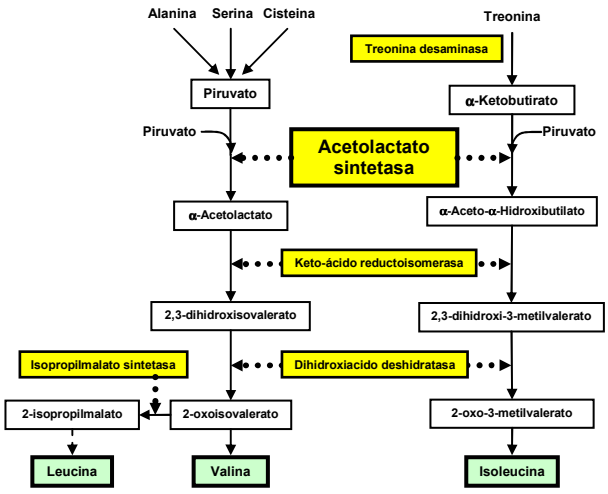

Figura IV.12. Síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, valina e isoleucina). Se destaca la acción de la acetolactato sintetasa (ALS) y de otras enzimas claves en el proceso. Basado en Heldt (1997) y Cobb (1992). Adaptado por Anzalone.

La inhibición de la enzima ALS por herbicidas parece suceder por una unión herbicida-enzima en un sitio diferente del sitio activo de la enzima. Esta unión produce que la actividad de la enzima se vea afectada, pero, por ser una unión en el sitio no activo de la

enzima, cambios en dicho sitio por mutaciones que eviten la unión herbicida-enzima no afectan de forma significativa la actividad de la enzima; de allí puede explicarse la razón de la rápida evolución de malezas con resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS (Duke y Dayan, 2001). Por ejemplo, Maertens *et al.* (2004) encontraron que la modificación en el residuo 574 de la ALS en la maleza *Amaranthus hybridus* L. es la responsable de la resistencia de algunas poblaciones de esta especie a herbicidas inhibidores de la ALS. Además, estas poblaciones presentaron también modificaciones en el residuo 264 de la proteína D1 lo que también les confiere resistencia a herbicidas inhibidores de la fotosínteis a nivel del fotosistema II.

Como resultado de la inhibición de la ALS se observa (Duke y Dayan, 2001): (1) interrupción de la mitosis; (2) reducción en los niveles de aminoácidos de cadena ramificada; (3) incrementos en los niveles de α-Ketobutirato, compuesto que puede ser tóxico para algunas especies; (4) aumento en los niveles de antocianinas; (5) interrupción general del metabolismo de aminoácidos; (6) paralización del crecimiento y (7) se produce una pronunciada disminución de la síntesis de ADN (Ray, 1982). También se han realizado estudios que indican que la paralización en la síntesis de valina y leucina puede generar deficiencias de un intermediario de dicha ruta de síntesis, el ácido cetoisovalérico, que es necesario para la síntesis de Acetil CoA, un importante intermediario de muchas rutas metabólicas en vegetales (Trezzi y Vidal, 2001).

Los síntomas evidentes del daño causado por herbicidas con este mecanismo de acción no se observan hasta unos 6 a 10 días después del tratamiento, aunque el crecimiento se detiene de forma inmediata. Las plantas susceptibles pueden presentar clorosis intervenal o en bandas (gramíneas), coloración rojiza de las hojas y poco desarrollo de raíces. Este conjunto de síntomas producen una muerte progresiva de la planta.

Los herbicidas inhibidores de la ALS incluyen un grupo de familias químicas de herbicidas muy importante y son ampliamente utilizados en los principales cultivos agrícolas. Las sulfonilureas, imidazolinonas y pirimidilthiobenzoatos son herbicidas promisorios para el control de especies de importancia económica en el cultivo del arroz, entre otros. Por ejemplo, el bentazone ha sido utilizado con éxito en el control de *Cyperus esculentus* L., *Cyperus ferax* L.C. Rich. y *Cyperus iria* L., tres de las especies ciperáceas más importantes en el trópico, mientras que el herbicida bispyribac sodio es eficiente en el control de varias especies gramíneas (entre ellas las más importantes del género *Echinochloa*) y especies de hoja anchas de diferentes géneros comunes en el cultivo de arroz como *Ludwigia*, *Aeschynomene* y *Ammania* (Rijn, 2000).

Las enzimas treonina desaminasa, keto-ácido reductoisomerasa y isopropilmalato sintetasa están siendo estudiadas como puntos de inhibición de nuevos herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. De hecho, los compuestos N-isopropiloxalil hidroxamato y el ácido 2-dimetilfosfinoil-2-hidroxiacetico se han reportado como fuertes inhibidores de la enzima keto-ácido reducto-isomerasa, aunque hasta ahora han demostrado poca eficacia como herbicidas (Wakabayashi y Böger, 2004b).

Cuadro IV.5. Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
B	Imidazolinonas	Imazametabenz-metil Imazamox Imazapic Imazapir Imazaquin Imazetapir
	Triazolopirimidinas	Cloransulam-metil Diclosulam Florasulam Flumetsulam Metosulam Penoxsulam
	Pirimidinil(tio)-benzoatos	Bispiribac-Na Piribenzoxim Piriftalid Piriminobac-metil Piritiobac-Na
	Sulfonilamino-carboniltriazolinonas	Flucarbazone-Na Propoxicarbazone-Na
B	Sulfonilureas	Amidosulfuron Azimsulfuron Bensulfuron-metil Cinosulfuron Clorimuron-metil Clorsulfuron Ciclosulfamuron Etametsulfuron-metil Etoxisulfuron Flazasulfuron Flupirsulfuron-metil-Na Foramsulfuron Halosulfuron-metil Imazosulfuron Iodosulfuron Mesosulfuron Metsulfuron-metil Nicosulfuron Oxasulfuron Primisulfuron-metil Prosulfuron Pirazosulfuron-etil Rimsulfuron Sulfometuron-metil Sulfosulfuron Tinfesulfuron-metil Tiameturon-metil Triasulfuron Tribenuron-metil Trifloxisulfuron Triflusulfuron-metil Tritosulfuron

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

3.2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de amino-ácidos aromáticos:

Los herbicidas que se clasifican como inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos no sólo restringuen su acción a la inhibición de estos aminoácidos, sino también inhiben la síntesis de otros compuestos aromáticos como el ácido *p*-aminobenzoico, la ubiquinona, el ácido fólico, las vitaminas E y K, lignina y flavonoides. La síntesis de estos compuestos se origina de un compuesto común llamado shikimato. Debido a que la suma de esos productos pueden constituir una gran proporción del total de la materia celular (en algunos casos representan más del 50% del peso seco de algunas plantas y el 20% del carbón fijado por la fotosíntesis), la ruta del shikimato o ácido shikímico es considerada una de las rutas metabólicas de mayor importancia en las plantas (Heldt, 1997). Los herbicidas que inhiben esta ruta bloquean de forma efectiva el crecimiento y desarrollo de las plantas (Rao, 2002).

Si bien la ruta del shikimato no se restringe sólo a la formación de aminoácidos arómaticos, estos compuestos son precursores en la síntesis de una gran cantidad de compuestos aromáticos en plantas, por lo que son importantes en variados procesos metabólicos en células vegetales (Buchanan *et al.*, 2002).

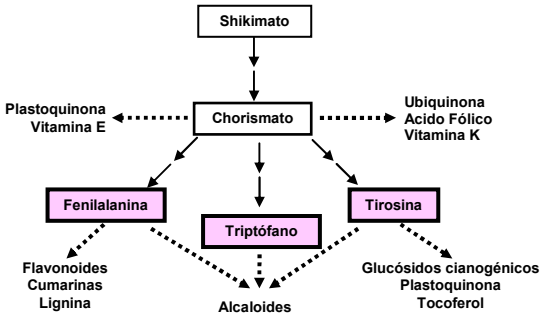

Figura IV.13. Metabolitos secundarios originados a partir de precursores en la ruta del shikimato. Tomado de Heldt (1997) y Rao (2002). Adaptado por Anzalone.

Los precursores de los aminoácidos aromáticos son la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato; estos compuestos, luego de sufrir una condensanción, deshidratación y posterior reducción del grupo carbonil, forman *shikimato*. Con la adición de ATP a esta molécula se forma shikimato 3-fosfato, que por condensación con fosfoenolpiruvato y la acción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa) formará *5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato* (EPSP). La remoción de un fosfato del EPSP formará *chorismato*, compuesto clave en las rutas del metabolismo secundario en plantas y precursor de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina (Heldt, 1997; Duke y Fayan, 2001; Dinelli y Catizone, 2001).

Los herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos (como el glifosato) actúan inhibiendo la acción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa), por lo que se inhibe la síntesis de chorismato y, en consecuencia, la síntesis de triptófano, tirosina y fenilalanina (Cobb, 1992).

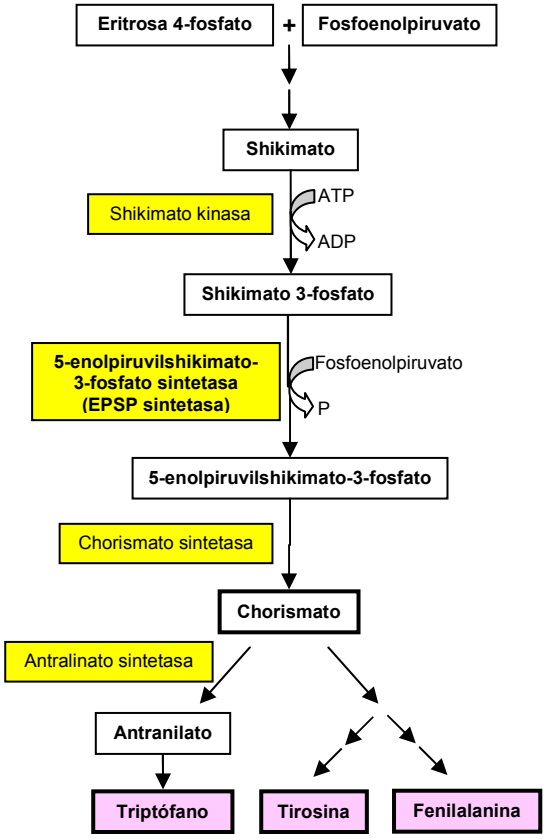

Figura IV.14. Acción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSP) en la síntesis de los aminoácidos triptofano, tirosina y fenilalanina. Tomado de Heldt (1997). Adaptado por Anzalone.

El primer efecto de la inhibición de la enzima EPSP sintetasa es una fuerte acumulación de shikimato y sus derivados; también se genera una deficiencia de arogenato, un controlador de la primera enzima en la ruta de síntesis del shikimato, la DAHPS (3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato-sintetasa). Los bajos niveles de arogenato producen un aumento en la actividad de la DAHPS por lo que el proceso de síntesis de shikimato es descontrolado. La gran cantidad de carbón que se almacena en forma de shikimato proviene directamente de la fotosíntesis y, como respuesta al aumento en la concentración de shikimato, se produce una fuerte reducción del proceso fotosintético. Esto explica el hecho que plantas tratadas con herbicidas como el glifosato detienen el proceso fotosintético, inclusive mucho antes de que la inhibición en la síntesis de aminoácidos puede ser detectada (Duke y Dayan, 2001). La suma de todos estos procesos produce una lenta muerte de las plantas tratadas, que muestran clorosis y posterior necrosis.

El glifosato se une fuertemente al complejo EPSP sintetasa-shikimato 3-fosfato, restringiendo la entrada

del fosfoenolpiruvato. En las plantas la EPSP sintetasa se sintetiza en el citoplasma y entra en el cloroplasto en forma de una proenzima; el glifosato también puede unirse a ésta proenzima (Trezzi *et al.*, 2001), aumentando su acción inhibitoria sobre el proceso de formación de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato.

