

**UNIVERSIDAD DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Sección de Químicas



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la inhibición de la fotosíntesis por el monuron (3-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea) en diversas especies de plantas cultivadas y metodología para la determinación de residuos en suelos utilizando trazadores radiativos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Ramón García Hierro**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

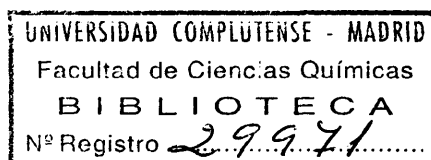


5326704537

**ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA FOTOSINTESIS POR  
EL MONURON [3-(p-CLOROFENIL) 1,1-DIMETILUREA] EN  
DIVERSAS ESPECIES DE PLANTAS CULTIVADAS Y  
METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS  
EN SUELOS UTILIZANDO TRAZADORES RADIATIVOS.**

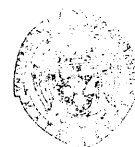
por

**JOSE RAMON GARCIA HIERRO**



**MEMORIA**

presentada para aspirar al  
**GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

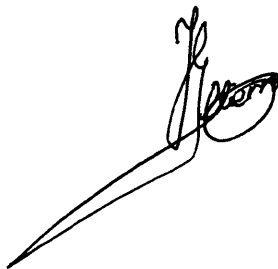


FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
BIBLIOTECA

625452058  
03819577X

**JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR  
MADRID, ENERO 1972**

ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA FOTOSINTESIS POR EL MONURON  
[3-(P-CLOROFENIL)1,1-DIMETILUREA] EN DIVERSAS ESPECIES DE  
PLANTAS CULTIVADAS Y METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE  
RESIDUOS EN SUELOS UTILIZANDO TRAZADORES RADIOACTIVOS.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive script. The signature is positioned below the main text and appears to be a personal or institutional mark.

## INDICE

	Pag.
AGRADECIMIENTO . . . . .	viii
RESUMEN . . . . .	ix
1. INTRODUCCION . . . . .	1
1.1. OBJETO E INTERES DEL TEMA . . . . .	1
1.2. IMPORTANCIA DEL MONURON COMO HERBICIDA .	4
1.2.1. Historia . . . . .	4
1.2.2. Compuestos derivados de la fenil- urea . . . . .	5
1.2.3. Descripción y propiedades del mo- nurón . . . . .	5
1.2.4. Comportamiento del monurón en el suelo . . . . .	8
1.2.4.1. Absorción y movimiento . . . . .	8
1.2.4.2. Degradación . . . . .	9
1.2.4.3. Cálculo de la cantidad de mo- nurón persistente en el suelo.	13
1.2.4.4. Efecto sobre los microorga- nismos del suelo . . . . .	14
1.2.5. Actuación en plantas . . . . .	15

	Pag.
1.2.5.1. Absorción radicular . . . . .	15
1.2.5.2. Absorción foliar . . . . .	18
1.2.5.3. Fotosíntesis . . . . .	20
1.2.5.3.1. Concepto de la función fotosintética . . . . .	20
1.2.5.3.2. Inhibición de la reacción de Hill por las fenilureas.	24
1.2.5.4. Efecto sobre el desarrollo y transpiración. . . . .	30
1.2.5.5. Metabolización del monurón por las plantas . . . . .	32
2. TECNICAS GENERALES UTILIZADAS . . . . .	35
2.1. CONTAJE DE CARBONO-14 EN CENTELLEO LI- QUIDO . . . . .	35
2.1.1. Equipos utilizados . . . . .	35
2.1.2. Soluciones centelleadoras empleadas.	35
2.1.3. Medida de la actividad de los ex- tractos radiactivos . . . . .	36
2.1.3.1. Preparación de la muestra . . .	36

	Pag.
2.1.3.2. Curva de calibrado del grado de extinción obtenida por medio de estandarización externa . . . . .	37
2.1.4. Medida de la actividad de las muestras en suspensión . . . . .	41
2.1.4.1. Determinación de las condiciones óptimas de contaje y de la eficacia en función de la actividad . . . . .	42
2.1.4.2. Preparación de la muestra . . . . .	43
2.2. AUTORRADIOGRAFIA . . . . .	45
2.2.1. Técnica macroautorradiográfica para plantas . . . . .	45
2.2.2. Macroautorradiografía en cortes histológicos . . . . .	46
2.2.2.1. Preparación del material vegetal . . . . .	47
2.2.3. Técnica del "dipping" . . . . .	49
2.3. RADIOCROMATOGRAFIA . . . . .	51

	Pag.
2.3.1. Detección autorradiográfica . . . .	53
2.3.2. Radiorregistrador para cromatogramas . . . . .	53
2.3.3. Técnica del raspado . . . . .	55
3. PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	56
3.1. INFLUENCIA DEL CMU EN LA FOTOSINTESIS EN CLOROPLASTOS AISLADOS . . . . .	56
3.1.1. Especies vegetales empleadas . . .	57
3.1.2. Aislamiento de cloroplastos . . . .	57
3.1.3. Determinación del contenido en clorofila . . . . .	58
3.1.4. Método de operación . . . . .	59
3.1.5. Cálculo de la cantidad de DPIP reducido, a partir de las medidas de densidad óptica (D.O.) . . . . .	61
3.1.6. Resultados . . . . .	62
3.1.6.1. Cinética de la reacción de Hill . . . . .	62
3.1.6.2. Análisis estadístico . . . . .	68

	Pag.
3.2. PREPARACION DEL 3-(p-clorofenil)1,1-	
-dimetilurea-2- <sup>14</sup> C (MONURON) . . . . .	78
3.2.1. Carbonatación del reactivo de	
Grignard . . . . .	79
3.2.1.1. Consideraciones generales . .	79
3.2.1.2. Preparación del reactivo	
de Grignard a partir del	
cloro-bromobenceno . . . . .	80
3.2.1.3. Valoración del magnesiano . .	81
3.2.1.4. Obtención del p-clorobenzoi-	
co-1- <sup>14</sup> C . . . . .	82
3.2.1.4.1. Observaciones al método.	85
3.2.1.4.2. Resultados obtenidos . .	86
3.2.1.4.3. Pureza radioquímica . .	86
3.2.2. Obtención del monurón-2- <sup>14</sup> C . . .	87
3.2.2.1. Preparación del cloruro de	
ácido . . . . .	88
3.2.2.2. Formación del ester isociá-	
nico . . . . .	88

	Pag.
3.2.2.3. Obtención del monurón a partir del correspondiente ester isociánico. . . . .	89
3.2.2.4. Resultados obtenidos . . . .	89
3.2.2.5. Pureza radioquímica . . . . .	90
3.3. ESTUDIO DE LA ABSORCION RADICULAR . . .	90
3.3.1. Absorción por la planta completa .	91
3.3.2. Estimación del espacio externo e interno en raíces aisladas . . .	94
3.3.3. Análisis macroautorradiográfico .	102
3.3.4. Análisis microautorradiográfico .	102
3.3.5. Determinación de la viabilidad de las plantas de judía . . . . .	103
3.4. ABSORCION FOLIAR . . . . .	108
3.5. COMPORTAMIENTO DEL MONURON EN SUELOS. .	112
3.5.1. Estudio del movimiento vertical del monurón en función de las diferentes dosis de riego. . . . .	114
3.5.2. Degradación del monurón en el suelo . . . . .	116

	Pag.
3.5.3. Análisis estadístico . . . . .	124
4. DISCUSION DE RESULTADOS . . . . .	125
4.1. ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA FOTO- SINTESIS POR EL MONURON EN CLOROPLAS- TOS AISLADOS DE DIVERSAS PLANTAS . . . . .	125
4.2. ABSORCION RADICULAR DEL MONURON POR PLANTAS DE JUDIA Y CEBADA . . . . .	127
4.3. ABSORCION FOLIAR . . . . .	131
4.4. COMPORTAMIENTO DEL MONURON EN EL SUELO. . .	133
4.4.1. Emigración vertical en función de la dosis de riego . . . . .	133
4.4.2. Degradación del monurón en el suelo. .	135
5. APLICACION PRACTICA DE LOS RESULTADOS OBTENI- DOS A LAS CONDICIONES DE CAMPO . . . . .	140
6. CONCLUSIONES . . . . .	145
7. BIBLIOGRAFIA . . . . .	149
ANEXO I : Abreviaturas y símbolos . . . . .	159
ANEXO II : Índice de tablas . . . . .	162
ANEXO III : Índice de figuras . . . . .	168

El presente trabajo ha sido realizado en la Sección de Isótopos, División de Química Nuclear de la Dirección de Química e Isótopos de la Junta de Energía Nuclear.

El autor agradece:

Al Dr. J. Fernandez González su dirección y ayuda constante en la realización del trabajo y redacción de la memoria.

A los Profesores F. Bustinza Lachiondo, que se digna apadrinar este trabajo y A. Martin Municio por sus lecturas y comentarios del manuscrito.

A los Dres. M. del Val Cob, N. Ortín Suñé, I. Esparraguera Martinez, D. de la Sierra Serrano y a la Dra. D. Rebollo Garrido de la Sección de Isótopos, por su colaboración en diferentes aspectos del trabajo.

A la Dra. C. Suarez Contreras de la Sección de Radioquímica por su ayuda en la síntesis del monurón-2-<sup>14</sup>C.

Al Instituto de Estudios Nucleares por la ayuda económica facilitada y a los Dres. R. Fernández Cellini (Director de Química e Isótopos) y F. de la Cruz Castillo (Jefe de la División de Química Nuclear) por las facilidades recibidas.

Finalmente al Servicio de Biblioteca y Documentación de la Junta de Energía Nuclear y a todo el personal técnico y auxiliar que ha colaborado.

Estudio de la inhibición de la fotosíntesis por el monurón (3-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea) en diversas especies de plantas cultivadas y metodología para la determinación de residuos en suelos utilizando trazadores radiactivos.

### RESUMEN

Se estudia la influencia de diversas concentraciones de monurón, en la actividad fotosintética de los cloroplastos aislados de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), judía (*Phaseolus vulgaris*), alfalfa (*Medicago sativa*) y espinaca (*Espinacia oleracea*) utilizando el 2,6 diclorofenol-indofenol (DPIP) como indicador de óxido-reducción. Se ha encontrado que concentraciones comprendidas entre  $6,6 \cdot 10^{-4}$  y  $6,6 \cdot 10^{-6}$  M (equivalentes a 130  $\mu\text{g/ml}$  y 1,3  $\mu\text{g/ml}$ ), son capaces de inhibir casi completamente la reacción de Hill en los cloroplastos de todas las especies estudiadas.

Se ha sintetizado el (3-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea-2- $^{14}\text{C}$ ) y se ha utilizado para determinar la concentración que alcanza este herbicida en los órganos fotosintéticos de la planta, cuando se absorbe radicularmente y se ha correlacionado el efecto de diversas dosis absorbidas radicularmente con la inhibición de la fotosíntesis estudiada "in vitro" con cloroplastos aislados.

Se estudia la cinética de absorción radicular del her-

herbicida marcado con Carbono-14 en plantas de judía y cebada mantenidas en solución nutritiva. Para cada planta se estudia la variación del espacio externo e interno radicular, durante las 20 primeras horas de absorción, así como el reparto del herbicida en los diferentes órganos del vegetal.

Se determina la influencia de la temperatura e iluminación, en la absorción foliar del monurón por plantas de judía y cebada.

Se ha estudiado también, la emigración vertical del monurón en función de la dosis de riego para cuatro tipos de suelos, encontrándose una velocidad media, expresada en mm de profundidad por cada mm de altura de riego, que varía desde 0,85 para el suelo más arcilloso a 1,77 para el suelo arenoso.

La degradación anual de este herbicida en el suelo alcanza un valor del 50%, aproximadamente, cuando los suelos se mantienen en las condiciones ambientales resguardados de la lluvia directa y de un 70% cuando se mantienen en condiciones favorables de humedad.

Finalmente se discuten los resultados, se expresan las conclusiones del trabajo experimental y se aplican con un criterio agronómico a los cultivos de secano y regadío de la península Ibérica.

## 1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION.

### 1.1. OBJETO E INTERES DEL TEMA.

El control de las malas hierbas mediante herbicidas selectivos, es uno de los problemas que plantea la agricultura en todos los países desarrollados. En los últimos veinticinco años, muchos investigadores han dedicado su esfuerzo al descubrimiento de nuevas sustancias, capaces de destruir las malas hierbas de los cultivos sin afectar a éstos.