La inhibición de la enzima EPSP no es la única razón por la cual el glifosato causa la muerte en las plantas susceptibles; existe gran cantidad de evidencias que indican que mucha de la toxicidad que produce el glifosato es resultado de una profunda alteración del metabolismo del carbono producida por la desregulación de la ruta del shikimato (Shiel, 1997; citado por Duke y Dayan, 2001). Otro efecto significativo del glifosato en las plantas es el incremento en la descomposición del ácido indol acético (IAA) y la inhibición de la síntesis de porfirina (Rao, 2002).

Cuadro IV.6. Herbicidas inhibidores de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa.

Grupo HRAC	Familia Química	Ingredientes activos
G	Glicinas	glifosato sulfosato = glifosato trimesio

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

El glifosato es hoy uno de los herbicidas postemergentes no selectivos más importantes del mundo. Este herbicida se utiliza de forma regular en muchos cultivos, áreas no cultivadas, bordes de caminos, cultivos bajo sistemas de mínima labranza y labranza cero y en grandes zonas de cultivos transgénicos resistentes al herbicida como maíz y soya.

Un potencial punto de acción de los nuevos herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos es la inhibición de la enzima antralinato sintetasa. El compuesto ácido 6-metil antranílico ha sido reportado como inhibidor de la acción de esta enzima (Siehl y Subramanian, 1997) y posee características favorables para ser desarrollado como herbicida.

3.3.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de glutamina:

La glutamina es un aminoácido de especial importancia en el ciclo del nitrógeno en las plantas, ya que juega un papel principal en el reciclaje del amonio producido en la fotorespiración y el catabolismo de proteínas; el amonio producido en estos procesos es asimilado (o reasimilado) por la actuación en serie de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT–glutamina 2-oxoglutarato amino transferasa). En un primer paso la glutamina sintetasa transfiere NH_4^+ a una molécula de glutamato (con utilización de ATP) para formar glutamina; en el segundo paso se cataliza la transferencia reductiva del grupo amido de la glutamina al carbono 2 del 2-oxoglutarato, produciéndose dos moléculas de glutamato. Tanto la glutamina como el glutamato formado en los cloroplastos serán exportados al citoplasma, donde servirán de base para la formación de otros muchos compuestos. La glutamina junto con la asparagina son los principales compuestos transportadores de nitrógeno en las plantas (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

La glutamina sintetasa (GS) en las plantas es una proteína octamérica con una alta afinidad por el amonio. Existen varias formas de la glutamina sintetasa con diferente composición de subunidades y localización celular; la forma más abundante es la que se encuentra en los cloroplastos y cotiledones verdes, la cual participa en la asimilación del amonio producido en la reducción del nitrato y en la reasimilación del amonio liberado en la fotorespiración, esto último como función principal (Heldt, 1997; Azcón-Bieto y Talón, 2003).

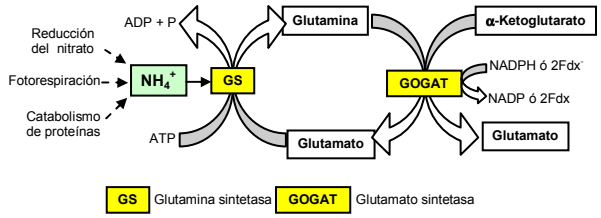

Figura IV.15. Proceso de síntesis de glutamina y glutamato. Basado en Buchanan *et al.* (2002). Adaptado por Anzalone.

El glufosinato de amonio inhibe la acción de la glutamina sintetasa. La estructura de este herbicida es similar a la del glutamato; esta característica permite que cuando la enzima GS cataliza la reacción secuencial de unión ATP-enzima y la posterior entrada de glutamato y amonio para la formación de glutamina, el herbicida pueda fosforilarse e impedir la entrada del glutamato al centro activo de la enzima, inhibiéndole de forma irreversible. Como resultados de la inhibición de la glutamina sintetasa se observa: (1) aumentos en los niveles de amonio; (2) disminución en los niveles de glutamina y glutamato; (3) paralización de la fotorespiración; (4) acumulación de glioxalato; (5) inhibición de la RUBISCO y (6) inhibición de la fotosíntesis asociada a procesos de peroxidación de compuestos por estrés oxidativo. Es probable que la rapidez en la aparición de daños, los cuales son promovidos por la luz, se explique por la acción del glioxalato como inhibidor de la RUBISCO, lo que produce la inhibición del proceso fotosintético (Duke, 2001; Wild y Welter, 1993 citados por Duke y Dayan, 2001). El glioxalato se acumula por efecto de la disminución en los niveles del glutamato exportado desde los cloroplastos, que en condiciones normales formaría glicina. La inhibición de la fotosíntesis produce el comienzo del ciclo de peroxidación de compuestos debido a la incapacidad de los sistemas de disipación de energía para manejar la cantidad de energía que no es consumida por la fotosíntesis; esto produce un rápido daño sobre los tejidos pocas horas después de la aplicación. De igual forma se ha sugerido

que el exceso de amonio puede producir toxicidad en las plantas, al igual que puede inducir la inhibición de la fotosíntesis de forma indirecta. Plantas adultas tratadas pueden producir rebrotes desde yemas axilares.

Cuadro IV.7. Herbicidas inhibidores de la glutamina sintetasa.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
H	Acidos fosfínicos	Glufosinato de amonio Bialafos = bilanafos

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

El glufosinato de amonio se obtiene por la síntesis de un compuesto aislado de la bacteria *Streptomyces viridochromogens* Krainsky y también es conocido como fosfinotricina (Becerril, 1992). Es una mezcla de isomeros *L* y *D*, donde sólo el isomero *L* es activo (Rao, 2002). Por su parte, el bialafos es el único herbicida comercial que se obtiene por procesos de fermentación; este herbicida se convierte en fosfinotricina dentro de las plantas susceptibles, por lo que se conoce como un proherbicida.

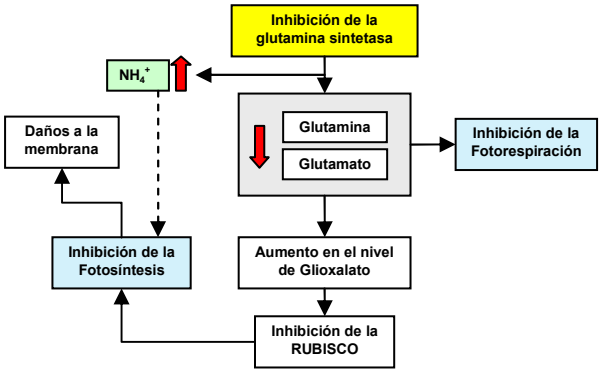

Figura IV.16. Resumen del mecanismo de acción de los herbicidas inhibidores de la síntesis de glutamina. Basado en Duke y Dayan (2001). Adaptado por Anzalone.

3.4.- Otros inhibidores de la síntesis de aminoácidos:

3.4.1.- Inhibidores de la síntesis de asparagina:

La asparagina es un importante aminoácido para el transporte de nitrógeno en las plantas. La síntesis de asparagina a partir del aspartato requiere una fosforilación transitoria del grupo carboxil terminal del aspartato por el ATP, para luego sufrir una aminación con la glutamina (Heldt, 1997) o el amonio (Romagni *et al.*, 2000) como donador de nitrógeno. La ecuación general de la síntesis de la asparagina es:

$$\text{Glutamina+Aspartato + ATP} \longrightarrow \text{Glutamato+Asparagina+AMP+PPi}$$

La reacción es catalizada por la enzima asparagina sintetasa. Existen dos tipos de enzimas asparagina sintetasa, la tipo eucariótica y la procariótica. En las plantas existen los dos tipos de enzima: la enzima tipo eucariótica puede utilizar tanto a la glutamina como al amonio como fuente de nitrógeno para la síntesis de asparagina y es la que más abunda en plantas. La tipo procariótica sólo puede utilizar el amonio como fuente de nitrógeno para la formación de asparagina. La asparagina sintetasa juega un papel importante en la remobilización del nitrógeno en las semillas en germinación, en especial en leguminosas (Romagni *et al.*, 2000), donde las proteínas de almacenaje son convertidas en asparagina para su transporte hacia los meristemas en activo crecimiento (Duke y Dayan, 2001).

La cinmetilina ha sido reportada como una fuerte inhibidora de la asparagina sintetasa y su uso como herbicida está bajo estudio. Este compuesto es similar al monoterpeno 1,4-cineole, un compuesto natural aislado de plantas con alto potencial alelopático. Los primeros reportes hechos por Romagni *et al.* (2001) sugieren que la cinmetilina es un proherbicida que se activa luego de su entrada a la planta, ya que estudios *in vitro* mostraron la incapacidad de este compuesto en inhibir la asparagina sintetasa, lo que sucedió en ensayos *in vivo*. La unión del inhibidor a la enzima parece suceder a través del grupo carboxilo de la cinmetilina, lo que produce una inhibición de las funciones fisiológicas de la asparagina sintetasa; esta inhibición es revertida con la adición de asparagina externa, la cual parece que es tomada por las raíces para compensar la inhibición de la síntesis del compuesto.

3.4.2.- Inhibidores de la síntesis de metionina, histidina y arginina:

Los triazoles, la phaseolotoxina y la rhizobitoxina son inhibidores de las enzimas imidazol-glicerolfosfato deshidratasa, ornitina carbamoiltransferasa y la β-cistationasa respectivamente, las cuales son tres enzimas claves en la síntesis de los aminoácidos histidina, arginina y metionina. Estos compuestos poseen potencial de ser explotados como herbicidas y ya existen moléculas diseñadas por empresas agro-químicas con este fin.

4.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de pigmentos fotosintéticos:

Los pigmentos que son utilizados para el proceso fotosintético son llamados pigmentos fotosintéticos. La luz es absorbida en la fotosíntesis por dos tipos de pigmentos: las clorofilas y los carotenoides. El pigmento fotosintético más importante es la clorofila, ya que es la biomolécula cromófora que interviene más directamente en el proceso de absorción y conversión de la energía luminosa. Existen distintos tipos de clorofilas, pero todas se caracterizan por tener un anillo tetrapirrólico cíclico tipo porfirina, con un catión metálico en el centro del anillo (Mg^{+2}). En las plantas en particular, existen dos tipos de clorofila, la *clorofila a* y la *clorofila b*. Habitualmente, las moléculas de clorofila están asociadas a los polipéptidos constitutivos de las antenas receptoras de luz junto a otros pigmentos; la principal función de estas moléculas de clorofila es

absorber la luz desde dichas antenas (Azcón-Bieto y Talón, 2003; Rao, 2002).

Por su parte, los carotenoides son pigmentos secundarios que se clasifican en *xantofilas* y *carotenos*. Estos pigmentos forman parte de las antenas receptoras de luz y los centros de reacción de los fotosistemas, encontrándose íntimamente relacionados con las clorofilas. La principal función de los carotenoides es proteger al aparato fotosintético de la destrucción por efectos de exceso de energía, mediante procesos de disipación y extinción de energía no procesada en la fotosíntesis. Estos compuestos tienen como función secundaria la de antenas captadoras de luz alternativas, ya que pueden absorber luz en rangos del espectro donde la clorofila no es capaz de hacerlo.

4.1.- Herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno IX oxidasa:

El precursor de la clorofila es el ácido δ-aminolevunílico (AAL); en las plantas este compuesto es formado a partir del esqueleto carbonado que aporta el glutamato, a través de la acción del la enzima AAL sintetasa. Luego de una serie de reacciones metabólicas donde se forman varios compuestos intermedios (porfobilinógeno, uroporfirinógeno III) se forma protoporfirinógeno IX. La formación de protoporfirina IX a partir del protoporfirinógeno IX es un paso crucial en la síntesis de la clorofila y de otros compuestos tipo hemo que poseen en el centro del anillo pirrólico una molécula de hierro (Fe^{+2}). Esta reacción es catalizada por una enzima denominada protoporfirinógeno IX oxidasa (PROTOX), que se encuentra en los cloroplastos y en la membrana mitocondrial.

Los herbicidas que inhiben la síntesis de clorofila actúan inhibiendo la PROTOX. La inhibición de esta enzima por herbicidas se asocia con un enlace del herbicida en el sitio de unión (o cercano a él) de la enzima con el protoporfirinógeno IX. La molécula de protoporfirinógeno IX posee una región lipofílica asociada al anillo tetrapirrólico y una región hidrofílica, asociada a la zona del ácido propiónico de la cadena. La alta afinidad entre los herbicidas que inhiben la PROTOX (como los difeniléteres) y la enzima se ha atribuido a la similitud de dichos herbicidas con una parte de la región hidrofóbica del protoporfirinógeno IX, lo que facilita el enlace (Duke y Dayan, 2001).

La inhibición de la PROTOX resulta en una acumulación del protoporfirinógeno IX en los cloroplastos, que posteriormente difundirá hacia el citoplasma. Esta acumulación sucede debido a que el control sobre la síntesis de porfirinas es realizado por el hemo y, como la inhibición del proceso sucede antes de la síntesis de este compuesto, se sigue sintetizando protoporfirinógeno IX de manera descontrolada. Ya en el citoplasma el protoporfirinógeno IX es oxidado por una enzima citoplasmática aún desconocida, que probablemente posee menor sensibilidad que la enzima PROTOX a la acción inhibitoria de los herbicidas (Yamato *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1999) y se genera protoporfirina IX.

La protoporfirina IX es un compuesto altamente fotodinámico y su oxidación en presencia de luz genera oxígeno activo, que es capaz de producir una rápida peroxidación de los lípidos de la membrana celular, observándose una profunda necrosis en los tejidos tratados, síntoma característico de este grupo de herbicidas. El proceso es alimentado constantemente por un aumento del flujo de carbono desde la fotosíntesis debido a la ausencia de síntesis de clorofila, que es un compuesto regulador de la ruta; esto produce una continua formación de protoporfirinógeno IX que incrementa los daños descritos (Merotto y Vidal, 2001).

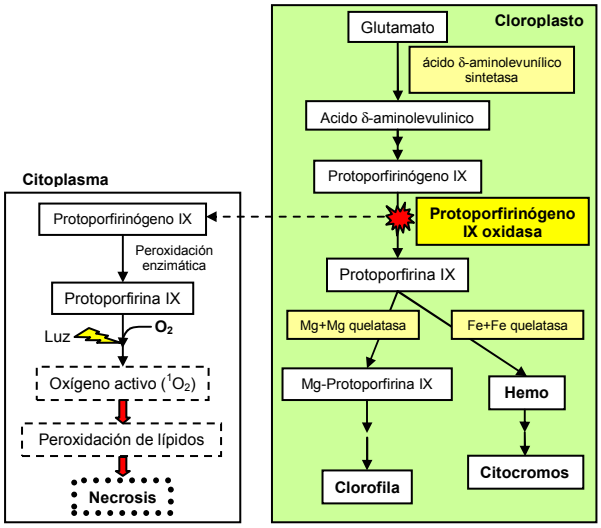

Figura IV.17. Esquema general del mecanismo de acción de los herbicidas inhibidores de la síntesis de clorofila a nivel de la protoporfirinógeno IX oxidasa. Basado en Duke y Dayan (2001). Adaptado por Anzalone.

Matsumoto *et al.* (1999) describieron el mecanismo de tolerancia a los inhibidores de la PROTOX para la especie maleza *Stellaria media* (L.) Vill.; al parecer esta especie escapa al efecto tóxico del herbicida oxifluorfen gracias a su capacidad de evitar la acumulación de la protoporfirina IX en el citoplasma. Este estudio corrobora la tesis de que la acumulación de la protoporfirina IX y su posterior oxidación por efecto de la luz es el mecanismo de acción para los herbicidas inhibidores de la PROTOX.

La inhibición de la PROTOX además de producir los efectos antes descritos impide la síntesis de compuestos complejos como los citocromos y enzimas catalasas y peroxidasas que tiene como precursor la protoporfirina (Dinelli y Catizone, 2001).

El uso de estos herbicidas ha aumentado en las últimas décadas, debido principalmente a su efectiva acción y selectividad, en especial los pertenecientes a los grupos difenil-éteres y oxadiazoles, utilizados en cultivos de leguminosas y cereales como el arroz.

Cuadro IV.8. Herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno IX oxidasa.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
E	Difenil-éteres	Acifluorfen-Na Bifenox Clometoxifen Fluoroglicofen-etil Fomesafen Halosafen Lactofen Oxifluorfen
	Fenilpirazoles	Fluazolato Piraflufen-etil
	N-fenilftalimidas	Cinidon-etil Flumioxazin Flumiclorac-pentil
	Tiadiazoles	Flutiacet-metil Tidiazimin
	Oxadiazoles	Oxadiazon Oxadiargil
	Triazinolinonas	Azafenidin Carfentrazone-etil Sulfentrazona
	Oxazolidinedionas	Pentoxazona
	Pirimidindionas	Benzfendizona Butafenacil
	OTROS	Flufenpir Profluazol Piraclonil

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

4.2.- Inhibidores de la síntesis de carotenoides:

Los carotenoides son compuestos de 40 átomos de carbono (C_{40}) que tienen una estructura principal lineal con grupos metilo cada 4 carbonos. Los carotenoides con algún grupo oxigenado de denominan *xantofilas*, mientras que los que no poseen oxígeno son los *carotenos*. Los principales carotenoides presentes en todo cloroplasto vegetal son α-caroteno, β-caroteno y 5 xantofilas: luteína, violaxantina, anteraxantina, zea-xantina y neoxantina. Como se comentó anteriormente, los carotenoides tienen como función la protección del sistema fotosintético de la acción destructiva del exceso de energía en forma de oxígeno activo o clorofila activada, la cual disipan en forma de calor (Böger y Sandmann, 1998). Los carotenoides también tienen funciones como receptores de luz, son precursores para la síntesis de ácido abscísico y dan el color a flores y frutos para la atracción de polinizadores o agentes de dispersión de semillas (Cunningham y Gantt, 1998).

En las plantas superiores la síntesis de carotenoides se efectúa en los plastos. Este proceso se inicia con la formación del isopentenil pirofosfato, un compuesto que no sólo es clave en la formación de carotenoides, sino también en la síntesis de quinonas, diterpenos, fragancias, esteroles, etc. La unión secuencial de compuestos de 5 carbonos forma el geranilgeranil pirofosfato, que mediante la acción de la enzima fitoeno sintetasa, se condensa con una molécula similar y forman fitoeno. Las repetidas desaturaciones del fitoeno formarán licopeno a través de la intervención de la fitoeno desaturasa y la ζ-caroteno desaturasa. Por último, un conjunto de enzimas ciclasas actúan sobre el licopeno, formando una serie de compuestos, entre los que resalta el β-caroteno, que origina las xantofilas (Heldt, 1997; Azcón-Bieto, y Talón, 2003; Buchanan *et al.*, 2002).

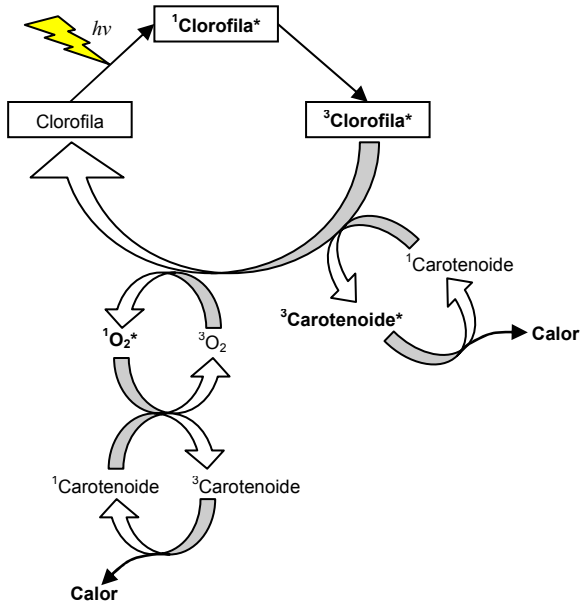

Figura IV.18. Esquema general del proceso de disipación de energía hecha por los carotenoides. Tomado de Cobb (1992). Adaptado por Anzalone.

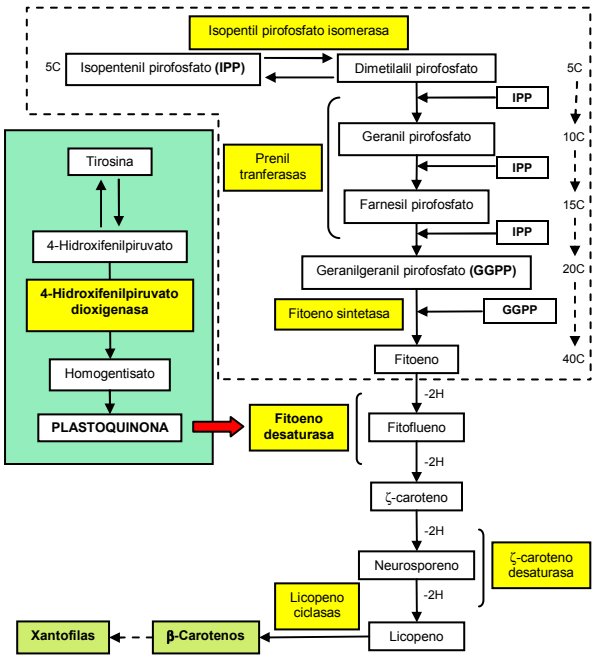

Figura IV.19. Esquema general de la síntesis de carotenoides. Se han destacado las enzimas que son inhibidas por diferentes grupos químicos de herbicidas.

4.2.1.- Herbicidas inhibidores de la fitoeno desaturasa:

La fitoeno desaturasa es la enzima que cataliza dos desaturaciones del fitoeno para formar ζ-caroteno, con la formación del fitoflueno como compuesto intermediario. El proceso de desaturación no se conoce con certeza, pero se sabe que es necesaria la presencia de NADP y plastoquinona, de los cuales la última juega un papel de cofactor para la actividad de la enzima (Cunningham y Gantt, 1998; Böger y Sandmann, 1998; Duke y Dayan, 2001).

Cuadro IV.9. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de carotenos a nivel de la fitoeno desaturasa.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
F1	Piridazinonas	Norflurazon
	Piridinecarboxamidas	Diflufenican Picolinafen
	OTROS	Beflubutamida Fluridona Flurocloridona Flurtamona

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Los herbicidas inhibidores de la fitoeno desaturasa paralizan la síntesis de carotenoides. Estos herbicidas son inhibidores reversibles y no competitivos de la enzima y su acción produce una rápida acumulación de fitoeno y fitoflueno en los plastos (Böger y Sandmann, 1998).

En condiciones de alta intensidad de luz o por algún tipo de estrés el exceso de energía canalizada hacia la fotosíntesis sólo puede ser disipada en forma de fluorescencia o mediante su transferencia al oxígeno, formándose así formas activas de este compuesto. Al ser paralizada la síntesis de carotenoides la función dispidadora de energía de estos pigmentos se vé limitada, lo que genera una acumulación de energía en la molécula de clorofila que produce su desestabilización y posterior destrucción. Este efecto en principio produce una decoloración de los tejidos fotosintéticos (blanqueamiento), seguida de una paralización del crecimiento y una severa necrosis, como resultado de la fotoxidación de las membranas plasmáticas por efecto del oxígeno activo (Dinelli y Catizone, 2001). El blanqueamiento del follaje producto de la destrucción de la clorofila ha hecho que que estos herbicidas se denominen comúnmente como blanqueadores.