El fundamento de la acción selectiva de los herbicidas, radica en las diferencias anatómicas y fisiológicas de las diversas especies vegetales. Estas diferencias determinan, en cada caso particular, el grado de susceptibilidad de las malas hierbas y plantas cultivadas ante un mismo tratamiento.

A partir del descubrimiento de las propiedades herbicidas del monurón (3-(p-clorofenil)-1,1-dimetilurea), realizado por Bucha y Todd en 1951 (1), una gran cantidad de trabajos han ido esclareciendo, en parte, el modo de actuación de este compuesto sobre los vegetales. Los trabajos de Cooke (2) y Wessels y Van der Veen (3), en 1956, demostraron que el efecto herbicida de este compuesto, así como el de otras fenilureas sustituidas, era debido principalmente a la inhibición de la reacción de Hill en la fotosíntesis.

En el presente trabajo, se estudia la influencia de diversas concentraciones de monurón (CMU) sobre la actividad

fotosintética de cloroplastos aislados de hojas de judía, alfalfa, avena, espinaca y cebada; determinándose la relación entre la concentración del herbicida y el poder inhibidor para los cloroplastos de cada especie.

Con objeto de determinar la concentración que alcanza este compuesto en las hojas de plantas de cebada y judía que lo absorbieron radicularmente, se sintetizó el monuron-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>, utilizando las técnicas de centelleo líquido para su medida.

Se ha estudiado con detalle el proceso de la absorción radicular de diversas concentraciones de CMU-<sup>14</sup>C, y se ha determinado la concentración que alcanza este compuesto en los órganos fotosintéticos para las diferentes dosis de tratamiento. De esta manera se ha establecido la concentración que produce condiciones de letalidad y este dato encontrado para la planta completa, se ha correlacionado con el hallado en las experiencias "in vitro" con cloroplastos aislados.

Por ser el CMU un herbicida que se aplica sobre el suelo, es importante estudiar la degradación de este compuesto en función del tiempo y el arrastre por las aguas de riego. Estos valores determinaran, en función de las condiciones anteriores, la cantidad de herbicida presente en la zona de absorción radicular en cada momento, así como los residuos que quedarían para cultivos posteriores.

Con objeto de esclarecer los aspectos anteriores, se ha efectuado un estudio de la degradación del CMU durante un año en cuatro tipos de suelos diferentes mantenidos en condiciones de campo, aunque resguardados de la lluvia directa. El estudio de la influencia del arrastre del herbicida en función de las dosis de riego, se efectuó mediante elución en columnas especiales para facilitar el muestreo a diferentes profundidades.

A partir de los datos obtenidos sobre la persistencia, la concentración del herbicida en el suelo, la absorción radicular en función de la concentración en la solución nutritiva y los de inhibición fotosintética en función de la concentración alcanzada por el monuron en las hojas, se discuten los resultados y se obtienen las conclusiones que permiten evaluar el grado de inhibición de la fotosíntesis en plantas cultivadas en un suelo que haya sido tratado con CMU. El poder inhibitor dependerá del tipo de suelo, del tiempo transcurrido desde que se efectuó la aplicación y de las condiciones climáticas que haya soportado el suelo.

## 1.2. IMPORTANCIA DEL MONURON COMO HERBICIDA.

### 1.2.1. Historia.

La primera sustancia orgánica usada como herbicida, fue el 2-metil-4-6 dinitrofenol (DNOC) en 1932.

En el año 1942 Zimmerman y Hitchcock (4) descubrieron las propiedades del 2,4-D como regulador del crecimiento de las plantas, dando un gran impulso a la síntesis de nuevos compuestos orgánicos que pudieran tener propiedades herbicidas y fitorreguladoras.

El descubrimiento de las propiedades herbicidas de las fenilureas sustituidas realizado por Thompson y colaboradores en 1946 (5), atrajo la atención de los fisiólogos sobre estos compuestos. En 1950 (6) fue sintetizado el monuron en los laboratorios de la Sociedad Du Pont de Nemours (E.E.U.U.) y utilizado con escaso éxito en la lucha terapéutica contra la coccidiosis. En 1951 Bucha y Todd (1) describen por primera vez la síntesis del monurón y su ensayo como herbicida. McCall en 1952 (7) prueba su eficacia como herbicida selectivo, aplicado en dosis bajas y como esterilizante del suelo en dosis más elevadas; utilizandose a partir de este momento en grandes cantidades para la limpieza de acequias, líneas telegráficas, vegetación espontánea crecida alrededor de construcciones, etc...

Es en 1956, con los trabajos de Cooke (2) y Wessels y Van der Veen (3), cuando se inicia el estudio de la propiedad más importante del monurón, su acción inhibidora sobre la reacción de Hill en la fotosíntesis. Esta propiedad ha sido utilizada por los bioquímicos, para estudiar los aspectos fundamentales del mecanismo de la transferencia de electrones en la fotosíntesis (8). Calvin que obtuvo el Premio Nobel en 1961 por sus trabajos sobre fotosíntesis, utilizó en sus investigaciones el monurón, (63) consiguiéndose gracias a ello, una información básica adicional muy valiosa.

Con la síntesis de nuevos derivados de la urea, de fórmula más compleja, el monurón ha ido perdiendo algo de su importancia como herbicida selectivo pero sigue siendo muy utilizado en las investigaciones sobre el mecanismo fotosintético.

#### 1.2.2. Compuestos derivados de la fenilurea.

Los compuestos más importantes derivados de la fenilurea, así como sus propiedades físicas principales se detallan en la tabla nº 1.

#### 1.2.3. Descripción y propiedades del monurón.

El monurón es un compuesto de color blanco, de peso molecular 198,7, cristaliza de metanol en forma de prismas

TABLA I. Compuestos derivados de la urea usados como herbicida. Propiedades fisico-químicas.

Nombre químico	Nombre común	Peso Molecular	Solubilidad agua P.P.M.	Punto de fusión °C	Presión de vapor m Hg
3 fenil-1,1 dimetil-urea	Fenuron	164,2	3850 (25°)	133-134	
3-(p-clorofenil)-1,1 dimetil-urea.	Monuron	198,7	230 (25°)	176-177	$5 \times 10^{-7}$ (25°C)
3-(3,4 diclorofenil)1,1 dimetil-urea.	Diuron	233,1	42 (25°)	158-159	$0,31 \times 10^{-5}$ (50°C)
3-(m-trifluorometilfenil)1,1 dimetil-urea.	Fluometurón	232,1	90 (25°)	163-164,5	$5 \times 10^{-7}$ (20°C)
3-4(p-clorofenoxi)fenil -1,1 dimetil-urea.	Cloroxurón	290,7	3,7 (20°)	151-152	
3-cicloactil-1,1-dimetil-urea	Ciclorurón	198,2	1200 (20°)	138	
3-(Hexahidro-4,7-metanoindan 5 y 1)-1,1-dimetil-urea.	Norea	222,3	150	168-169	
3-(3,4-diclorofenil)1-butyl-1-metil-urea.	Neburón	275,2	4,8 (24°)	102-103	
3-(p-clorofenil)-1 metil 1-(1-metil-2 propinil)-urea.	Buturón	236,7	30 (20°)	145-146	
3-fenil-1-(2 metil ciclohexil)-urea.	Sidurón	232,3	18 (25°)	133-138	
3-(p-clorofenil)-1 metoxy-1-metil-urea.	Monolinurón	214,6	930 (20°)		$1,5 \times 10^{-4}$ (24°C)
3-(p-bromofenil)-1-metoxy-1-metil-urea.	Metobronurón	259,1	330 (20°)	95-96	$3 \times 10^{-6}$ (20°C)
3-(3,4-diclorofenil-1-metoxy-1-metil-urea.	Linurón	249,0	75 (25°) (du Pont) 220 (20°) (Hoechst)	93-94	$1,5 \times 10^{-5}$ (24°C)
3-(3-cloro-4-bromofenil)-1-metoxy-1-metil-urea	Clorobronurón	293,6	50	94-96	$4 \times 10^{-7}$ (20°C)

rectangulares muy finos. Su punto de fusión varía según los autores, siendo para Bucha y Todd (1) de 170,5 - 171,5°C. Su presión de vapor es de  $5 \times 10^{-7}$  mm de Hg a 25°C y de  $3,4 \times 10^{-6}$  mm de Hg a 50°C.

La solubilidad en p.p.m. en distintos disolventes según la E.I. Du Pont de Nemours viene expresada en la tabla nº II.

TABLA II. Solubilidad del CMU en diferentes disolventes.

Disolvente	Temperatura	Solubilidad (p.p.m.)
Acetona	27°C	52.000
Benceno	27°C	2.900
Estearato de Butilo	27°C	1.500
Aceite de semilla de algodón	27°C	1.100
Aceite diesel nº 3	25°C	230
Agua	25°C	230

Como se puede observar, el monurón es poco soluble en disolventes polares tales como, acetona y etanol y muy poco en aceites y en agua, en solución acuosa da reacción ligeramente ácida. Dada su pequeña solubilidad en agua, este producto se expende corrientemente en el mercado en forma de polvos mojables, que son muy estables en condiciones normales de almacenamiento. Se descompone por la luz y por el calor a partir de 200°C. No es inflamable ni corrosivo. La  $DL_{50}$  de este compuesto, para ratas, es de 3,5 g por Kg de peso vivo (9).

#### 1.2.4. Comportamiento del monurón en el suelo.

##### 1.2.4.1. Adsorción y movimiento.

Se conoce muy poco del mecanismo de adsorción de los herbicidas por el suelo. Las características de éste, condicionan no solamente el grado de retención del herbicida, sino también su posterior transformación (10); (11) y (12).

Al estudiar la distribución del monurón en el suelo en función de la dosis de riego, hay que considerar no solo la emigración vertical del herbicida sino también la difusión horizontal (13). La concentración del herbicida en la solución del suelo es inversamente proporcional a la adsorción, dependiendo ésta del contenido en partículas coloidales y materia orgánica.

Del grado de adsorción del herbicida al suelo, dependerá en parte la degradación (31) y (32) y lixiviación por el agua de riego (14).

Lambert en 1967 (15), publicó un estudio sobre el reparto de los herbicidas entre el suelo y el agua, observando que para compuestos no ionizados y a pH comprendidos entre 4-8, la partición estaba íntimamente relacionada con el contenido en materia orgánica del suelo.

Briggs (16), estudió el coeficiente de partición K del herbicida entre el suelo y el agua, encontrando la

relación lineal  $x = Kc$ , siendo:

$x$  = los gramos adsorbidos de monurón por gramo de materia orgánica.

$c$  = la concentración de equilibrio del herbicida en el suelo.

$K$  = la constante de reparto.

Briggs obtuvo el  $K$  para las fenilureas y comprobó que éste, está muy relacionado con la estructura del compuesto.

Weldon y Timmins (17) estudiaron las pérdidas por lixiviación del monurón y la degradación según el grado de adsorción al suelo.

#### 1.2.4.2. Degradación.

El estudio de la persistencia de un herbicida en el suelo es de trascendental importancia para conocer la acumulación futura del producto y el posible daño sobre cosechas posteriores. En el caso de una aplicación selectiva de monurón a cultivos resistentes, puede quedar en el suelo cantidad suficiente como para dañar a otros cultivos posteriores que fueran sensibles a este producto.

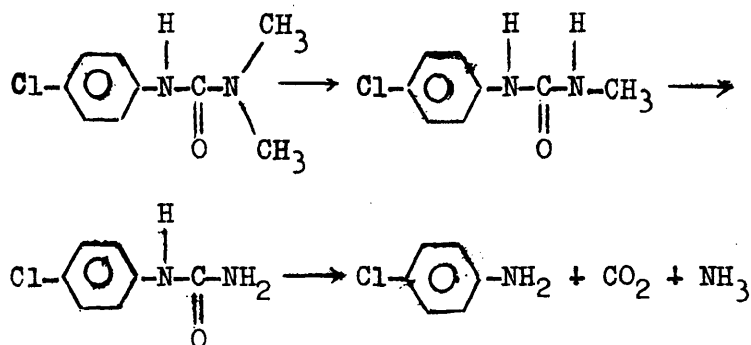
Sheet (18), ha publicado una revisión bibliográfica de los estudios realizados hasta el año 1964, sobre la persistencia del monurón y otros herbicidas derivados de

la urea en el suelo.

Se ha comprobado que en condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos, tales como, temperatura elevada, alto tanto por ciento de humedad y un gran contenido en materia orgánica, se acelera la inactivación de las fenilureas aplicadas al suelo (19), (20) y (21).