4.2.2.- Herbicidas inhibidores de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa:

La enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD) no está incluída dentro del proceso de síntesis de carotenoides. Esta enzima juega un importante papel en la síntesis de plastoquinona, catalizando la formación de homogentisato a partir del 4-hidroxifenil-piruvato en una compleja reacción que comprende la descarboxilación de la cadena del 4-hidroxifenil-piruvato y una hidroxilación del anillo aromático con migración del grupo carboximetil (Duke y Dayan, 2001). El homogentisato formado es la base para la síntesis de plastoquinona, la cual es un cofactor para el funcionamiento de la fitoeno desaturasa. La forma en que la plastoquinoa actúa como cofactor de la fitoeno desturasa no se conoce bien, pero se cree que este compuesto puede aceptar los protones (H^+) que se forman en la desaturación del fitoeno o tener relación con la reoxidación del NADP que es necesario para la actuación de la fitoeno desaturasa (Böger y Sandmann, 1998).

Los herbicidas que inhiben la 4-HPPD generan síntomas y daños similares a los herbicidas que inhiben la fitoeno desaturasa, entre los que destaca el blanqueamiento. La inhibición de la enzima 4-HPPD por estos herbicidas es irreversible y la unión se produce en el centro catalítico de la enzima. Al inhibirse la formación de plastoquinona los niveles de este compuesto se reducen, evitando así que pueda cumplir su labor como cofactor de la fitoeno desaturasa. También se reporta un aumento en los niveles de tirosina, el precursor inmediato del 4-hidroxifenil-piruvato. Los herbicidas con este mecanismo de acción son, entonces, inhibidores indirectos de la síntesis de carotenoides.

Cuadro IV.10. Herbicidas inhibidores de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
F2	Triquetonas	Mesotrione Sulcotrione
	Isoxasoles	Isoxaclortole Isoxaflutole
	Pirazoles	Benzofenap Pirazolinato Pirazoxifen
	OTROS	Benzobiciclon

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

4.2.3.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de carotenoides en lugar desconocido:

Existen un grupo de herbicidas que se conoce inhiben la síntesis de carotenoides, pero el sitio y la forma específica de cómo ejercen este efecto es aún poco clara. Otros herbicidas generan la inhibición de la síntesis de carotenoides como mecanismo de acción secundario. Estos productos producen los típicos síntomas para los herbicidas blanqueadores antes descritos. Autores como Böger y Sandmann (1998) indican que el amitrole inhibe la enzima ζ-caroteno desaturasa, mientras que Cobb (1992) menciona que es probable que su mecanismo de acción sea la inhibición de alguna de las licopeno ciclasas.

El clomazone, un conocido inhibidor de carotenoides, es un herbicida que parece necesitar algún tipo de activación dentro de la planta para expresar el daño que produce (Duke y Dayan, 2001), ya que en

experimentos *in vitro* no ha sido posible detectar la forma exacta por medio de la cual este producto inhibe la síntesis de carotenoides.

Cuadro IV.11. Herbicidas inhibidores de la síntesis de carotenoides en lugar desconocido.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
F3	Triazoles	Amitrol
	Isoxazolidinonas	Clomazone
	Ureas	Fluometuron (grupo C2)
	Difenil-éteres	Aclonifen

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

5.- Herbicidas inhibidores de la división celular:

La división celular es un proceso básico en el crecimiento de las plantas y otros seres vivos. Este complejo proceso depende a su vez de una gran cantidad de otros procesos y condiciones específicas para que se complete sin problemas. Entre los procesos que se llevan a cabo para completar la división celular, la mitosis y la formación de la pared celular son dos de los procesos que se conoce con exactitud son afectados por diferentes grupos de herbicidas.

Muchos herbicidas afectan la división celular de diferentes formas (Hess, 1987; Vaughn y Lehnen, 1991), pero en gran parte de los casos esto se expresa como un mecanismo de acción secundario, ya que la actuación del mecanismo de acción primario limita procesos o la producción de compuestos necesarios para la mitosis. Sólo un grupo de herbicidas inhiben directamente la mitosis como mecanismo de acción primario.

5.1.- Herbicidas inhibidores de la mitosis:

Los herbicidas conocidos como "venenos mitóticos" tienen la capacidad de afectar la mitosis de tal forma que evitan la formación de células hijas.

La forma como afectan los herbicidas que inhiben la mitosis a dicho proceso es a través de inhibición de la formación (polimerización) o ensamblaje de los microtúbulos. Los microtúbulos son pequeños cilindros huecos con diámetro de 25 nm formados por una proteína dimérica llamada tubulina. La tubulina se forma de la interacción no covalente entre los polipéptidos α y β- tubulina, que se ensamblan en pares y de forma alterna, y en grupos de 13 forman el microtúbulo (Azcón-Bieto y Talón, 2003; Buchanan *et al.*, 2002), tal como puede observarse en detalle en la Figura IV.20.

Los microtúbulos tienen variadas funciones dentro de la célula vegetal y forman parte, junto a los microfilamentos, del citoesqueleto. Este complejo sistema de compuestos puede visualizarse como un conjunto de estructuras de soporte de los organelos de la célula, dando además rigidez y forma a la célula. Los microtúbulos pueden organizarse de varias formas dependiendo de la función que estén cumpliendo; la interpretación de señales internas y externas a la célula indican el arreglo apropiado para la función específica que deben cumplir. Así, los microtúbulos cumplen funciones importantes en la morfogénesis de la célula, en los procesos de división y expansión celular, transducción de señales, respuestas ante patógenos y en el transporte intracelular (Ellis *et al.*, 1994; Giani *et al.*, 2002). También son responsables de la orientación del movimiento de los cromosomas hacia los polos en la división celular y de la distribución y orientación de la celulosa en la formación de la pared celular (Vidal y Fleck, 2001). De hecho, se considera que las características especiales de los microtúbulos y las funciones que cumplen los hacen esenciales para la viabilidad de la célula (Giani *et al.*, 2002).

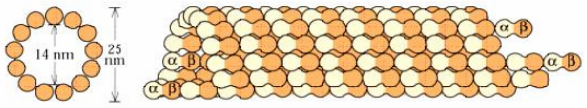

Figura IV.20. Organización de los polipéptidos α y β-tubulina para la formación de microtúbulos. Tomado de Buchanan *et al.* (2002).

Los herbicidas que inhiben la mitosis (como las dinitroanilinas) lo hacen inhibiendo el ensamblaje de los microtúbulos, ya que se unen fuertemente a los polipéptidos α y β-tubulina, evitando la polimerización de las subunidades de tubulina en los microtúbulos (Anthony y Hussey, 1999). Esto trae como consecuencia que el proceso mitótico se detenga, particularmente en la profase (Cobb, 1992). El síntoma más evidente es la paralización del crecimiento en las zonas meristemáticas de raíces y brotes.

Este mecanismo de acción parerse confirmarse por estudios que indican que plantas con mutaciones en la α-tubulina evitan la unión de los herbicidas a dicha proteína. Por ejemplo, los estudios de plantas de *Eleusine indica* L. Gaertn. resistentes a dinitroanilinas indican que una modificación en el residuo 239 de la α-tubulina confiere a las plantas una alta resistencia a estos herbicidas; además, esa misma modificación es la responsable de la resistencia del tabaco transgénico a los herbicidas oryzalin, pendimethalin y amiprofos-metil (Devine y Shukla, 2000).

Según la teoría del crecimiento de los microtúbulos, estos poseen una zona positiva ó "A" que es el extremo donde se agregan los polipéptidos y una zona negativa ó "B" que es el extremo donde se depolimerizan los polipéptidos, perdiéndose así la estructura del microtúbulo. Cuando el complejo herbicida-tubulina entra en la zona positiva del microtúbulo se paraliza la incorporación de nuevas unidades diméricas al microtúbulo; sin embargo, el proceso de depolimerización en el extremo "B" continúa, lo que resulta en microtúbulos cada vez más cortos y una eventual desaparición de los mismos. La ausencia y destrucción de microtúbulos da lugar a un desigual grosor de la pared celular, a células isodiamétricas, a la ausencia del plano de división celular, la ausencia del movimiento cromosómico y del núcleo tetraploide y a paredes celulares anormalmente orientadas. Estas irregulari-

dades son fatales y se manifiestan como raíces deformadas, bases de tallos hinchadas, y la detención del crecimiento y alargamiento de raíces y tallo (Tharayil-Santhakumar, 2003) En algunos casos se observan formación de callos en la base de los tallos. El poco desarrollo de las raíces, en especial las secundarias, produce deficiencias de nutrientes y un desarrollo raquítico en las plantas afectadas (Ferrell *et al.*, 2004). La inhición del crecimiento en las etapas tempranas del desarrollo (plántulas) produce que muchas plantas no emergan del suelo luego de la germinación, en especial plantas gramíneas de semillas pequeñas.

Cuadro IV.12. Herbicidas inhibidores del ensamblaje de microtúbulos o de la polimerización de la tubulina.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
K1	Dinitroanilinas	Benefin=benfluralin Butralina Dinitramina Etalfluralina Orizalina Pendimetalin Trifluralina
	Fosforoamidas	Aminoprofos-metil Butamifos
	Piridinas	Ditiopir Tiazopir
	Benzamidas	Pronamida Tebutam
	Acidos bencenodicarboxílicos	DCPA=clortal-dimetil

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Cuadro IV.13. Herbicidas inhibidores de la organización de los microtúbulos.

Grupo HRAC	Familia Química	Ingredientes activos
K2	Carbamatos	Carbetamida Cloroprofam Profam

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Algunos de los herbicidas carbamatos parecen ejercer algún tipo de acción de desorganización en el arreglo de los microtúbulos. Como se ha mencionado, la función que cumplen los microtúbulos depende del arreglo que los mismos adquieren dentro de la célula. Existen varias formas en como se organizan los microtúbulos y, según Vaughn y Lehnen (1991), estos arreglos pueden clasificarse de forma general en 4, con funciones específicas para cada arreglo. El efecto que poseen algunos herbicidas carbamatos sobre la inhibición de la organización en los microtúbulos trae como consecuencia que no ocurra el proceso de migración de los cromosomas hacia los polos en la anafase y que, además, las células que se formen tengan graves malformaciones en la pared celular, lo que detiene el crecimiento de los tejidos afectados.

5.2.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de la pared celular:

La pared celular esta formada de celulosa, una larga secuencia lineal de restos de D-glucosa unidos por enlaces β(1→4), con un alto grado de polimerización en paredes secundarias, mientras que en paredes primarias es menor. Debido a su estructura, las cadenas de celulosa (de 40 a 70) se unen por puentes de hidrógeno intermoleculares formando agregados, llamadas microfribillas. Las microfibrillas están separadas entre sí y este espacio es ocupado por los polisacáridos matriciales, lignina y suberina, lo que le confiere gran resistencia mecánica a la pared.

La celulosa se sintetiza por un complejo enzimático (roseta) ubicado en la membrana celular y el cual se denomina *celulosa sintetasa*. Este complejo utiliza la UDP-glucosa, que se origina de la sacarosa por la acción de la sacarosa sintetasa, como el precursor más probable (Azcon-Bieto y Talón, 2003).

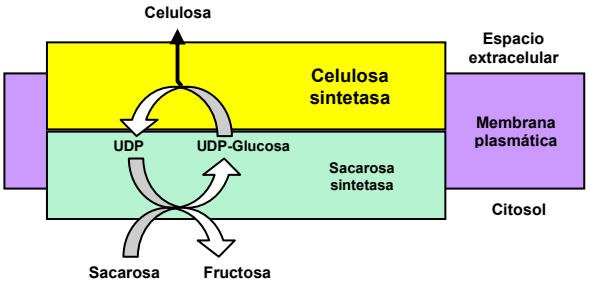

Figura IV.21. Síntesis de celulosa por el complejo celulosa sintetasa asociado a la membrana plasmática. Tomado de Heldt (1997). Adaptado por Anzalone.

Los herbicidas que inhiben la síntesis de celulosa interfieren en el crecimiento debido a que imposibilitan la formación de la pared celular, componente estructural básico en los vegetales. Los estudios realizados por Encina *et al.* (2001) en las paredes celulares de células de *Phaseolus vulgaris* L. resistentes al diclobenil (herbicida clasificado como inhibidor de la síntesis de la pared celular) indican que dicha resistencia se origina de la habilidad de éstas células de dividirse y expandirse con una pared celular modificada, en la cual la red de xiloglucano-celulosa se ha reemplazado parcialmente por pectinas, en su mayoría poliuronidos. Estos resultados parecen apoyar la teoría de la inhibición de la síntesis de celulosa como mecanismo de acción para este herbicida.

Si bien se conoce con certeza que el efecto primario de estos compuestos es la inhibición de la síntesis de celulosa, hasta ahora se desconoce el mecanismo exacto de cómo lo hacen, debido tal vez a la imposibilidad de lograr la síntesis de celulosa *in vitro*. Autores como Kiedaisch *et al.* (2003) sugieren que estos herbicidas desestabilizan las rosetas asociadas a las membranas, lo que impide la síntesis de celulosa cristalina.

Cuadro IV.14. Herbicidas Inhibidores de la síntesis de celulosa.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
L	Nitrilos	Diclobenil Clortiamida
	Benzamidas	Isoxaben
	Triazolocarboxamidas	Flupoxam

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Algunos estudios indican que el mecanismo de acción del herbicida quinclorac (un herbicida tipo auxina) incluye la inhibición de la formación de la pared celular en algunas gramíneas susceptibles (Koo *et al.*, 1997). Por otra parte, los daños que produce el herbicida diclobenil en plantas susceptibles incluyen el hinchamiento o colapso de los tallos, raíces o pecíolos de las hojas y, en algunos casos, una clorosis foliar (Ferrell *et al.*, 2004).

Los nuevos herbicidas inhibidores de la síntesis de celulosa actúan a dosis mucho menores que los tradicionales dichlobenil o chlorthiamid y como el proceso de síntesis de celulosa es exclusivo de las plantas, este mecanismo de acción se ha hecho interesante para el diseño de nuevas moléculas herbicidas. Por ejemplo, el herbicida triaziflam no sólo se puede utilizar a bajas dosis, sino que posee múltiples mecanismos de acción (inhibición del transporte de electrones, formación de microtúbulos e inhibición de la síntesis de celulosa) lo cual le confiere la ventaja de ser un herbicida que posee pocas posibilidades de generar resistencia en poblaciones de malezas (Wakabayashi y Böger, 2004b).

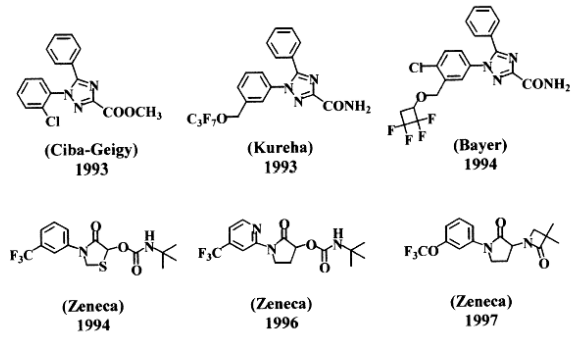

Figura IV.22. Herbicidas inhibidores de la síntesis de celulosa ya diseñados y las empresas propietarias de las patentes. Tomado de Wakabayashi y Böger, 2004b.

6.- Herbicidas hormonales:

Los procesos de crecimiento y muerte de las plantas están controlados por un complejo sistema de señales químicas que indican a las células y sus componentes cuando realizar ciertas funciones o procesos y cuando detenerlos; entre este conjunto de señales químicas destacan las hormonas vegetales o fitohormonas. Así, las hormonas vegetales más conocidas (giberelinas, auxinas, citocininas, etileno y ácido abscísico) funcionan como sustancias señalizadoras que en bajas concentraciones provocan diferentes reacciones fisiológicas en las plantas. La concentración de cada fitohormona en su lugar de acción está estrictamente controlada y es el resultado de la síntesis, la descomposición, la conjugación, el almacenamiento y el transporte de la misma. Tanto una deficiente como una excesiva provisión de fitohormonas conducen a alteraciones características del desarrollo (Strasburger *et al.*, 2004).

Existen herbicidas que se asemejan a fitohormonas y que, aplicados bajo ciertas condiciones, son capaces de alterar el sistema hormonal de señales químicas en las plantas a un punto tal de causarles la muerte.

6.1.- Herbicidas tipo auxina:

Existe un amplio consenso en la literatura que indica que los herbicidas tipo auxina poseen un efecto similar al ácido indolacético (IAA), la hormona auxínica vegetal más abundante en las plantas superiores. Este efecto se produce en dos vías: en bajas concentraciones estimula el crecimiento por división celular y la elongación de las células, mientras que a altas concentraciones produce una amplia variedad de anormalidades en el crecimiento (Grossmann, 2000).

A pesar de que los herbicidas tipo auxinas se han venido utilizando de forma continua en la agricultura desde hace más de 50 años, la comprensión del mecanismo de acción de estos compuestos sobre las plantas susceptibles sigue siendo aún poco clara. Existen muchas hipótesis de la forma en que actúan estos compuestos y todas parecen tener cierta razón. Podemos decir que el desequilibrio que producen los herbicidas tipo auxina en el sistema de control hormonal de las plantas es lo que desencadena una serie de procesos variados y complejos, que al final generan la muerte de la planta.

Salisbury y Ross (2000) comentan que en ocasiones se resume el mecanismo de acción de los herbicidas tipo auxinas en la siguiente frase: "estos herbicidas hacen que las plantas crezcan hasta morir". Sin embargo, estos autores indican que esta idea no es del todo correcta, ya que si bien algunas partes de las plantas entran en senescencia, otras no lo hacen, por lo que es más correcto decir que existe una descoordinación del crecimiento de las plantas en una forma tal que les produce la muerte. Esta descoordinación es atribuida a la capacidad que poseen los herbicidas hormonales para alterar la transcripción del ADN y la traducción del ARN, que produce que no se sinteticen las enzimas necesarias para coordinar el crecimiento.

Algunos de los efectos comunes a los herbicidas tipo auxina parecen estar asociados a una sobreproducción de etileno (Duke y Dayan, 2001), aunque el mecanismo de estimulación para la producción de etileno no está del todo claro. De acuerdo con los recientes estudios (Grossmann, 2003; Grossman *et al.*, 2001), el curso de los acontecimientos inducidos por el aumento de los niveles del IAA o de los herbicidas tipo auxina en el tejido de malezas

dicotiledóneas sensibles se puede dividir en tres fases: la primera es una fase de estímulo que ocurre dentro de las primeras horas después de la aplicación del producto; implica la activación de procesos metabólicos tales como la biosíntesis del etileno por la inducción de la ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico sintetasa (ACC sintetasa) en los brotes (1-2 horas después del tratamiento), seguido por síntomas de deformación del crecimiento (3-4 horas), incluyendo la iniciación del doblamiento del tallo, el abultamiento de algunos tejidos y la epinastia en hojas. Posteriormente, el ácido abscícico (ABA) comienza a acumularse de forma perceptible (después de 5-8 horas). La segunda fase, que ocurre dentro de 24 horas, incluye la inhibición del crecimiento de la raíz y, a un mayor grado, del tallo, con disminución en el alargamiento del entrenudo y del área foliar, siendo evidente una fuerte pigmentación verde de las hojas. De manera simultánea, la reducción en la apertura de los estomas por efecto del ABA genera una disminución en la transpiración y la asimilación del carbón. La tercera fase es la fase de la senescencia y del decaimiento del tejido, que es marcado por senescencia foliar acelerada, daños al cloroplasto y clorosis progresiva; posteriormente se observa la destrucción de las membranas y la pérdida de la integridad vascular del sistema por la acción de formas activas de oxígeno, generadas por la inhibición de la asimilación de carbono; estos últimos eventos conducen a la planta a la desecación, con severa necrosis y finalmente la muerte.

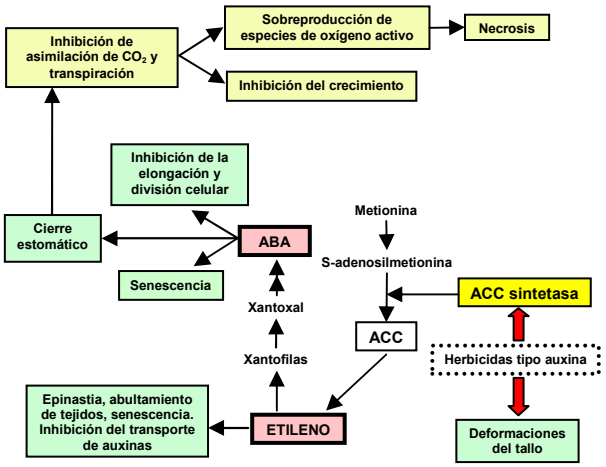

Figura IV.23. Esquema hipotético del mecanismo de acción de los herbicidas tipo auxinas planteado por Grossmann (2003). Adaptado por Anzalone.

También se ha observado la acumulación de cianida en plantas tratadas con herbicidas tipos auxinas (Duke y Dayan, 2001). Este compuesto se sintetiza como coproducto de la síntesis de etileno por la oxidación del ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la enzima ACC oxidasa. Altos niveles de cianida causan efectos inhibitorios sobre muchas enzimas y proteínas, donde se incluyen la citocromo-c oxidasa, ribulosa-bifosfato carboxilasa, nitrato/nitrito reductasa, catalasa, Cu/Zn superóxido dismutasa, peroxidasa y plastocianina (Grossmann, 2003), por lo que la acumulación de este compuesto como consecuencia de la acción de herbicidas tipo auxinas puede ser muy importante, ya que se afecta de múltiples formas el metabolismo de las células. Estas ideas sobre el mecanismo de acción de los herbicidas tipo auxina parecen estar suficientemente sustentadas, pero aún quedan algunos procesos sin identificar, como la forma en que los receptores y transportadores de estos herbicidas que se encuentran en la membrana celular funcionan en plantas sensibles.

Cuadro IV.15. Herbicidas tipo auxina.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
O	Acidos Fenoxicarboxílicos	Clomeprop 2,4-D 2,4-DB Diclorprop=2,4-DP MCPA MCPB Mecoprop=MCPP=CMPP
	Acidos Benzoicos	Cloramben Dicamba TBA
	Acidos piridincarboxílicos	Clopiralid Fluroxipir Picloram Triclopir
	Acidos quinolincarboxílicos	Quinclorac (grupo L) Quinmerac
	OTROS	Benazolin-metil

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Los herbicidas tipo auxina afectan a plantas dicotiledóneas, mostrándose selectivos hacia gran parte de las especies gramíneas. Este fenómeno se atribuye a la capacidad que poseen las gramíneas de oxidar estos compuestos, probablemente por la menor velocidad de movilización dentro de las plantas, lo que permite activar los procesos de detoxificación con eficacia. Los síntomas de daño en plantas susceptibles incluyen anormalidades en el crecimiento y la reproducción, en especial en los brotes nuevos. Las plantas de hojas anchas presentan epinastia en tallos y pecíolos foliares, malformaciones en las hojas (arrugamientos, enrollamientos ó engrosamientos) formación de callos en los tallos y poco desarrollo de raíces. En gramíneas susceptibles se observan enrollamientos de hojas, raíces fusionadas y tallos frágiles de pequeño diámetro; también pueden afectar la reproducción, generando inflorescencias múltiples y estériles y semillas no viables (Peterson *et al.*, 2001; Ferrell *et al.*, 2004).

6.2.- Herbicidas inhibidores del transporte de auxinas:

Otra forma en que los herbicidas pueden afectar el equilibrio hormonal en las plantas es a través de la

inhibición del transporte de las auxinas. El naptalam es un herbicida que posee este mecanismo de acción.