Se ha podido comprobar que algunas bacterias tales como *Pseudomonas* (22), *Xanthomonas*, *Sarcinas* y *Bacillus* (sp) y hongos tales como *Penicillium* y *Aspergillus* (sp.), que son habitantes comunes del suelo, son capaces de utilizar el monurón como única fuente de carbono cuando se cultivan en un medio sintético, ayudado por algún factor de crecimiento tal como extracto de levadura.

Se ha estudiado el camino que podría seguir el monurón en su degradación microbiana y parece ser que primero se produce una demetilación; después, en una segunda etapa se forma la fenilurea y más tarde la correspondiente p-cloroanilina; (23) y (24).



Dalton (24) también sugiere que esta p-cloroanilina continua degradándose hasta originar amoníaco, dióxido de carbono y halógeno, pero todo esto, es simplemente una hipótesis ya que lo único que se ha comprobado es que la anilina desaparece rápidamente y que en ciertas ocasiones se forman azoderivados, como observaron Bartha y Pramer (25).

Estudiando la fitotoxicidad de los derivados del monurón, se han hecho ensayos que indican que el metil derivado es menos tóxico que el dimetil derivado y que el compuesto demetilado y la p-cloroanilina son inactivos (26). En suelos esterilizados carentes de microorganismos, las pérdidas de monurón no son importantes.

Aunque se han hecho intensos estudios sobre los caminos de degradación y transformación de las fenilureas, se conoce muy poco acerca del tipo particular de enzimas y vías metabólicas que intervienen en la degradación de las fenilureas.

La fotólisis de las fenilureas fue estudiada por Hill y colaboradores (22). Estos autores hicieron pruebas exponiendo durante 43 días a la luz del sol una solución acuosa de monurón de 88 p.p.m. y comprobaron que al cabo de este tiempo el 83% del monurón se había descompuesto.

Hill no aisló ningún producto derivado de esta descomposición. (27)

De todas las fenilureas comunmente utilizadas como herbicidas, la que tiene menor estabilidad ante la luz es el monurón (28).

Aún no se han hecho estudios sobre la fotodescomposición del monurón en el campo, pero se sabe que es un factor importante de degradación. El principal camino de la fotodescomposición es la demetilación seguida de sustitución del halógeno por un grupo hidroxilo y posterior polimerización (29). Sheet (30), también comprobó que la actividad del monurón decrecía cuando se le exponía a la luz del sol, no variando apenas, si se le mantenía en la oscuridad.

La pérdida por volatilización de estos herbicidas es muy escasa, ya que, es normal el regar la superficie después de su aplicación, con objeto de que el compuesto descienda hasta la zona radicular de las plantas. La volatilización del monurón, dada su baja presión de vapor ( $5 \times 10^{-7}$  mm Hg), solo tendría alguna importancia en el caso de que el herbicida permaneciese sobre la superficie del suelo durante algunos días o semanas, en rigurosas condiciones de sequedad y elevada temperatura.

1.2.4.3. Cálculo de la cantidad de monurón persistente en el suelo.

La cinética de la desaparición del monurón en el suelo no ha sido muy estudiada. Hill (22) ensayando la degradación del monurón obtuvo unas curvas, que fueron interpretadas por Audus (33), en ellas se observaba una fase inicial de inducción enzimática en la cual las bacterias del suelo se adaptan al sustrato extraño al que son expuestas. En esta fase inicial de adaptación, influyen algunos factores fisico-químicos tales como la insolubilidad del compuesto y establecimiento gradual del equilibrio del herbicida en la solución del suelo. Hill indicó que la desaparición del monurón en el suelo, seguía una ecuación de primer orden, aunque también se debería tener en cuenta la humedad, temperatura, textura del suelo, etc. que corregirían la expresión inicial.

La descomposición del herbicida en el suelo es proporcional a la cantidad existente sin descomponer. Podemos escribir la ecuación:

$$\frac{d x}{d t} = - K x \quad (1)$$

donde  $x$  es la cantidad de herbicida presente en el suelo en el tiempo  $t$ .

$K$  es una constante que depende de las condiciones de cada suelo y demás condiciones ambientales.

Integrando la ecuación (1) queda  $x = x_0 \cdot e^{-kt}$  siendo  $x_0$  la cantidad de herbicida en el suelo en el instante inicial. Cuando un herbicida se aplica en años sucesivos al suelo es de esperar que se vaya acumulando en este y es muy interesante poder calcular la cantidad de residuo que queda en el suelo al cabo de  $n$  años.

Si se llama  $x$  a la fracción que queda en el suelo al principio de cada año y antes de una nueva aplicación,  $P$  a la dosis de aplicación anual y  $R$  el residuo final.

Al cabo del primer año el residuo será:

$$R = P x$$

Después del segundo año el residuo será:

$$R_2 = (P + P x) x = P x + P x^2$$

y al cabo de  $n$  años:

$$R_n = P x + P x^2 + \dots + P x^n \text{ ó lo}$$

que es lo mismo.

$$R_n = \frac{P x (1 - x^n)}{(1-x)}$$

#### 1.2.4.4. Efecto sobre los microorganismos del suelo.

Las fenilureas sustituidas tienen un efecto muy pequeño sobre el número total de microorganismos del suelo. Quastel y Sholefield (34) afirman, que el monurón inhibe selectivamente el proceso de la nitrificación, pero Hale y colaboradores (35) no han podido confirmarlo.

Raud (36) ha demostrado que el monurón a concentraciones muy bajas, (1 p.p.m.), es tóxico para el alga del suelo *Stichococcus bacillus* y deduce que este herbicida tiene gran influencia sobre la relación carbono/nitrogeno en el suelo.

#### 1.2.5. Actuación en plantas.

El efecto del CMU sobre las plantas depende de muchos factores, siendo los mas importantes: la epoca y dosis de aplicación, el estado de desarrollo de la planta, la disponibilidad de nutrientes minerales en el suelo y la especie o variedad vegetal de que se trate.

##### 1.2.5.1. Absorción radicular.

El estudio de la absorción radicular de los herbicidas selectivos, tiene una gran importancia por ser el modo más general de penetración de estos compuestos en el interior de la planta. Incluso en aplicaciones de postemergencia, en que la absorción es principalmente por vía foliar, la porción de herbicida que cae al suelo es también absorbida radicularmente.

La absorción radicular de los herbicidas, se efectua en general de manera análoga a la absorción de sustancias minerales (37). El esquema de absorción propuesto por Crafts y Broyer (38) en 1938 sigue teniendo vigencia, en líneas generales, aunque completado posteriormente con

la noción de espacio externo y espacio interno después de los trabajos de Epstein, Fried y otros, (39), (40), (41) y (42).

En el proceso de la absorción radicular, se pueden observar dos mecanismos de distinta naturaleza y que juntos colaboran en la entrada de las sustancias disueltas en el interior de las células radiculares. Estos dos mecanismos pueden considerarse, uno de naturaleza físico-química y el otro de naturaleza metabólica. En un principio, los iones penetran en la raíz pasivamente por difusión y pasan a ocupar el llamado "espacio libre aparente". Este proceso es reversible y la dirección de entrada o salida viene determinada por el gradiente de concentraciones.

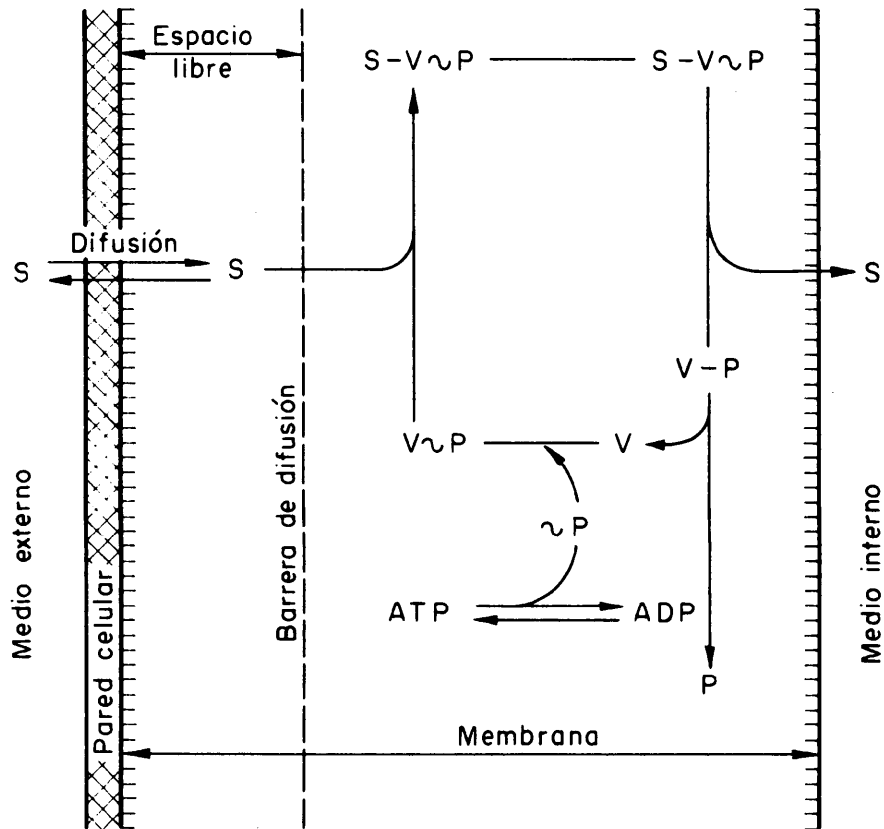
En una segunda etapa (que en realidad ocurre simultáneamente a la anterior), los iones son llevados al interior de la célula, donde pueden llegar a alcanzar una concentración muy superior a la exterior. Este proceso, en contra del gradiente de concentración, se realiza mediante un consumo de energía, que es suministrada por la raíz y se conoce con el nombre de transporte activo. En el transporte activo la sustancia se combina, en la membrana, con un compuesto portador activado y unida a él es llevada al interior de la célula. Al romperse la unión entre el portador y la sustancia, se separan ambos y el portador queda desactivado. La activación del portador se realiza mediante la absorción de energía suministrada

por el ATP. La selectividad de los portadores por las distintas sustancias, hace que la absorción total no sea igual para cualquier compuesto, y que incluso, lleguen a presentarse casos de competencia y antagonismo. En la figura nº 1 se esquematiza el proceso.

Para que se efectúe el transporte activo es necesario, como hemos mencionado anteriormente, un aporte de ATP por la raíz, siendo la respiración la principal fuente de suministro. Esto explica el que las raíces mal nutridas, o en medios carentes de oxígeno, solo puedan efectuar la absorción pasiva.

En la raíz, la absorción del herbicida puede efectuarse de forma activa en la zona epidérmica por los pelos absorbentes y trasladarse de unas células a otras a través de los plasmodosmos hasta alcanzar el xilema de donde se distribuye por el resto de la planta al entrar en el flujo circulatorio. También puede penetrar pasivamente a través de los espacios intercelulares hasta alcanzar la "banda de Caspari" que actúa de barrera a la absorción pasiva. En los espacios intercelulares existe una gran superficie que facilita el proceso de absorción. Estas dos formas de penetración se esquematizan en la figura nº 2 (43).

Todos los derivados de la urea utilizados como



V: Vector o portador inactivo  
 V~P: Vector activo  
 S: Sustancia (ion o molécula neutra)

FIG. 1.- ESQUEMA DEL PROCESO DE ABSORCIÓN PASIVA Y ACTIVA EN LA CELULA VEGETAL. EL ESPACIO LIBRE Y LA BARRERA DE DIFUSIÓN TIENEN UNA EXISTENCIA APARENTE MAS QUE REAL.

- A — Camino directo a través de los plasmodesmos.  
 B --- Camino a través del espacio intercelular hasta la banda de Caspari.