Cuadro IV.16. Herbicidas inhibidores del transporte de auxinas.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
P	Ftalamatos Semicarbazones	Naptalam Diflufenzopir-Na

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Las hormonas auxínicas se producen en los tejidos meristemáticos de las plantas; estos compuestos se mueven básicamente a través de células del parénquima en contacto con haces vasculares por un sistema polar de transporte, que se sospecha incluye proteínas transportadoras específicas (Salisbury y Ross, 2000). Los herbicidas de este grupo y otros compuestos naturales llamadas fitotropinas inhiben el flujo de auxinas desde las zonas productoras a las receptoras, lo que produce un conjunto de síntomas entre los que destacan la paralización del crecimiento en meristemas de raíces, unido a una pérdida del tropismo en las mismas. Si bien no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual estos herbicidas inhiben el flujo de auxinas, se sospecha que estos productos se unen a los transportadores de auxinas ubicados en la membrana plasmática, desequilibrando así el flujo normal de estos compuestos en las plantas (Duke y Dayan, 2001).

Un daño típico causado por el herbicida naptalam es la alteración de la respuesta geotrópica de las plantas, lo cual produce el crecimiento de raíces hacía arriba del suelo (Ferrell *et al.*, 2004).

7.- Otros mecanismos de acción:

7.1.- Herbicidas inhibidores de la síntesis de folato (inhibidores de la dihidropteroato sintetasa):

El tetrahidrofolato es una compleja molécula compuesta de tres distintas partes: un anillo pterina, ácido ρ-aminibenzoico y una cadena de poliglutamato de longitud variable. Estos cofactores están envueltos en el transporte de compuestos de 1 carbono (metil, formil, metileno) y están directamente relacionados con las reacciones de transferencias de unidades de 1 carbón en diferentes rutas metabólicas. Ellos constituyen una familia de moléculas relacionadas entre sí que se denominan de forma genérica como *folato*. Estas reacciones de transferencias de unidades de 1 carbono suceden en el ciclo de biosíntesis del ADN, el ciclo de metilación y, en las plantas en particular, intervienen en el ciclo fotorespiratorio (Gambonnet *et al.*, 2001).

Según Neuburger *et al.* (1996) el folato está directamente relacionado en la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, en la suplencia de *S*-adenosil-metionina hacia las numerosas enzimas metiltransferasas (presentes en todas las células), que intervienen en la síntesis de proteínas, lípidos, hormonas, ADN, etc. y también en el reciclaje del glicolato y la regeneración de la RUBISCO en el proceso fotosintético. Una deficiencia de tetrahidrofolato genera severas repercusiones metabólicas, alterando además la capacidad de división celular como consecuencia de la incapacidad de sintetizar ADN y de regular la expresión genética.

A diferencia de los animales donde las fases primarias de la síntesis de folato no existe, en las plantas superiores y en algunos microorganismos es posible la síntesis *de novo* del tetrahidrofolato a partir de 6-hidroximetil-7,8-dihidropterin, proceso que sucede en la mitocondria. Esta síntesis es posible gracias a la acción de secuencial de cinco enzimas: (1) dihidropterin pirofosfokinasa (HPPK), (2) 7,8-dihidropteroato sintetasa (DHPS), (3) dihidrofolato sintetasa (DHFS), (4) folilpoliglutamato sintetasa (FPGS) y (5) dihidrofolato reductasa (DHFR). Una enzima clave en esa ruta metabólica es la 7,8-dihidropteroato sintetasa (Rébeillé *et al.*, 1997).

Cuadro IV.17. Herbicidas inhibidores de la síntesis de folato.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
I	Carbamatos	Asulam

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

El asulam es un inhibidor de la síntesis del folato y su acción la ejerce a través de la inhibición de la enzima 7,8-dihidropteroato sintetasa. Este proceso restringe la síntesis de folato con las variadas consecuencias metabólicas antes descritas. Los daños causados por el asulam incluyen la inhibición del crecimiento de las raíces, plantas raquíticas y poco desarrolladas y, cuando es aplicado en postemergencia, amarillamiento y clorosis.

Los compuestos metotrexato y trimetoprim han sido reportados como inhibidores de la enzima tetrahidrofolato dehidrogenasa (THF dehidrogenasa), otra enzima importante en el ciclo del folato (ver Figura IV.25).

7.2.- Herbicidas inhibidores de la respiración (desacopladores):

La mitocondria es el organelo celular encargado de llevar a cabo la respiración, proceso que genera la energía necesaria para el funcionamiento de las células. Este proceso comprende la síntesis de ATP (la molécula energética más importante en las células) y el transporte de electrones y protones desde los sustratos energéticos hacia el oxígeno. El ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos son las principales rutas que inician el proceso de regeneración del ATP en la cadena respiratoria. Durante el transporte de electrones hacia el oxígeno el ADP es fosforilado a ATP, proceso que se conoce como fosforilación oxidativa. Un esquema general del proceso de respiración celular se presenta en la Figura IV.24.

Los herbicidas que inhiben la respiración lo hacen en la fase 3 de la respiración, por lo que son llamados

"desacopladores de la fosforilación oxidativa". Estos herbicidas actúan inhibiendo la formación de ATP en el proceso de respiración en las mitocondrias. Al parecer, los herbicidas que inhiben la respiración no actúan sobre el flujo de electrones en el proceso respiratorio (Valverde, 1985), sino que actúan sobre la membrana mitocondrial, destruyendo el potencial transmembrana de protones. Sin embargo, algunos reportes indican que los herbicidas ioxinil y bromoxinil son inhibidores del transporte de electrones en la mitocondria, pero el sitio exacto donde sucede este bloqueo es desconocido. Otros herbicidas como los difeniléteres pueden poseer como mecanismo de acción secundario la inhibición del transporte de electrones en el proceso respiratorio (Dinelli y Catizone, 2001).

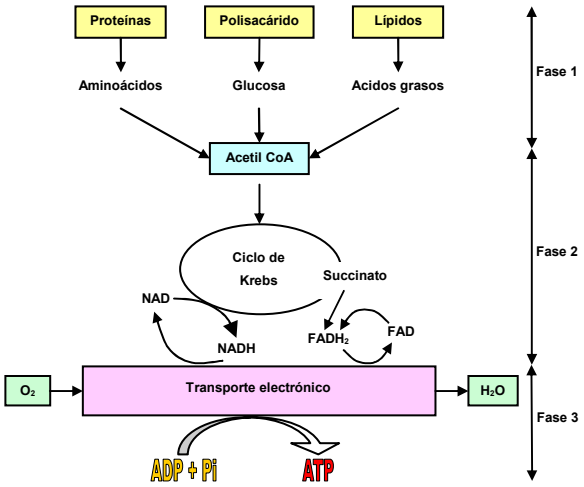

Figura IV.24. Representación esquemática del proceso de respiración celular. Tomado de Dinelli y Catizone (2001). Adaptado por Anzalone.

Cuadro IV.18. Herbicidas inhibidores de la respiración.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
M	Dinitrofenoles	Dinoseb Dinoterb DNOC

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

Estudios realizados por Vicente *et al.* (1998) indican que el DNOC (dinitro-*o*-cresol: 2-metil-4,6-dinitrofenol) es un desacoplador de la fosoforilación oxidativa más potente que el 4,6-dinitrofenol (DNP), un conocido desacoplador, y que esta elevada actividad puede estar asociada al grupo metil extra que posee la molécula de DNOC al ser comparada con DNP. Bajas dosis de DNOC produjeron un colapso del potencial trasmembrana y estimularon la respiración vía succinato en células aisladas de plantas.

El desacople del sistema generador de energía en la célula por los herbicidas inhibidores de la respiración genera un proceso de muerte progresiva en plantas susceptibles.

7.3.- Herbicidas con mecanismo de acción desconocido:

Existe un grupo de herbicidas de los cuales aún no se conoce el mecanismo de acción; ellos representan entre el 30 y el 35 % de los herbicidas comercializados en el mundo (Dinelli y Catizone, 2001). Esta situación evidencia lo complicado que puede resultar el clarificar la forma en que actúan los herbicidas.

Cuadro IV.19. Herbicidas con mecanismo de acción desconocido.

Grupo HRAC*	Familia Química	Ingredientes activos
Z	Acidos arilamino-propiónicos	Flamprop-M-metil/isopropil
	Pirazolium	Difenzoquat
	Organoarseniacales	DSMA MSMA
	Otros	Ácido oleico Ácido pelargónico Bromobutida Cloro-flurenol Cumiluron Dazomet Dimron=daimuron Etobenzanida Fosamina Indanofan Metam Metil-dimuron Oxaziclomefone Piributicarbo

*HRAC = Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas.

De muchos de los herbicidas clasificados como de mecanismo de acción desconocido se poseen reportes aislados, pero sin estudios concluyentes con respecto al mecanismo de acción o sin un acuerdo entre los investigadores y expertos del área. Es posible que alguno de los herbicidas incluidos en este grupo sea clasificado de otra forma.

7.4.- Nuevos mecanismos de acción en desarrollo:

Muchos investigadores están trabajando en el desarrollo de herbicidas con nuevos mecanismos de acción, haciendo énfasis en aquellos que actúen sobre procesos metabólicos exclusivos de las plantas y que permitan su uso a bajas dosis de materia activa por área. Algunos mecanismos de acción de interés no nombrados con anterioridad incluyen la inhibición de la asimilación de carbón en el proceso fotosintético, acción sobre vías específicas de síntesis de aminoácidos esenciales o sobre complejos detoxificadores (en especial antioxidativos) como la glutationa-*S*-tranferasa (Wakabayashi y Böger, 2004b).

Algunos mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis de nucleótidos mediante la inhibición de las enzimas adenilosuccinato sintetasa, aspartato carbonil transferasa, AMP desaminasa y adenilo-succinato liasa, han sido reportados para ciertos compuestos con potencialidad de ser desarrollado como herbicidas. Algunas empresas agroquímicas están desa-

rrollando herbicidas inhibidores de la enzima obtusifoliol-1,4-α-metildemetilasa que actúa en la ruta de síntesis de esteroles. De igual manera algunos inhibidores de la biosíntesis de isoprenoides son evaluados (Wakabayashi y Böger, 2004b). Por último, es posible el desarrollo de herbicidas que afecten el funcionamiento de las enzimas del citocromo P450, ya que se ha demostrado que este complejo enzimático cumple funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de algunas plantas, como la biosíntesis de hormonas, brassinoesteroides y componentes estructurales de las células (Morant *et al.*, 2003).

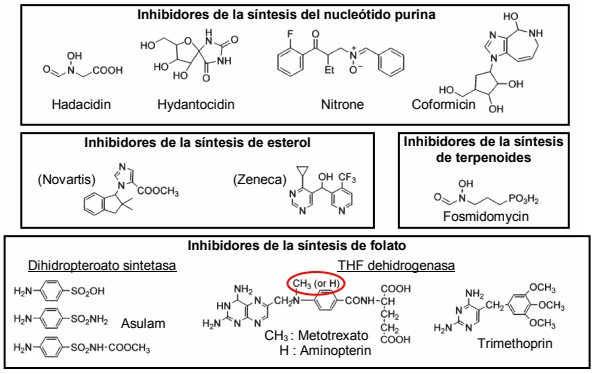

Figura IV.25. Mecanismos de acción de algunos compuestos bajo estudio. Tomado de Wakabayashi y Böger (2004b). Adaptado por Anzalone.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Qare, A. y Duncan, J., 2002. Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. Chemosphere, 48:965–974.

Alexander, M., 1977. Introduction to Soil Microbiology. Second edition. Jhon Wiley & Sons. U.S.A. 480 pp.

Anderson, W., 1983. Weed Science: principles. Second edition. St. Paul. West Publishing Co. U.S.A. 655 pp.

Anthelme, F. y Marigo, G., 1998. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: Involvement of a plasma membrane redox system?. Pesticide Biochemistry and Physiology, 62:73-86.

Anthony, R. y Hussey, P., 1999. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. Trends in Plant Science Reviews, 4(3):112-116.

Anzalone, A., 2000. Determinación de niveles tóxicos de residuos del herbicida Metribuzina para cultivos de rotación luego de un ciclo de producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo una condición agroclimática. Tesis de Maestría en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay (Venezuela). 186 pp.