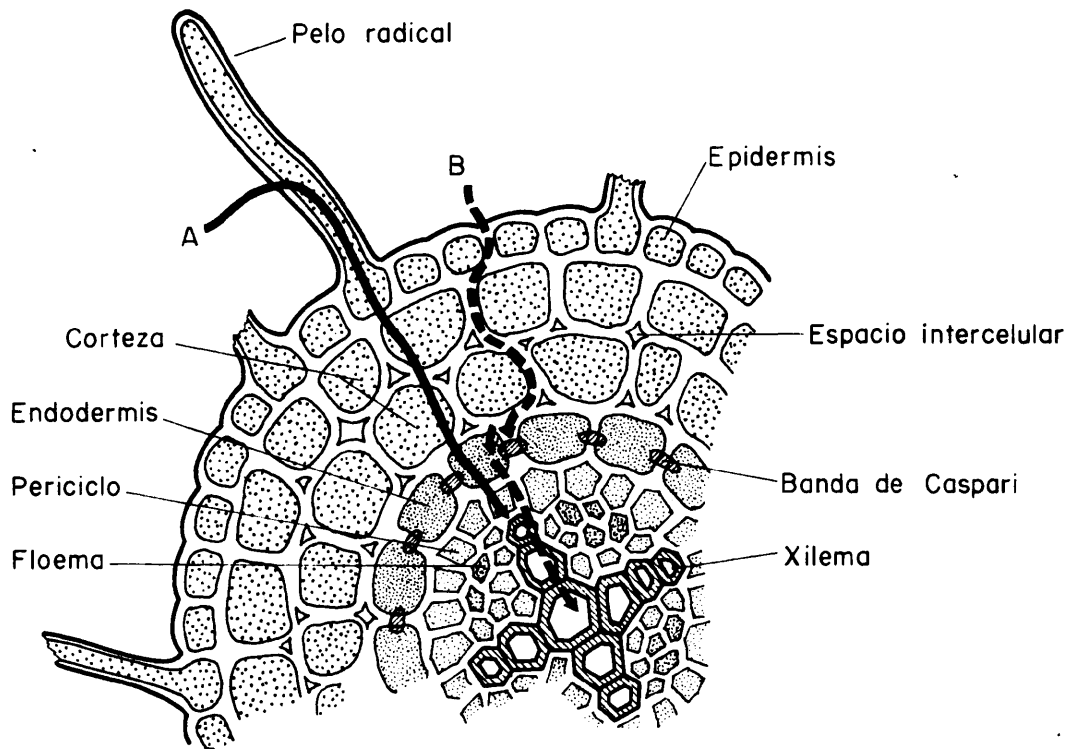


FIG. 2.— ESQUEMA DE LOS POSIBLES CAMINOS DE PENETRACION DE LAS SUSTANCIAS NUTRITIVAS A TRAVES DE LA RAIZ. (ESQUEMA SEGUN P. MARTIN RAY)

herbicidas, son fácilmente absorbidos por el sistema radicular de las plantas y translocados rápidamente hacia el tallo y hojas mediante la corriente transpiratoria. Factores que inducen un nivel de transpiración bajo, tal como alta presión de vapor en el medio ambiente exterior y cierre de estomas hacen decrecer la cantidad de herbicida traslocado a los órganos aéreos (44) y (45).

Cuando los compuestos son aplicados a los hipocótilos o zonas inferiores del tallo, se restringe la traslocación y además ésta solo se produce en dirección apical (46) y (47).

#### 1.2.5.2. Absorción foliar.

Las hojas no son órganos que estén preparados para el transporte y absorción de sustancias extrañas. En la parte externa se encuentra la cutícula que contiene alcoholes y ácidos de cadena larga polimerizados, con enlaces no saturados y grupos carboxílicos terminales que al disociarse en el agua, originan sobre la superficie cargas electronegativas. Esta superficie se puede considerar como un medio de cambio iónico, que atrae las cargas positivas y repele las negativas. En la cutícula hay ceras, que están formadas por cadenas cortas de esterres y alcoholes que carecen de grupos finales reactivos, siendo, algunos de ellos, compuestos cíclicos. A pesar de que estas ceras

son bastante inertes, tienen capacidad para disolver compuestos lipóideos y por tanto regulan la penetración de los herbicidas solubles dentro de la parte viva de la célula. (48).

A diferencia del 2,4-D (49) que es relativamente soluble, (6,089 gramos de 2,4-D en 100 gramos de agua), el monurón, tiene una solubilidad pequeña en sustancias lipóideas, por lo tanto su absorción por parte de las hojas está muy limitada.

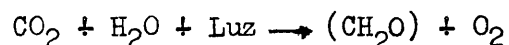
Se han hecho algunas experiencias con monurón marcado con carbono-14, que indican una ligera penetración foliar. Las autorradiografías de Vicia Faba, tratadas con monurón marcado revelan que la absorción es rápida, pero el transporte es muy lento.

Cuando las fenilureas se aplican a la superficie de las hojas pueden llegar a penetrar a través de la cutícula y de la epidermis y ésta penetración se intensifica con la adición de agentes surfactantes (50), (51) y (52); posteriormente el compuesto alcanza el parénquima mesofílico asimilador y más tarde incluso llega a las nerviaciones. No obstante parece ser que muy poca cantidad penetra en la corriente del floema y no se ha observado traslocación al tallo, flores u hojas vecinas a las tratadas. La sugerencia de que ciertos agentes surfactantes pueden inducir el movimiento de las fenilureas sustituidas en la corriente del floema, no ha sido claramente establecida (53).

### 1.2.5.3. Fotosíntesis.

#### 1.2.5.3.1. Concepto de la función fotosintética.

El proceso global de la fotosíntesis puede esquematizarse en la ecuación empírica siguiente.

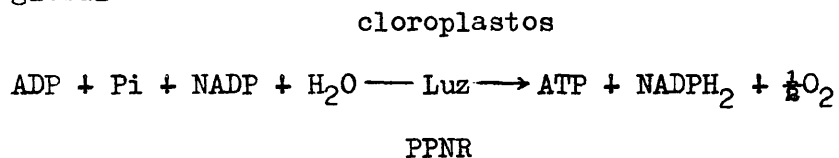


$$\Delta G^\circ = 115 \text{ Kcal}$$

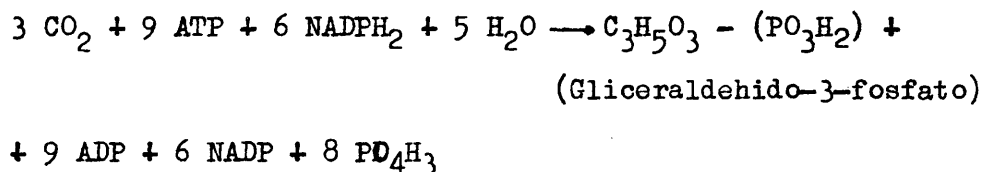
La reacción es fuertemente endergónica y se produce gracias a la energía luminosa absorbida por el aparato fotosintético que se encuentra localizado en los cloroplastos de los vegetales autótrofos (fotolitotrofos). Dentro de los cloroplastos, los pigmentos asimiladores constituyen aproximadamente el 10% del peso seco y están formados principalmente por clorofilas y carotenoides. En las plantas superiores, la fotosíntesis se realiza mediante la absorción de la luz por la clorofila a; los restantes pigmentos tienen una misión accesoria que todavía no ha sido esclarecida totalmente.

La primera parte de la fotosíntesis transcurre en presencia de la luz. En ella la energía luminosa es captada por la clorofila y utilizada para formar ATP y sustancias de un fuerte potencial reductor, tal como el  $\text{NADPH}_2$ , obtenido gracias a la reducción

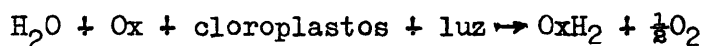
del NADP con electrones arrancados a la molécula de  $H_2O$  y liberando oxígeno molecular según la ecuación global:



En una etapa posterior el ATP y el  $\text{NADPH}_2$  formados en la fase luminosa son utilizados para reducir el  $\text{CO}_2$  y asimilarlo en forma de carbohidratos según la ecuación global:



La capacidad reductora de los cloroplastos en presencia de la luz fué comprobada experimentalmente por Hill en 1937, al demostrar que iluminando cloroplastos aislados se catalizaba la reducción de un oxidante con desprendimiento de oxígeno. Esta reacción se conoce con el nombre de reacción de Hill:



Como oxidante (Ox), se puede utilizar sustancias coloreadas tales como iones férrico, benzoquinona o el 2-6, diclorofenol indofenol (DPIP) que es azul en estado oxidado y se decolora al reducirse.

En la fotosíntesis, la reducción del NADP a partir de los electrones arrancados al agua, se realiza a través de una serie de transportadores red-ox, que van tomando y cediendo los electrones y quedando en forma reducida y oxidada alternativamente.

Sabemos que cada sistema red-ox tiene un potencial de oxido-reducción y siempre podrá reducir a otro sistema que tenga un potencial mayor sin necesidad de aporte de energía. Si el sistema oxidante tiene un potencial menor que el reductor, será necesario un aporte exterior de energía.

El potencial red-ox del sistema  $H_2O/O_2$  es de + 0,8 voltios y el de  $CO_2$ /hexosa es de - 0,4 voltios; por tanto para que pueda efectuarse la reducción del  $CO_2$  a partir del  $H_2O$ , es necesario suministrar a cada electrón que intervenga, una energía de  $0,8 + 0,4 = 1,2$  electrón - voltios, equivalente a 112 Kcal por cada mol de  $CO_2$  que se reduzca a hexosa.

La absorción de esta energía se realiza por dos fotosistemas distintos, que contienen principalmente clorofila a, y están localizados en el cloroplasto.

El esquema de la reacción luminosa puede verse en la figura nº 3. La clorofila a del fotosistema I en su forma excitada, actúa, como un reductor muy energético y cede un electrón a un aceptor Z de naturaleza

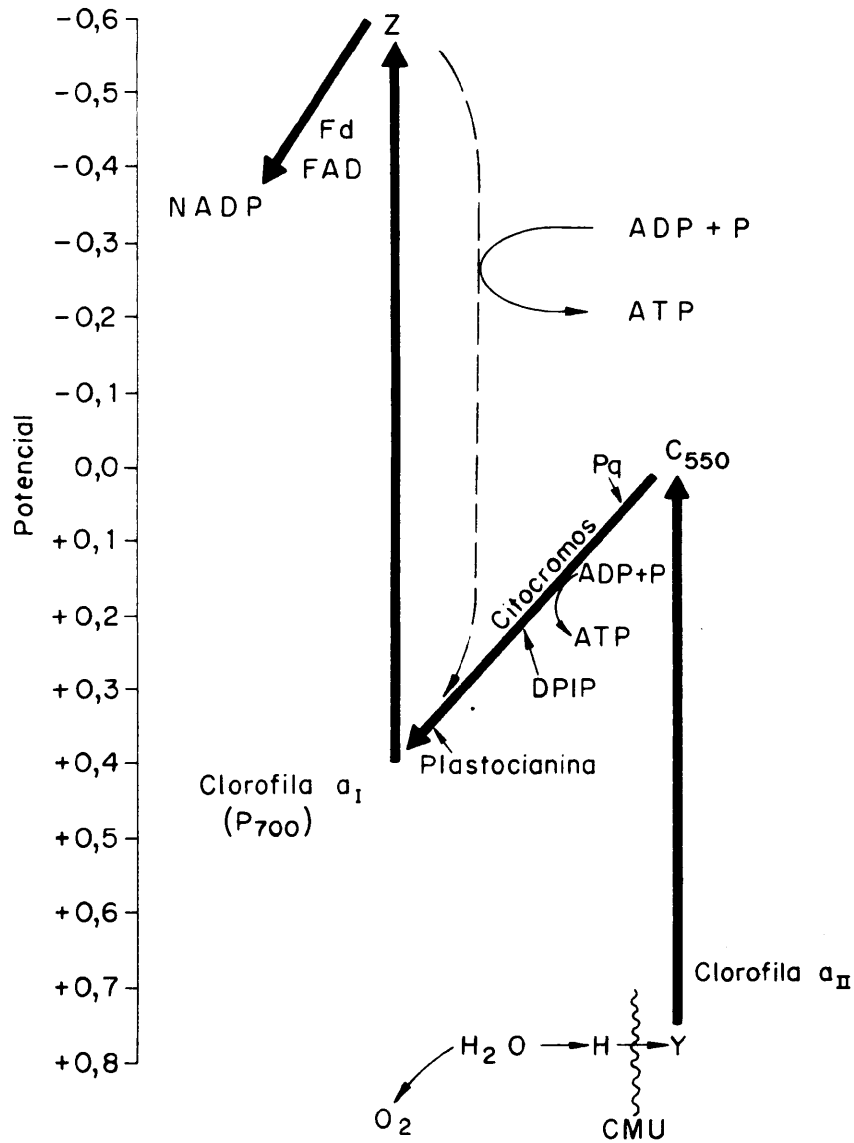


FIG. 3. — ESQUEMA DE LA REDUCCION DEL NADP POR LOS ELECTRONES PROCEDENTES DEL H<sub>2</sub>O EN LA FASE LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS. SINTESIS DE LOS ESQUEMAS DE LEVINE (67) Y ARNON (122). SE DESCONOCE LA NATURALEZA DE LOS COMPUESTOS Y, C<sub>550</sub> Y Z.

desconocida, aunque de existencia real (ultimamente se ha descubierto que Z en lugar de ser un solo aceptor son varios, aunque no se conoce su naturaleza) (54). La reducción del NADP a partir de Z se realiza de forma exergónica a través de la Ferredoxina, proteína que contiene hierro no porfirínico y posiblemente a través del sistema FAD/FADH.