Asthon, F. y Crafts, A., 1973. Mode of Action of Herbicides. John Wiley & Sons. New York (U.S.A.). 504 pp.

Azcón-Bieto, J. y Talón, M., 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Tercera reimpresión. Edicions Universitat de Barcelona-Mc. Graw-Hill Interamericana. Barcelona, España. 536 pp.

Bailey, W.; Hatzios, K.; Bradley, K. y Wilson, H., 2003. Absorption, translocation, and metabolism of sulfentrazone in potato and selected weed species. Weed Science, 51:32–36.

Barnwell, P. y Cobb, A., 1993. An investigation of aryloxyphenoxypropianate antagonism of auxin-type herbicide action on proton-efflux. Pesticide Biochemistry and Physiology, 47:87-97.

Barrett, M., 2000. The role of cytochrome p450 enzymes in herbicide metabolism. En: Herbicides and their Mechanism of Action. Editado por Cobb, A. y Kirkwood, R. Sheffield Academic Press. England. 295 pp.

Becerril, J., 1992. Modo de acción de los herbicidas. En: Memorias del Congreso 1992 de la Sociedad Española de Malherbología. Sociedad Española de Malherbología. España.

Böger, P. y Sandmann, G., 1998. Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides – mode of action and resistance mechanisms. Pesticide Outlook, December (1998):29-35.

Buchanan, B.; Gruissem, W. y Jones, R. (Editores), 2002. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. John Wiley & sons. U.S.A. 1408 pp.

Calvet, R. y Charnay, M., 2002. Le devenir dans le sol des substances phytopharmaceutiques (Chapitre X). En: Pesticides et Protection Phytosanitaire dans une Agriculture en Mouvement. Editado por: Association de Coordination Technique Agricole. Saint-Paul Imprimeur. Paris (Francia). 976 pp.

Carter, A., 2000. Herbicide movement in soil: principles, pathways and processes. Weed Research, 40:113-122.

Cartwright A., 2001. The role of soil affecting the performance of herbicides (Capítulo 6). En: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI. Editado por De Prado, R. y Jorrín, J. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. 688 pp.

Chase, A.; Bewick, T. y Shilling, D., 1998. Characterization of paraquat resistance in *Solanum americanum* Mill. II Evidence for a chloroplast mechanism. Pesticide Biochemistry and Physiology, 60:23-30.

Christopher, J. y Holtum, J., 1998. The dicotyledonous species *Erodium moschatum* (L) L'HeÂ r. ex Aitonis sensitive to haloxyfop herbicide due to herbicide-sensitive acetyl-coenzyme A carboxylase. Planta, 207:275-279.

Cobb, A., 1992. Herbicides and Plant Physiology. Chapman & Hali. London (England). 176 pp.

Coetzer, E.; Al-Khatib, K. y Loughin, T., 2001. Glufosinate efficacy, absorption, and translocation in amaranth as affected by relative humidity and temperature. Weed Science, 49:8-13.

Cudney, D., 1996. Why herbicides are selective. California Exotic Pest Plant Council. 1996 Symposium Proceedings.

Cummins, I.; Cole, D. y Edwards, R., 1999. A role for glutathione transferasas functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. The Plant Journal, 18:285-292.

Cunningham, F. y Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annual Reviews of Plant Physilogy and Plant Molecular Biology, 49: 557-583.

Davies, J. y Caseley, J., 1999. Herbicide safeners: a review. Pesticide Science, 55:1043-1058.

Davies, J., 2001. Herbicide safeners-commercial products and tools for agrochemical research. Pesticide Outlook, February (2001):10-15.

Deshpande, S. y Hall, C., 2000. Auxinic herbicide resistance may be modulated at the auxin-binding site in wild mustard (*Sinapis arvensis* L.): A light scattering study. Pesticide Biochemistry and Physiology, 66:41-48.

Devine, M. y Shukla, A., 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. Crop Protection, 19:881-889.

Dinelli, G. y Catizone, P., 2001. Relazione erbicida-pianta (Parte V - Capitolo 4). En: Malerbologia. Editado por Catizone, P. y Zanin, G. Patrón Editore. Bologna (Italia). 925 pp.

Dubach, P., 1970. Dinámica de los Herbicidas en el Suelo. Ciba-Geiby. Basilea (Suiza). 19pp.

Duke, S. y Dayan, F., 2001. Clasification and mode of action of the herbicides (Capítulo 3). En: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI. Editado por De Prado, R. y Jorrín, J. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España). 688 pp.

Duke, S., 1985. Weed Physilogy: Herbicide Physilogy. Volume II. CRC Press. Boca Ratón (U.S.A.). 257 pp.

Eames, A., 1949. Comparative effects of spray treatments with growth regulating substance on the nutgrass (*Cyperus rotundus*) and anatomical modifications following treatment: butyl 2,4 dichlorophenoxyacetate. American Journal of Botany, 36:571-584.

Edwards, R. y Dixon, D., 2000. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. En: Herbicides and their Mechanism of Action. Editado por Cobb, A. y Kirkwood, R. Sheffield Academic Press. England. 295 pp.

Ellis, R.; Taylor, R. y Hussey, P., 1994. Molecular modeling indicates that two chemically distinct classes of anti-mititic herbicide bind to the same receptor site(s). Rapid Communication. Plant Physiology, 105:15-18.

Encina, A.; Moral, R.; Acebes, J. y Alvarez, J., 2001. Characterization of cell walls in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to dichlobenil. Plant Science, 160:331-339.

Feng, P.; Chiu, T.; Sammons, R. y Ryerse, J., 2003. Droplet size affects glyphosate retention, absorption, and translocation in corn. Weed Science, 51:443-448.

Ferrell, J.; Stall, W.; MacDonald, G. y Tredaway, J., 2004. Diagnosing herbicide injury – 2004. Series of the Agronomy Deparment, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Document SS-AGR-15. [Documento en línea] Disponible en: http://edis.ifas.ufl.edu. [Consulta: Mayo, 2004].

Fleck, N. y Vidal, R., 2001. Inhibidores do fotossistema 2 (Capítulo 10). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado por Vidal, A. y Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (Brasil). 152 pp.

Fornier, J., 2002. Chimie des pesticides (Chapitre VII). En: Pesticides et Protection Phytosanitaire dans une Agriculture en Mouvement. Editado por: Association de Coordination Technique Agricole. Saint-Paul Imprimeur. Paris (Francia). 976 pp.

Fufezan, C.; Rutherford, A. y Krieger-Liszkay, A., 2002. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. Federation of European Biochemical Societies Letters, 532:407-410

Gambonnet, B.; Jabrin, S.; Ravanel, S.; Karan, R. y Rébeillé, F., 2001. Folate distribution during higher plant development. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81:835-841.

García, L. y Fernández, C., 1991. Fundamentos sobre Malas Hierbas y Herbicidas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España). 349 pp.

Gauvrit, C., 1996. Efficacité et Sélectivité des Herbicides. INRA editions. París (Francia). 158 pp.

Gauvrit, C., 2001. Pénétration et migration des herbicides dans les végétaux (Capítulo 7). En: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI. Editado por De Prado, R. y Jorrín, J. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España). 688 pp.

Geiger, D.; Shieh, W. y Fuchs, M., 1999. Causes of self-limited translocation of glyphosate in *Beta vulgaris* plants. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64:124-133.

Giani, S.; Prisca, C. y Breviario, D., 2002. A dual effect on protein synthesis and degradation modulates the tubulin level in rice treated with oryzalin. Planta, 214:837-847.

Glawischnig, E.; Grün, S.; Frey, M. y Gierl, A., 2000. Cytochrome P450 monooxygenases of DIBOA biosynthesis: specificity and conservation among grasses. Phytochemistry, 50:925-930.

Gronwald,J., 1991. Lipid biosynthesis inhibitors. Weed Science, 39:435-439.

Grossmann, K., 2000. Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. Trends in Plant Science, 5:506-508.

Grossmann, K., 2003. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. Journal of Plant Growth Regulation, 22:109-122.

Grossmann, K.; Kwiatkowski, J. y Tresch, S., 2001. Auxin herbicides induce H_2O_2 overproductionn and tissue damage in cleavers (*Galliun aparine* L.). Journal of Experimental Botany, 52:1811-1816.

Hatzios, K. y Burgos,N., 2004. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. Weed Science, 52:454–467.

Heldt, H., 1997. Plant Biochemistry & Molecular Biology. Oxford University Press, New York (U.S.A.). 546 pp.

Hess, F., 1987. Herbicide effects on the cell cycle of meristematic plant cells. Reviews of Weed Science, 3:183-203.

Hess, F., 2000. Light-dependent herbicides: an overview. Weed Science, 48:160-170.

Hoss, N.; Al-Khatib, K.; Peterson, D. y Loughin, T., 2003: Efficacy of glyphosate, glufosinate, and imazethapyr on selected weed species. Weed Science, 51:110-117.

Howard, S. y Parker, R., 1995. Chemical Control for Woody Plants, Stumps and Trees. College of Agriculture & Home Economics. Cooperative Extension. Washington State University. Documento EB1551. [Documento en línea] Disponible en: http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb1551/eb1551.html. [Consulta: Febrero de 2005].

Incledon, B. y Hall, C., 1997. Acetyl-coenzyme A carboxylase: Quaternary structure and inhibition by graminicidal herbicides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 57:255-271.

Karam, D., 1998. Glutathione S-transferase: an enzyme for chemical defense in plants. Brazilian agricultural research corporation (EMBRAPA). [Documento en línea] Disponible en: http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses /en570/papers _1998/karam.htm. [Consulta: Agosto 2004].

Kiedaisch, B.; Blanton, R. y Haigler, C., 2003. Characterization of a novel cellulose synthesis inhibitor. Planta, 217:922-930

Kirkwood, R., 1999. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. Pesticide Science, 55:69-77.

Kleier, D.; Grayson, T. y Hsu, F., 1998. The phloem mobility of pesticides. Pesticide Outlook, October (1998):26-30.

Klingman, G. y Ashton, F., 1980. Estudio de las Plantas Nocivas. Editorial Limusa. México. 450 pp.

Knuteson, S.; Whitwell, T. y Klaine, S., 2002. Influence of plant age and size on simazine toxicity and uptake. Journal of Environmental Quality, 31:2096–2103.

Kogan, M. y Bayer, D., 1996. Herbicide uptake as influenced by plant water status. Pesticide Biochemistry and Physiology, 56:174-182.

Koo, S.; Neal, J. y DiTomaso, J., 1997. Mechanism of action and selectivity of quinclorac in grass roots. Pesticide Biochemistry and Physiology, 57:44-53

Krauss, N.; Hinrichs, W.; Witt, I.; Fromme, P.; Pritzkow, W.; Dauter, Z.; Betzel, C.; Wilson, K.; Witt, H. y Saenger, W., 1993. Three- dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Aº resolution. Nature, 361:326-331.

Lequeu, J.; Fauconnier, M.; Chammaï, A.; Bronner, R. y Blée, E., 2003. Formation of plant cuticle: evidence for the ocurrence of the peroxygenase pathway. The Plant Journal, 36:155-164.

Levene, B. y Owen, M., 1995. Effect of moisture stress and leaf age on bentazon absorption in common cocklebur (*Xanthium strumarium*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). Weed Science, 43:7-12.

Maertens, K.; Sprague, C.; Tranel, P y Hines, R., 2004. *Amaranthus hybridus* populations resistant to triazine and acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Weed Research, 44:21-26.

Mamarot, J. y Rodríguez, A., 2003. Sensibilité des Mauvaises Herbes aux Herbicides en Grandes Cultures. Association de coordination technique agricole. París (Francia). 372 pp.

Marcano, M., 2000. El Manejo Integrado de Malezas en los Agroecosistemas. Trabajo de ascenso. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Venezuela. 332 pp.