El déficit de electrones que se produce en la clorofila  $a_I$ , es repuesto por el fotosistema II, en el cual, la clorofila  $a_{II}$  excitada por la luz, es capaz de transferir un electrón desde un compuesto Y no identificado a la plastoquinona. El compuesto Y es un oxidante tan enérgico que arranca electrones a la molécula de agua.

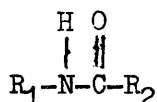
La plastoquinona, cuyo potencial red - ox es cero aproximadamente, repone exergónicamente los electrones perdidos por la clorofila  $a_I$  del fotosistema I, a través de una serie de transportadores entre los que figuran el citocromo b, el citocromo f y la plastocianina. En el transporte de los electrones a través de los citocromos, la diferencia de potencial, de 0 a 0,4 voltios, es suficientemente elevada para formar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico. De esta manera, la energía luminosa se acumula en forma de energía química para ser utilizada en el estroma en la

síntesis de hidratos de carbono, o incluso fuera del plasto. Cuando la clorofila  $a_1$  excitada no encuentra un aceptor adecuado, puede ceder un electrón otra vez a la plastocianina y en este salto se puede formar también ATP (fotofosforilación cíclica).

#### 1.2.5.3.2. Inhibición de la reacción de Hill por las fenilureas.

Como vimos anteriormente, una vez descubierta la actividad herbicida del monurón, se descubrió su actuación sobre la reacción de Hill (3).

Las fonilureas sustituidas pueden ser incluidas en un grupo más amplio de fórmula:

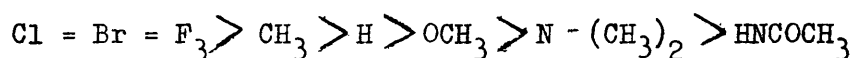


Los compuestos que responden a esta fórmula son amidas cuya complejidad depende de los radicales  $R_1$  y  $R_2$ .

Se ha estudiado el efecto de diferentes compuestos derivados de las distintas amidas con relación a la inhibición de la fotosíntesis. La inhibición llega a ser máxima dentro de estos compuestos, cuando  $R_1$  es un anillo aromático y  $R_2$  es un radical alquil-amino. Si además estas fenilureas contienen un halógeno en posición meta o para en el anillo aromático, se

eleva el grado de inhibición en comparación con los compuestos no sustituidos.

Según Wessels y Van der Veen (3), la eficacia inhibidora de estos compuestos crece en el caso de que el sustituyente del radical fenilo sea un cloro, bromo ó trifluorometano, pudiendose establecer un orden de decrecimiento en cuanto a poder inhibitorio se refiere:



Paroce ser, que para que un compuesto tenga la propiedad de ser inhibidor de la reacción de Hill, debe reunir una serie de propiedades entre las que se debe considerar: el balance hidrófilo/lipófilo, una relación estérica determinada, resonancia específica, tautomerización ceto-enólica y relación cis-trans del hidrógeno amídico y del oxígeno carbonílico. También es importante, el poseer grupos sustituyentes con una carga crítica determinada, y además que estos grupos participen en interacciones moleculares con los centros activos donde el compuesto va a ejercer su efecto inhibidor (55) y (56). Por otra parte estas sustancias tienen un átomo de hidrógeno, el del grupo imino, que posiblemente sea el responsable de la unión de estos inhibidores a los centros activos de los órganos fotosintéticos por medio de enlaces de hidrógeno (57).

En resumen los inhibidores deben tener propiedades que les permitan llegar hasta los centros activos, donde, completando la configuración molecular de éstos, bloquean alguna reacción que impida el normal desarrollo del proceso fotosintético.

Para poder comparar la acción inhibidora de estos compuestos, se expresa su actividad sobre la reacción de Hill por medio del  $PI_{50}$ , término convencional, que indica la concentración molar del herbicida en el sistema heterogéneo del jugo celular, que reduce la actividad fotosintética al 50%. De acuerdo con Good (58), el parámetro que expresa la concentración de CMU en el sistema heterogéneo, no tiene gran significación si no se conoce la distribución del herbicida entre el citoplasma y los cloroplastos, o lo que es lo mismo, qué cantidad de compuesto es la que interacciona directamente con los cloroplastos.

Good e Izawa estudian con detalle la absorción del herbicida y la cinética de inhibición, observando un proceso inicial de absorción irreversible sin relación aparente con la actividad inhibidora. También describen el reparto del herbicida entre el citoplasma y los cloroplastos y relacionan la cantidad fijada en los cloroplastos con el grado de inhibición (59).

Revisando la bibliografía, se puede observar la falta de unanimidad en los valores de la concentración de herbicida necesaria para producir el  $PI_{50}$ , así como, en la relación moles de CMU/moléculas de clorofila.

Bishop (1958) (60) y Jagendorf (61), demostraron la inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos que previamente habían sido tratados con monurón y diurón. Ashton y colaboradores observaron que al aplicar a las raíces de judía una solución de 10 p.p.m. de monurón, se reducía la fijación de  $^{14}CO_2$  en un 6,5% (62).

Uno de los puntos más estudiados con el fin de encontrar el lugar en el que se produce la actuación inhibidora del herbicida, ha sido el transporte de electrones (63).

Se puede observar en los diferentes autores que han publicado trabajos sobre este tema, la coincidencia en afirmar, que este grupo de herbicidas, inhibe la fotólisis del agua que realiza el fotosistema II impidiendo el transporte de electrones consiguiente y sin afectar directamente al fotosistema I. Todos los órganos fotosintéticos estudiados reemiten luz después de ser iluminados y el espectro de esta luz reemitida es casi idéntico al espectro de fluorescencia de la clorofila a (64).

Se ha observado que la reemisión de luz se anula rápidamente debiéndose este hecho a algunos compuestos de vida muy corta (3-15 mseg) responsables de esta reemisión. (65) y (66). Es conocido, que la clorofila iluminada se excita y los electrones salen fuera, siendo atrapados por los aceptores de electrones (67). En el tratamiento con CMU, los huecos dejados por los electrones no son rápidamente rellenados ya que este compuesto y otros herbicidas del mismo grupo, bloquean el suministro de los electrones procedentes del  $\text{OH}^-$ .

A mayor intensidad luminosa la clorofila pierde mayor número de electrones con lo que se produce una oxidación que la desnaturaliza.

Se ha demostrado que el monurón ejerce una actuación muy específica sobre los compuestos responsables de la reemisión de la luz en *Chlorella*, *Euglena* y plantas superiores.

Aunque el sitio exacto de la inhibición del monurón no es conocido, se sabe que afecta a la liberación de oxígeno. Sweetser y Todd (68) han observado como se reduce la producción de ATP al tratar cloroplastos aislados con monurón, pero que éste efecto se contrarresta si se añade ascorbato como fuente de electrones y fenacina metasulfato.

El monurón también inhibe la reducción del DPIP en cloroplastos sometidos a fuerte iluminación sin embargo, no es afectada la fotofosforilación en presencia de ascorbato y DPIP (69). Asahi y Jagendorf en 1963 (70), observan que el ión N-metilfenazonium cataliza la fotofosforilación en cloroplastos envejecidos, pero que al añadir monurón en elevada concentración ( $10^{-4}M$ ), se inhibe la fotofosforilación.

Duysen fue cronologicamente el primer autor en aportar pruebas a favor del modelo de dos sistemas fotoquímicos de actuación simultanea, al encontrar que el citocromo c se reduce por la luz de longitud de onda más corta absorbida por el fotosistema II y se oxida por la luz de longitud de onda más larga absorbida por el fotosistema I. Esto demostraba que el citocromo c se encuentra entre los dos fotosistemas. Otros investigadores demostraban el mismo proceso con el citocromo b. Duysen intuía que el monurón evita la reducción del fotosistema I por un reductor "Q" previamente reducido por el fotosistema II de acuerdo con la idea de Lavorel (71), (72) y (73).

Gingras y Lomasson comprueban este hecho midiendo el  $O_2$  liberado y mencionan a un compuesto E que se encuentra entre los dos sistemas fotoquímicos y que es oxidado por el fotosistema I y reducido por el

fotosistema II. El monurón, según interpretaban los autores, actúa como si suprimiera un cierto número de moléculas de E y esto podría ocurrir por dos caminos: a) formación de un compuesto inactivo entre el E y el monurón; b) desplazando el equilibrio red-ox de E de manera que impida la oxidación de este compuesto por el fotosistema I. En resumen Gingras y Lemasson, (74) y (75), identifican el compuesto E con el Q y el lugar donde inhibe el monurón también coinciden con el propuesto por Duysen.

Sweetser (76), Homann y Gaffron (77), han observado que el FMN, contrarresta los efectos inhibidores del monurón y que este, forma un complejo con FMN en presencia de la luz. Este dato, sugiere la posible implicación en la liberación del oxígeno de una substancia que contenga flavina la cual será afectada por los herbicidas derivados de la urea. En resumen el monurón inhibe la fotólisis del agua, y como consecuencia no se puede efectuar la reducción del NADP que reduciría al  $\text{CO}_2$  en el proceso fotosintético normal.

#### 1.2.5.4. Efecto sobre el desarrollo y transpiración.

El monurón no parece actuar sobre el poder germinativo de las semillas. McCall (7) afirma que este herbicida no tiene ningún efecto sobre esta función aún a dosis elevadas de aplicación. Solyanova (78) con otros métodos

de estudios, llegó también a las mismas conclusiones para dosis de 1,5 Kg/Ha. El monurón afecta a las plantas inmediatamente después de la nascencia, dependiendo la rapidez de su efecto, de la cantidad de sustancia de reserva en la semilla tratada y de la capacidad de la especie para extender sus raíces en profundidad por debajo de la capa de suelo tratado.

Se ha comprobado que las fenilureas substituidas, ejercen una gran influencia sobre los ápices vegetativos. Cristoph y Fisk (79), han observado que el monurón produce aberraciones cromosómicas e inhibe la división mitótica, siendo esta inhibición más intensa en el ápice del tallo que en los meristemas radiculares.

Siendo los estomas la vía principal de pérdida de agua por las plantas, es importante estudiar la influencia del monurón sobre la apertura estomática controlada por la turgencia de las células oclusivas. Minshall (80), midió el agua perdida por las hojas de judías, cuyos peciolo habían estado en una solución acuosa de monurón y observó que para 15 mg de monurón por gramo de hoja fresca, se reducía la transpiración en un 50% con respecto a las hojas controles. Concentraciones internas de 1-2 mg de monurón por gramo de hoja fresca, aumentaban las pérdidas de agua. Minshall no pudo explicar bien este fenómeno, atribuyendolo a una influencia directa sobre la apertura de los estomas

más que el efecto del monurón sobre la fotólisis del agua.

A pesar de lo anterior, no parece probable que estos herbicidas afecten al crecimiento de las plantas por su posible influencia en el mecanismo de la transpiración. (81) y (82). Como consecuencia de la actuación del monurón sobre las plantas, se observan anomalías en las hojas debido a influencias sobre el tejido en empalizada. Como primer sintoma aparece una clorosis progresiva, seguida de un retraso en el desarrollo, que conduce a la muerte de la planta en el caso de que la dosis empleada sea letal.

#### 1.2.5.5. Metabolización del monurón por las plantas.

El monurón absorbido por las plantas sufre una descomposición al actuar sobre él los sistemas enzimáticos de aquella. Normalmente las plantas no tienen desarrolladas las enzimas necesarias para actuar inmediatamente sobre sustancias extrañas y se requiere un período de inducción, hasta que puedan empezar a metabolizarlas. De la capacidad de inducción enzimática para la detoxificación, va a depender en gran parte la selectividad del herbicida. Esta inducción depende de las características y propiedades físicas y químicas del compuesto, así como, de la especie de planta tratada.

Fang (83) y Freed (84) han observado la formación de un complejo monurón-proteína de bajo peso molecular.

Sweetser (76), ha aislado un complejo monurón-FMN en cultivos de *Chlorella* tratadas con monurón. Estos complejos inactivan al monurón de su acción herbicida, sin embargo, este tipo de detoxificación en plantas no ha sido perfectamente comprobado.

Se han observado en plantas desarrolladas en solución nutritiva con monurón incorporado, los mismos metabolitos que se habían aislado en los cultivos de microorganismos, es decir compuestos demetilados, anilina, etc. (26). El camino de la demetilación y posterior hidrólisis, es un mecanismo general de degradación para las fenilureas sustituidas según se ha podido comprobar en diferentes órganos de diversas especies (85) y (86). Es de observar, que las anilinas procedentes de la hidrólisis de los compuestos demetilados son escasamente detectadas en las plantas, siendo debido a la rapidez de transformación de aquellas una vez formadas.

Los diferentes niveles de degradación del monurón dentro de las distintas plantas hace que la susceptibilidad de éstas por el monurón sea variable; así, en el algodón, planta bastante resistente al monurón, la degradación de éste es muy rápida, mientras que en judía y trigo plantas muy sensibles, la degradación transcurre lentamente (87). En la tabla III se indican los metabolitos procedentes de la degradación del monurón detectados en diversas plantas por algunos autores, según el modo de aplicación y el

tiempo de exposición. (88) y (89).

TABLA III. Proporción relativa de metabolitos detectados en diferentes especies vegetales, procedentes de la degradación del monurón-<sup>14</sup>C.

Especie de planta tratada	Modo de aplicación	Tiempo de tratamiento	Metabolitos detectados
Algodón	Solución nutritiva	5 días	U, M, D A
Soja			U M, D, (A)
Algodón	Discos de hojas incubados con solución de monurón.	8 horas	U M, D A
Platano			U, M, D A
Soja			U, M D A
Trigo			U M D, (A)

U = monurón

M = compuesto monometilado

D = compuesto demetilado

A = p-cloroanilina

( ) = compuesto no detectado.

## 2. TECNICAS GENERALES UTILIZADAS

## 2. TECNICAS GENERALES UTILIZADAS

### 2.1. Contaje de carbono-14 en centelleo líquido

#### 2.1.1. Equipos utilizados.

La medida de la actividad del carbono-14 (emisor  $\beta$  débil de 0,156 Mev de energía máxima), se efectuó utilizando la técnica de centelleo líquido (90) y (91). Se ha empleado un espectrómetro automático Intertechnique modelo "SL 30" para medida de los extractos radiactivos y un espectrómetro manual Packard modelo "314 E", para las medidas de material vegetal en suspensión.

La eficacia o rendimiento de contaje se determinó por medio de la estandarización externa para las medidas de extractos y mediante estandarización interna para las medidas de material en suspensión.

#### 2.1.2. Soluciones centelleadoras empleadas.

Se utilizaron dos tipos de soluciones centelleadoras, (solución A y solución B). La solución A se empleó para medir muestras no acuosas y la solución B cuando el extracto contenía agua.

La composición de cada una de estas soluciones se detalla en la tabla nº IV.

TABLA IV. Composición de las soluciones centelleadoras.

Componentes	Solución A	Solución B
Centelleador primario (2,5-difeniloxazol) (PPO)	5 gr.	2,4 gr.
Centelleador secundario (2-p-fenilembis(5-feniloxazol) (POPOP)	2,4 gr.	0,009 gr.
Disolvente (Tolueno)	1000 ml.	600 ml.
Etanol	-	378 ml.

La solución B permite una dilución de 200  $\lambda$  de solución acuosa en un volumen de 15 ml. de solución centelleadora. También suele emplearse para medidas de muestras acuosas, mezclas de tolueno y otros disolventes que aumenten la polaridad de aquella. Los disolventes más usuales aparte del etanol son: metanol, 1-4 dioxano y 2, etoxietanol; cada uno permite hacer mezclas de miscibilidad diferente con el agua (92). Se efectuaron pruebas con estas mezclas y se tomó la solución B como la más conveniente.

### 2.1.3. Medida de la actividad de los extractos radiactivos.

#### 2.1.3.1. Preparación de la muestra.

Los extractos del monurón-2-C-14 de los suelos se efectuaron mediante elución en columna utilizando etanol

como eluyente y tomando 2 ml. del total eluido que se transfieren a un vial que contenía 15 ml. de la solución centelleadora A. La preparación del material vegetal se efectuó de la manera siguiente: cada órgano escindido después de pesado se maceró en un homogenizador cónico de vidrio Pyrex (Pobel Ref. 570/1), con 3 ml. de etanol. La suspensión alcoholica obtenida, se filtro a través de papel Watman nº 1 y del filtrado se tomaron 10 lambdas que se depositaron en un vial que contenía 15 ml. de la solución centelleadora A.

2.1.3.2. Curva de calibrado del grado de extinción obtenida por medio de estandarización externa.

Para determinar el grado de extinción ("quenching"), producido por el etanol y los pigmentos vegetales, se utilizó la técnica de estandarización externa por medio de una fuente de  $^{137}\text{Cs}$  contenida en el espectrómetro y que mediante un mecanismo automático, puede colocarse en una posición tal que sus radiaciones interaccionen con la solución centelleadora, liberandose electrones Compton análogos a partículas  $\beta$  pero de diferente espectro energético. Conocida previamente la medida de estos electrones en unas condiciones estandard del centelleador sin sustancias que produzcan "quenching", se puede determinar el grado de extinción teniendo en cuenta la atenuación de la energía de estos electrones liberados por efecto Compton,

ya que estos se consideran constantes para un mismo volumen de disolvente y la misma fuente colocada en idénticas condiciones. Previamente se debe efectuar una curva de calibrado con una serie de patrones con "quenching" creciente y la misma actividad de  $^{14}\text{C}$ .

El espectro de emisión de las partículas  $\beta$  del carbono-14 y el de los electrones Compton están lo suficientemente separados como para poder discriminarlos perfectamente con un mínimo de solapamiento (Figura 4).

La técnica operativa es la siguiente: una vez preparado el vial que contiene la muestra, se ponen las condiciones prefijadas por la casa que ha calibrado el aparato para medidas de  $^{14}\text{C}$  y se cuenta la mezcla durante un determinado tiempo con la "ventana" A-B, (vía discriminadora del carbono-14). A continuación y sin retirar el vial, se acerca la fuente de  $^{137}\text{Cs}$  que se ha mantenido aislada del sistema y seguidamente se mide en las dos vías señaladas como C-D y D-E que corresponden a dos porciones características del espectro de emisión de los electrones Compton. Seguidamente se retira la fuente de  $^{137}\text{Cs}$  y sin sacar el vial se cuenta la actividad del  $^{14}\text{C}$  en las mismas vías C-D y D-E. La actividad detectada correspondería a la parte de radiación  $\beta$  procedente del  $^{14}\text{C}$  que se habría solapado en la anterior medida con la de los electrones Compton. Por tanto, estas medidas habría que restarlas de las anteriores para determinar las cuentas reales producidas

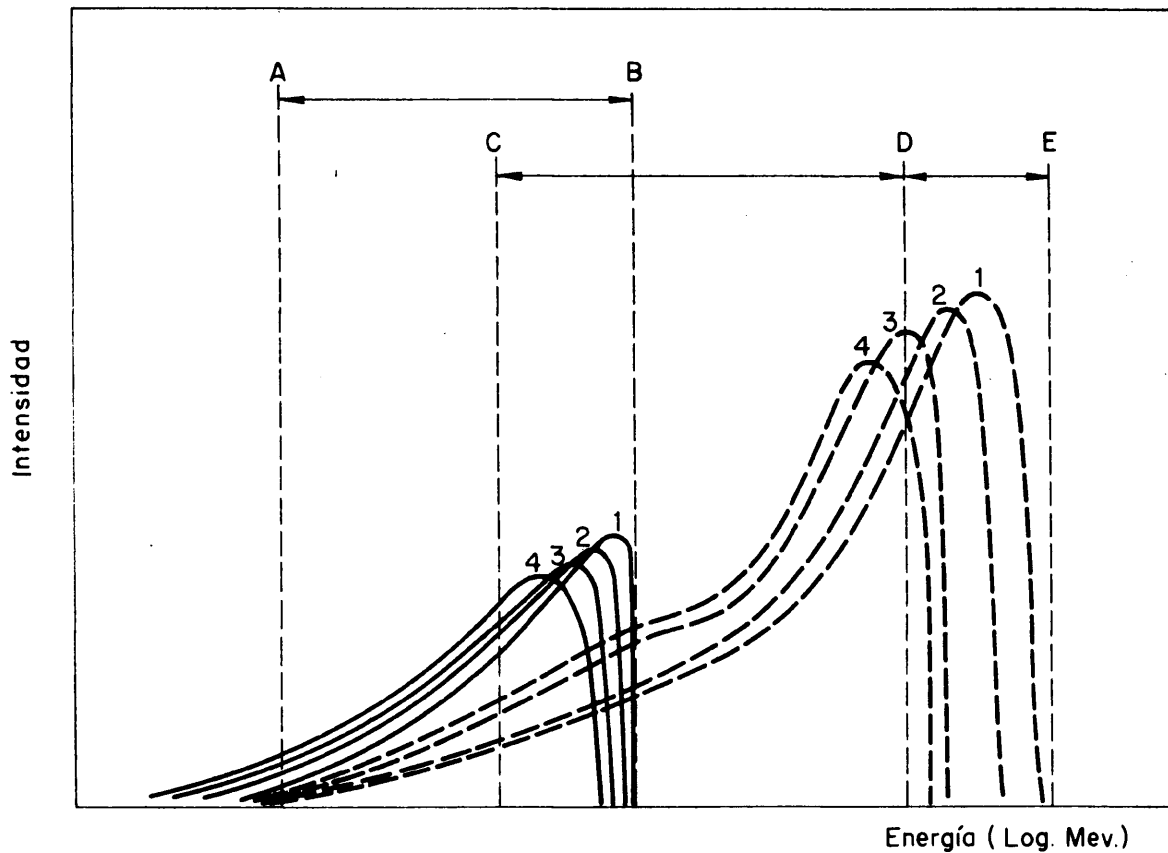


FIG. 4.—ESPECTROS DE EMISION DEL  $^{14}\text{C}$  (LINEA CONTINUA) Y DE LOS ELECTRONES COMPTON LIBERADOS POR LA FUENTE DE  $^{137}\text{Cs}$  (LINEA DE TRAZOS), PARA MUESTRAS CON DIFERENTE EXTINCION. (EL QUENCHING CRECE DE LA MUESTRA 1 A LA 4). A-B VIA DE MEDIDA DEL  $^{14}\text{C}$ . C-D Y D-E VIAS PARA LA CARACTERIZACION DE LOS ELECTRONES COMPTON.

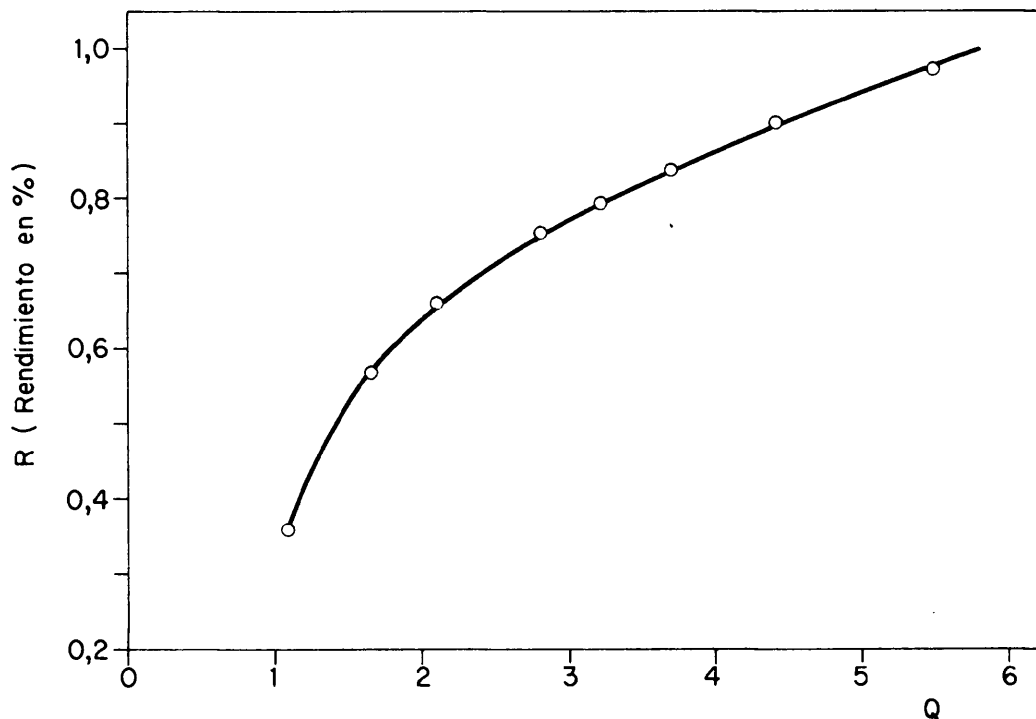


FIG. 5.—CURVA DE CALIBRADO DEL ESPECTROMETRO INTERTECHNIQUE SL 30 QUE RELACIONA EL RENDIMIENTO DE CONTAJE CON EL COCIENTE Q PARA ESTANDARIZACION EXTERNA CON UNA FUENTE DE  $^{137}\text{Cs}$ . SIENDO Q LA RELACION DE C.P.M. CORREGIDAS EN C-D Y D-E.

por la fuente de  $^{137}\text{Cs}$  al interaccionar con la solución centelleadora. Las vías C-D y D-E están determinadas para que el cociente de las cuentas obtenidas en el primero divididas por las del segundo, (descontando en ambos las cuentas debidas al  $^{14}\text{C}$  en estas condiciones), nos indique el grado de atenuación relacionado con el "quenching" de la muestra.