Marrs, K., 1996. The functions and regulation of glutathione-s-transferases in plants. Annuals Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47:127-158.

Matsumoto, H.; Kashimoto, K. y Warabi, E., 1999. Basis for common chickweed (*Stellaria media*) tolerance to oxyfluorfen. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64:47-53.

McElroy, J.; Yelverton, F.; Burke, I. y Wilcut, J., 2004. Absorption, translocation, and metabolism of halosulfuron and trifloxysulfuron in green kyllinga (*Kyllinga brevifolia*) and false-green kyllinga (*K. gracillima*). Weed Science, 52:704-710.

Merotto, A. y Vidal, R., 2001. Herbicidas inibidores de PROTOX (Capítulo 8). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado por Vidal, A. Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (Brasil). 152 pp.

Merotto, A.; Vidal, R. y Fleck, N., 2001. Absorção e translocação de herbicidas. (Capítulo 2). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado por Vidal, A. Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (Brasil). 152 pp.

Miller, P. y Westra, P., 1998. Herbicide Surfactants and Adjuvants. Colorado State University Cooperative Extension. Document No. 0.559. [Documento en línea] Disponible en: www.colostate.edu/Depts/CoopExt. [Consulta: Noviembre, 2001]

Molin, W. y Khan, R., 1996. Differential tolerance of cotton (*Gossypium* sp.) cultivars to the herbicide prometryn. Pesticide Biochemistry and Physiology, 56:1-11.

Monaco, T.; Weller, S. y Ashton, F., 2002. Weed Science: Principles and Practices. Fourth edition. Jhon Wiley & Sons, Inc. New York (U.S.A.). 671 pp.

Morant, M.; Bak, S.; Møller, B. y Werck-Reichhart, D., 2003. Plant cytochromes P450: tools for

pharmacology, plant protection and phytoremediation. Current Opinion in Biotechnology, 14:151-162.

NAS (National Academy of Sciences), 1978. Plantas Nocivas y Como Combatirlas. Editorial Limusa. México. 574 pp.

Neto, F.; Coble, H. y Corbin, F., 2000. Absorption, translocation, and metabolism of 14C-glufosinate in *Xanthium strumarium*, *Commelina diffusa*, and *Ipomoea purpurea*. Weed Science, 48:171-175.

Neuburger, M.; Rébeillé, F.; Jourdain, A.; Nakamura, S. y Douce, R., 1996. Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. The Journal of Biological Chemistry, 271:9466–9472.

Ohkawa, H.; Tsujii, H. y Ohkawa, Y., 1999. The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review. Pesticide Science, 55:867-874.

Osuna, M.; Ruiz, A. y De Prado, R., 2001. Resistencia de herbicidas inhibidores a la ALS en España (Capítulo 25). En: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI. Editado por De Prado, R. y Jorrín, J. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España). 688 pp.

Otto, S.; Finizio, A. y Vighi, M., 2001. Principali caratteristiche chimico-fisiche, partitive, tossicologiche ed ecotossicologiche degli erbicide (Parte V - Capitolo 3). En: Malerbologia. Editado por Catizone, P. y Zanin, G. Patrón Editore. Bologna (Italia). 925 pp.

Papa, J. y Leguizamón, E., 2004. Dinámica de los herbicidas en la planta (Capítulo 2). En: Herbicidas: Características y Fundamentos de su actividad. Editado por Vitta, J. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario (Argentina). 83 pp.

Peterson, D.; Regehr, D.; Thompson, C. y Al-Khatib, K., 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Documento C-715. U.S.A.

Petroff, R., 2000. Water Quality and Pesticide Performance. Montana State University Extension Service [Documento en línea] Disponible en: http://extn.msu.montana.edu. [Consulta: Marzo, 2001].

Prade, L.; Huber, R. y Bieseler, B., 1998. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants. Structure, 6:1445–1452.

Preston, C. y Mallory-Smith, C., 2001. Biochemical mechanisms, inheritance and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. En: Herbicide Resistance and World Grains. Editado por: Powles, S. y Shaner, S. CRC Press. Florida (U.S.A.). 308 pp.

Puricelli, E., 2004. Comportamiento de herbicidas en el suelo (Capítulo 3). En: Herbicidas: Características y Fundamentos de su actividad. Editado por Vitta, J. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario (Argentina). 83 pp.

Rao, V., 2002. Principles of Weed Science. Second edition reprinted. Science publishers, Inc. U.S.A. 555 pp.

Ray, T., 1982. The mode of action of chlorsulfuron: A new herbicide cereals. Pesticide Biochemistry and Physiology, 17:10-17.

Rébeillé, F.; Macherel, D. Mouillon, J.; Garin, J. y Doce, R., 1997. Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. The EMBO Journal, 16 (5): 947–957

Rijn van, P., 2000. Weed Management in the Humid and Sub-humid Tropics. Royal Tropical Institute. Amsterdam (The Netherlands). 234 pp.

Romagni, J.; Duke, S. y Dayan, F., 2000. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. Plant Physiology, 123:725-732.

Ross, M. y Lembi, C., 1999. Applied Weed Science. Second edition. Prentice Hall, U.S.A. 452 pp.

Salisbury, F. y Ross, C., 1992. Plant Physiology. Wadswort Publishers, Inc. San Francisco (U.S.A.). 682 pp.

Salisbury, F. y Ross, C., 2000. Fisiología de las Plantas. Thomson Editores Spain Paraninfo. Madrid (España). 988 pp.

Sasaki, Y.; Konishi, T. y Nagano, Y., 1995 Acetyl-Coenzyme A Carboxylase in plants. Plant Physiology, 108:445-449.

Schmalfuß, J.; Matthes, B.; Knuth, K. y Böger, P., 2000. Inhibition of Acyl-CoA elongation by chloroacetamide herbicides in microsomes from leek seedlings. Pesticide Biochemistry and Physiology, 67:25-35.

Shimabukuro, R. y Hoffer, B., 1996. Induction of ethylene as an indicator of senescence in the mode of action of diclofop-methyl. Pesticide Biochemistry and Physiology, 54:146-158.

Shimabukuro, R.; Davis D. y Hoffer, B., 2001. The effect of diclofop-methyl and its antagonist, vitamin E, on membrane lipids in oat (*Avena sativa* L.) and leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology, 69:13-26.

Sicbaldi, F.; Sacchi, G.; Trevisan, M. y Del Re, A., 1997. Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes. Pesticide Science, 50:111-119.

Siehl, D. y Subramanian, M., 1997. Evaluating anthranilate synthase as a herbicide target. Weed Science, 45:628-633.

Siminszky, B.; Corbin, F.; Ward, E..; Fleischmann, T. y Dewey, R., 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 96:1750-1755.

Sprankle, P.; Meggitt, W. y Penner, D., 1975. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. Weed Science, 23:229-234.

Sterling, T., 1994. Mechanism of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. Weed Science, 42:263-276.

Stiborová, M.; Schmeiserb, H. y Freib, E., 2000. Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. Phytochemistry, 54:353-362.

Stidham, M., 1991. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. Weed Science, 39:425-434.

Strasburger, E.; Noll, F.; Schenk, H. y Schimper, A., 2004. Tratado de Botánica. 35ª Edición actualizada por: Sitte, P.; Weiler, E.; Kadereit, J.; Bresinsky, A. y Körner, C. Ediciones Omega. Barcelona (España). 1134 pp.

Tan, S. y Crabtree, G., 1992. Effects of nonionics surfactants on cuticular sorption and penetration of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. Pesticide Science, 35:229-303.

Tecle, B.; Da Cunha, A. y Shaner, D., 1993. Differential routes of metabolism of imidazolinones: basis for soybean (*Glycine max*) selectivity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 46:120-130.

Tharayil-Santhakumar, N., 2003. Mechanism of herbicide resistance in Weeds. Plant & Soil Sciences. University of Massachusetts. U.S.A.

Thompson, O.; Truelove, B. y Davis, D., 1974. Effects of triazine on energy relations of mitochrondia and chloroplasts. Weed Science, 22:164-166.

Thompson, O.; Truelove, B. y Davis, D., 1969. Effect of herbicide prometryne [2,4-bis-(isopropylamino)-6(methylthio)-S-triazine] on mitochondria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17:997-999.

Tisdale, S.; Nelson, W.; Beaton, J. y Haulin, J., 1993. Soil Fertility and Fertilizers. Quinta edición. Macmillon Publishing. New York (USA). 634 pp.

Trezzi, M. y Vidal, R., 2001. Herbicidas Inibidores da ALS (Capítulo 4). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado por Vidal, A. y Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 152 pp.

Trezzi, M.; Kruse, N y Vidal, R., 2001. Inibidores de EPSP (Capítulo 5). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado Vidal, A. y Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 152 pp.

Usui, K., 2001. Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants (Review). Weed Biology and Management, 1:137-146.

Valverde, B., 1985. Apuntes sobre el modo de acción de los herbicidas. International Plant Protection Center. Oregon State University. Paper 8-A.

Vaughn, K. y Lehnen. L., 1991. Mitotic disrupter herbicides. Weed Science, 39: 450-457.

Vega, N., 1987. Las malezas y su Combate: Aspectos Generales. Ediciones de la Biblioteca, Universidad Central de Venezuela. Caracas (Venezuela). 138 pp.

Vicari, A.; Otto, S. y Zanin, G., 2001. Dinamica ambientale degli erbicidi. (Parte V - Capitolo 6). En: Malerbologia. Editado por Catizone, P. y Zanin, G. Patrón Editore. Bologna (Italia). 925 pp.

Vicente, J.; Santos, M.; Vercesi, A. y Madeira, V., 1998. Comparative effects of the herbicide dinitro-o-cresol on mitochondrial bioenergetics. Pesticide Science, 54: 43-51.

Vidal, R. y Fleck, N., 2001. Inibidores de polimerizaçãde tubulina (Capítulo 13). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado Vidal, A. y Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (Brasil). 152 pp.

Vidal, R. y Merotto, A., 2001. Inibidores de ACCase (Capítulo 3). En: Herbicidologia. Primera edición. Editado por Vidal, A. y Merotto, A. Biblioteca setorial de Facultade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (Brasil). 152 pp.

Wakabayashi, K. y Böger, P., 2004a. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 1): The photosynthetic electron transport system. Weed Biology and Management, 4:8-18.

Wakabayashi, K. y Böger, P., 2004b. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): Amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and others tragets for future hericides. Weed Biology and Management, 4:59-70.

Werck-Reichhart, D.; Hehn, A. y Didierjean, L., 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. Trends in Plant Science, 5:116-123.

Whitmarsh, J. y Govindjee, N., 2001. The Photosynthetic process. En: "Concepts in photobiology: Photosynthesis and photomorphogenesis". Editado por Singhal, G.; Renger, G.; Sopory, S.; Irrgang, K. y Govindjee, N. Publishers/New Delhi; and Kluwer Academic/Dordrecht.

Wu, J.; Hwang, I. y Hatzios, K., 2000. Effects of chloroacetanilide herbicides on membrane fatty acid desaturation and lipid composition in rice, maize, and sorghum. Pesticide Biochemistry and Physiology, 66:161–169.

Yamato, S.; Katagiri, M. y Ohkawa, H., 1994. Purification and characterization of a proporphyrinogen-ozidizing enzime with peroxidase activity and light-dependt herbicide resistance in tobacco cultured cells. Pesticide Biochemistry and Physiology, 50:72-82.

Zagnitko, O.; Jelenska, J.; Tevzadze, G.; Haselkorn, R. y Gornicki, P., 2001. An isoleucineyleucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 98:6617-6622.

Zajc, A.; Neuefeind, T.; Prade, L.; Reinemer, P.; Huber, R. y Bieseler, B., 1999. Herbicide detoxification by glutathione S-transferases as implicated from X-ray structures. Pesticide Science, 55:248-252.

Zimdahl, R., 1999. Fundamentals of Weed Science. Second edition. Academic Press. U.S.A. 556 pp.

View publication stats