La curva de calibrado para determinar el rendimiento del contaje se realizó mediante una serie de patrones de la casa Amersham conteniendo todos una actividad de 194.000 d.p.m. y con "quenching" creciente. El rendimiento de contaje disminuye en la vía del carbono A-B lo mismo que el cociente (Q) entre la vía C-D y D-E para los diferentes patrones estándares a medida que aumenta la extinción.

Los resultados experimentales obtenidos al expresar el rendimiento de contaje R (en %) en función del valor Q se detallan en la primera y segunda columna de la tabla nº V y se representan en la figura nº 5.

TABLA V. Valores experimentales y teóricos del rendimiento de contaje R (expresado en %), en función del "quenching" (expresado por medio del cociente Q).

$Q_i$	$R_i$ exp.	$R_i$ teórica
1,07	0,362	0,362
1,64	0,566	0,571
2,12	0,657	0,652
2,81	0,750	0,742
3,22	0,794	0,787
3,70	0,831	0,835
4,42	0,900	0,901
5,50	0,976	0,987

Observando los pares de valores muestrales después de hacer una traslación de ejes por el cambio de variables:

$$Q = q_i + 1,07$$

$$R = r_i + 0,362$$

puede suponerse que cumplen una ecuación exponencial del tipo:

$$r_i = K q^Y \quad (1)$$

Tomando logaritmos en la ecuación (1) resultará:

$$\lg r_i = \lg K + y \lg q_i$$

Ajustando por el método de los mínimos cuadrados quedará:

$$\lg r_i = 0,5344 \lg q_i - 0,5491 \quad (2)$$

Deshaciendo el cambio de variables anteriormente efectuado tendremos:

$$\lg(R - 0,362) = 0,5344 + \lg(Q - 1,07) - 0,5491$$

Haciendo operaciones resultará la forma exponencial siguiente:

$$R = 0,2824 (Q - 1,07)^{0,5344} + 0,362$$

La bondad del ajuste, mediante la  $\chi^2$  de Pearson es superior al 99% para un nivel de significación del 5%.

En la tabla V se expresa la relación entre los valores de R en función de Q obtenidos experimentalmente, así como, los valores teóricos de R para el ajuste efectuado.

#### 2.1.4. Medida de la actividad de las muestras en suspensión.

Cuando la muestra a contar era de material sólido, las medidas se efectuaron por medio de la técnica de suspensión, para lo cual se utilizó un espectrómetro manual Packard

modelo 314 E.

2.1.4.1. Determinación de las condiciones óptimas de con-  
taje y de la eficacia en función de la actividad.

Para determinar las condiciones óptimas de trabajo, se puso la ganancia máxima, se escogió una ventana fija entre 10-50, (posiciones de los diales de discriminación de los analizadores superior e inferior), para la cual se obtuvo la cifra de mérito máxima entendiéndose por tal la expresión:

$$\frac{(\text{c.p.m. corregidas por fondo})^2}{\text{fondo}}$$

En estas condiciones se realizaron las medidas de un patrón de  $^{14}\text{C}$  disuelto en 15 ml. de solución centelleadora A y 2 ml de etanol, variando el voltaje de excitación del fototubo. En los resultados obtenidos, representados en la figura 6, se observa que el máximo de eficacia se consigue para un voltaje de 950 voltios.

La presencia del etanol origina una atenuación de la energía en un 16%. Si el vial no contuviera alcohol, el voltaje óptimo de excitación del fototubo sería de 880,5 voltios como se observa en la figura 6 anteriormente mencionada.

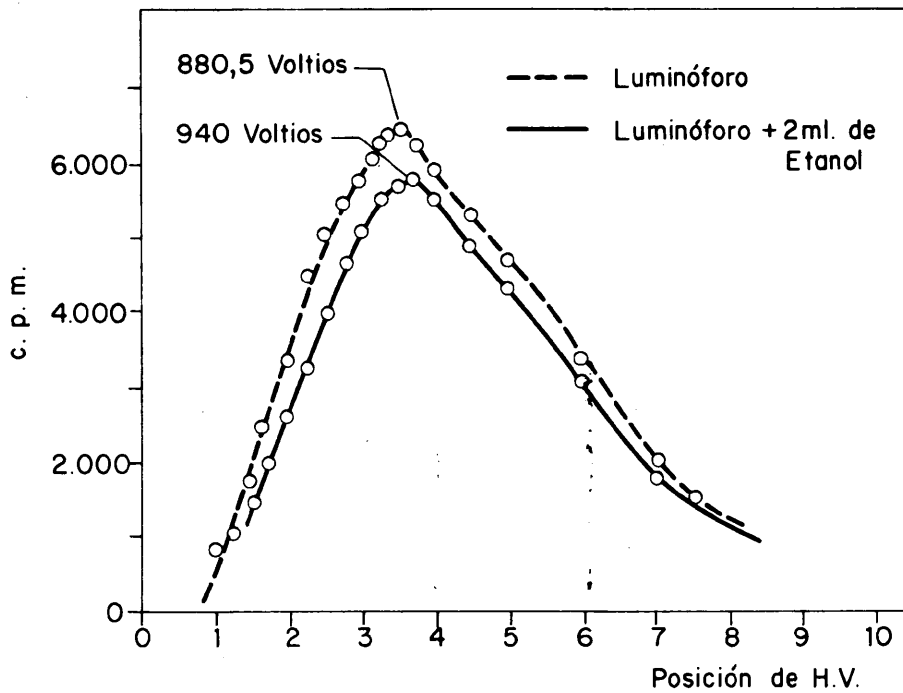


FIG.6. - CURVA DE CALIBRADO DEL ESPECTROMETRO PACKARD 314 E PARA DETERMINAR EL VOLTAJE DE TRABAJO CON UNA ANCHURA DE VENTANA DE (10-50) Y UNA GANANCIA MAXIMA.

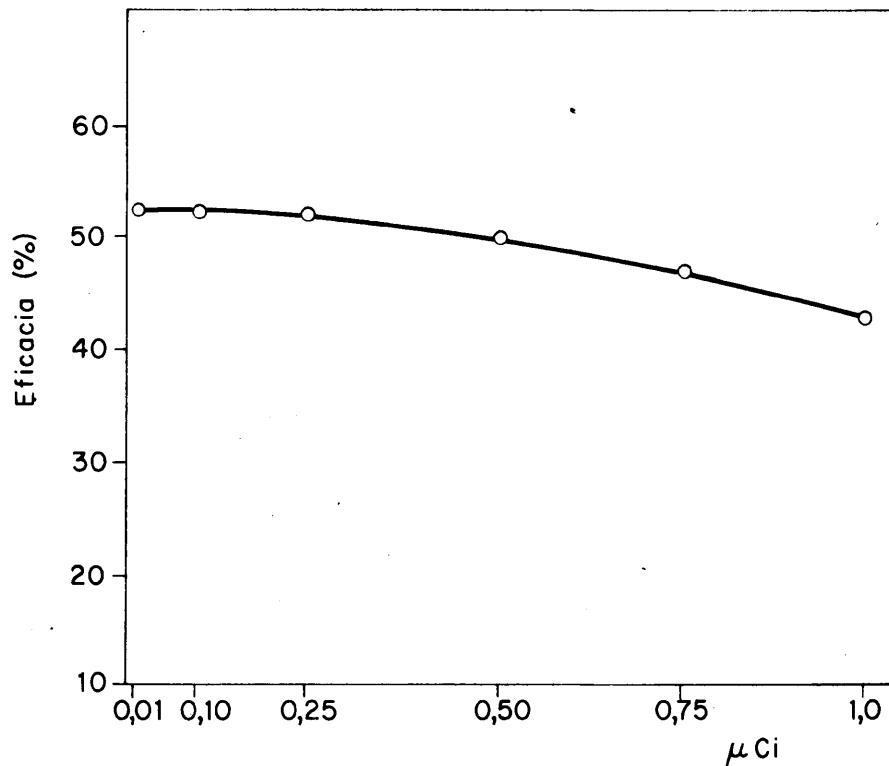


FIG.7. - RELACION C. P. M. / ACTIVIDAD PARA EL ESPECTROMETRO PACKARD 314 E EN LAS CONDICIONES DE OPERACION Y UTILIZANDO LA SOLUCION A COMO CENTELLEADORA.

Para calcular la eficacia de contaje de diferentes actividades se realizó una curva de calibrado que viene representada en la figura 7. En ella, se observa una disminución de la eficiencia a medida que aumenta la actividad, siendo esto debido, a la saturación del fototubo y al poder de respuesta de la escala que es incapaz de reaccionar a la misma velocidad que le llegan los impulsos.

#### 2.1.4.2. Preparación de la muestra.

Para determinar la actividad del monurón-2-C-14 contenida en el material vegetal seco, se procedió de la siguiente manera: se pesó una cantidad de muestra inferior a 30 mgr y se introdujo en el vial de contaje donde fué finamente pulverizada. A continuación se le añadieron 2 ml. de etanol con objeto de lixiviar los compuestos solubles y se mantuvo en agitación durante un período de dos horas. Seguidamente se añade 10 ml. de "Cab-O-Sil", que es gel de sílice tixotrópica finamente pulverizada y de elevada superficie específica (93). El objeto de la adición de este producto, es mantener la muestra pulverizada en suspensión, con el fin de que la geometría de contaje sea  $4\pi$  y se aumente la eficacia de éste. A continuación se añade 15 ml. de solución centelleadora A y se agita el vial con objeto de que quede homogéneamente distribuida la muestra. En estas condiciones las partículas sólidas quedan en suspensión durante largo tiempo.

Para efectuar estas medidas se prefirió el espectrómetro manual al automático con objeto de poder agitar el vial inmediatamente antes de efectuar el contaje.

Las muestras así preparadas tienen un alto grado de extinción. Para determinar la eficacia del contaje se utilizó la técnica del patrón interno, mediante adición de 0,05  $\mu$ Ci de Hexadecano-<sup>14</sup>C a cada vial después del contaje inicial y observando el incremento de cuentas que corresponde a esta actividad. (94)

Las medidas de los puntos activos de los cromatogramas efectuadas en capa fina después de separarlos mediante la técnica del raspado se realizó también por este método. Las pérdidas por autoabsorción debido a la gel de sílice con respecto a las medidas efectuadas sin esta son de un 10% aproximadamente.

## 2.2. AUTORRADIOGRAFIA.

La propiedad de las radiaciones ionizantes de reducir los haluros de platas contenidos en la emulsión fotográfica, se utilizó para la detección de la localización de los átomos radiactivos en las plantas tratadas con CMU-2- $^{14}\text{C}$ , así como, para el revelado de los radiocromatogramas correspondientes a extractos de suelos y plantas.

Se emplearon dos técnicas principalmente: la de macroautorradiografía para plantas completas y cromatogramas, utilizando placas radiográficas y la de microautorradiografía para secciones histológicas de tejidos vegetales, en la que se empleó emulsión sensible líquida.

### 2.2.1. Técnica macroautorradiográfica para plantas.

Para estudiar la cinética de la absorción radicular y foliar del CMU-2- $^{14}\text{C}$ , se efectuaron autorradiografías de las plantas tratadas, durante diferentes períodos de tiempo. Las plantas se preparan por el procedimiento de congelación-desección (95) y (96), que se detalla a continuación.

Después del tratamiento con CMU-2- $^{14}\text{C}$ , las plantas se extienden sobre papel de filtro que se cambia 2 ó 3 veces, con objeto de evitar contaminaciones en el manejo posterior de aquellas y no debiendo durar esta operación más de 10 minutos. A continuación se colocan sobre papel de aluminio y se espolvorea sobre ellas nieve carbónica. También se pone

nieve carbónica en dos recipientes estancos, con una sola salida conjunta para el  $\text{CO}_2$ , destinados a mantener la baja temperatura en el material vegetal durante la deshidratación. Seguidamente se colocan los recipientes anteriores y las plantas congeladas en el tanque de acero cilíndrico que se representa en la figura 8, especialmente diseñado al efecto. Este tanque tiene dos orificios en la parte superior: uno que se conecta con el de salida del  $\text{CO}_2$  que se produce en los recipientes estancos y comunica directamente con la atmósfera y el otro que está unido con la bomba de vacío a través de dos "traps" que retienen el vapor de agua extraído. Los dos "traps" están colocados en paralelo con objeto de que funcionen alternativamente y mientras uno actúa, se pueda proceder a la limpieza y eliminación del agua recogida en el otro, sin perder el vacío en la instalación. El vacío debe ser inferior a 2 mm. y las plantas deben mantenerse en estas condiciones al menos 24 horas. Al término de este período, las plantas completamente secas, se colocan sobre películas Kodak Royal Blue 24 x 30 y se dejan un tiempo de exposición variable según la actividad contenida, (15 - 25 días), antes de proceder a su revelado que se efectúa mediante las técnicas usuales.

#### 2.2.2. Microautorradiografía en cortes histológicos.

Para determinar la localización del producto marcado a nivel histológico, se utilizó el método microautorradiográfico denominado "dipping".

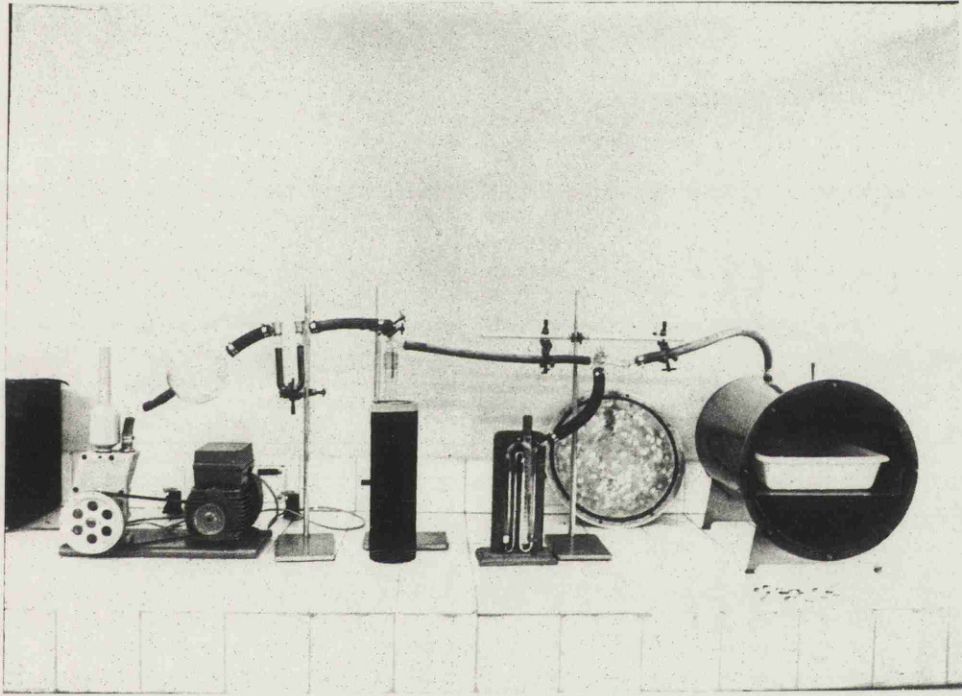


Fig. 8.- Sistema para obtener plantas deshidratadas por el procedimiento congelación - desecación.

Al aplicar una capa de emulsión sensible en íntimo contacto con los cortes histológicos que contienen átomos radiactivos, se produce una reducción de los haluros de plata de la emulsión, en los puntos de ésta superpuestos con los átomos radiactivos del corte. Al revelar el autorradiograma y observar al microscopio las preparaciones, se visualizará la localización de la molécula marcada en el tejido vegetal, ya que los puntos ennegrecidos de la emulsión se superponen con los puntos radiactivos del tejido que los ha producido.

Debido a la débil energía y corto alcance de las radiaciones del  $^{14}\text{C}$ , los cortes histológicos, han de ser lo más finos posible y tanto la emulsión como su forma de aplicación han de reunir unas características determinadas. Se ha seguido los métodos descritos por Boyd (97) y Rogers (98) para microautorradiografía.

#### 2.2.2.1. Preparación del material vegetal.

Debido a que la fijación y deshidratación mediante reactivos líquidos ofrece pocas garantías acerca de la inmovilidad del producto en el lugar de localización original, se ha preparado el tejido siguiendo la técnica de fijación-deshidratación por congelación, ya que se elude el problema del movimiento del producto por arrastre en los diferentes líquidos y además se evita un número de pasos considerables con respecto al procedimiento clásico. Para la liofilización del tejido y posterior inclusión en parafina,

se diseñó el aparato representado en la figura 9, siguiendo el método de Jensen y Ashton (99), aunque modificado en algunos aspectos.

El tejido fresco se introduce en la cazolota A donde va a permanecer durante toda la operación, uniendo ésta a todo el montaje mediante un tubo alargadera B. La fijación del tejido se realiza a continuación introduciendo la cazolota en un Dewar con nitrógeno líquido a  $-195^{\circ}\text{C}$ , donde permanece durante 5 minutos. El enfriamiento rápido provoca la formación de microcristales de hielo que no alteran la estructura del tejido siempre que la temperatura sea inferior a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después se cambia el Dewar con nitrógeno líquido por otro que contiene una mezcla frigorífica acetona-nieve carbónica de temperatura  $-60^{\circ}\text{C}$  y se hace vacío hasta conseguir menos de 2 mm de Hg, manteniendo estas condiciones durante 24 horas para que el tejido se deshidrate completamente. Sin romper el vacío, se retira el vaso Dewar, se deja que el tejido adquiera la temperatura ambiente y se calienta la parafina contenida en el matraz C, a la que previamente se le ha extraído el aire, hasta su fusión. Una vez conseguido esto, se gira el matraz C  $180^{\circ}$  y la parafina cae a la cazolota, donde se efectúa la inhibición del tejido. Se continúa haciendo vacío durante una media hora, manteniendo la parafina en el punto de fusión y acto seguido se rompe el vacío efectuándose la inclusión definitiva del tejido en pa-

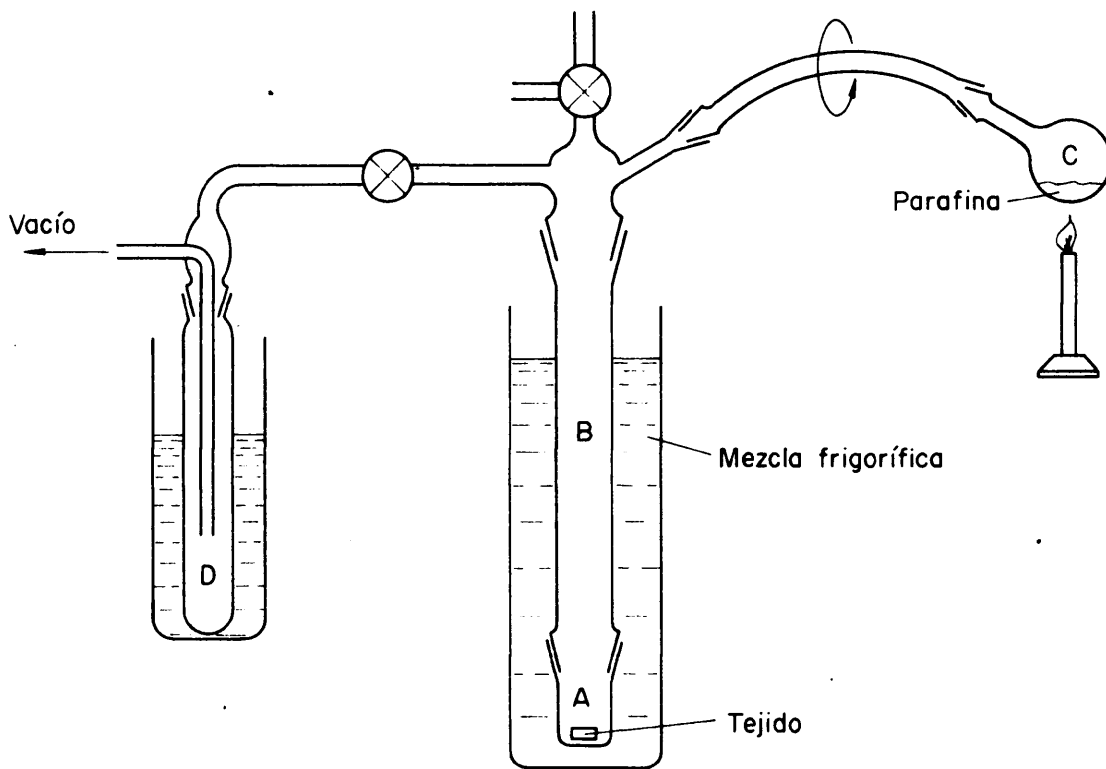


FIG. 9.- ESQUEMA DEL MONTAJE PARA UTILIZAR LA TECNICA DE CONGELACION - DESECACION - INCLUSION.

rafina de 56-58°C de punto de fusión, pudiéndose realizar a continuación el corte con microtomo.

### 2.2.3. Técnica del "dipping".

La técnica de "dipping" puesta a punto por Joftes y Warren (100), se basa, como se ha mencionado, en la aplicación directa de una emulsión sensible líquida sobre las preparaciones histológicas después de desparafinadas e hidratadas, mediante la inmersión del porta con la preparación en la emulsión sensible licuada.

Se ha elegido este método, desechando el método clásico de "Stripping-film", por las ventajas de operación que reúne. Mediante el "dipping" se favorece el contacto entre la emulsión y la preparación, aunque tiene el inconveniente de que no se puede controlar exactamente el espesor de la capa de la emulsión, ya que la película formada se adapta a la superficie rugosa de la preparación histológica y se pierde la homogeneidad de la capa. En nuestras experiencias utilizamos la emulsión Kodak NTB-2 especialmente recomendada para <sup>14</sup>C.

El procedimiento empleado es el siguiente: se pesa una cantidad determinada de emulsión, (que a temperatura ambiente es un gel altamente viscoso), en un recipiente completamente opaco y se diluye (1:1) con una solución acuosa de glicerina al 2%. Se introduce la emulsión en la cubeta de impregnación y se coloca en un baño termostatiza-

do a 45°C donde permanece durante la operación. A esta temperatura la emulsión se licua. Los portas se introducen en la cubeta por inmersión rápida y quedan impregnados de la emulsión. Después se los deja escurrir en posición vertical durante 5 minutos y acto seguido se colocan en posición horizontal, dejándoles secar lentamente. Un secado demasiado rápido, produce discontinuidades en la película y el secado insuficiente, provoca anomalías por desplazamiento de la emulsión.

El espesor de la película obtenido en estas condiciones es de unas 5 micras.

Los portas una vez secos se pasan a cajas protegidas de la luz donde se almacenan a una temperatura de 4°C, durante un período de tiempo variable según la actividad, (en nuestras experiencias el tiempo de exposición óptimo fué de 3 semanas). Es conveniente depositar en las cajas, bolsas con gel de sílice anhidra para preservar las preparaciones de la humedad.

Como revelador de las microautorradiografías se utilizó el Kodak D-19 cuya composición es la siguiente:

Elon (sulfato de p-metilaminofenol) . . .	2,2 gr.
Sulfito sódico anhidro . . . . .	72,0 gr.
Hidroquinona . . . . .	8,8 gr.
Carbonato sódico (anhidro) . . . . .	4,8 gr.
Bromuro potásico . . . . .	4,0 gr.
Agua hasta completar . . . . .	1000 gr.

El revelado se efectúa durante 5 minutos a una temperatura de unos 20°C, después de los cuales se detiene, introduciendo los portas en una solución de ácido acético al 2% durante 20 ó 30 segundos y luego se tratan las preparaciones con un fijador ácido normal que disuelve y arrastra los haluros de plata no reducidos. En esta solución se mantienen los portas durante 45 minutos y luego se lavan hasta eliminar todo residuo de fijador.

Si se quiere observar mejor las estructuras se pueden teñir las preparaciones, no siendo un obstáculo la gelatina, ya que los colorantes pasan a través de ella con facilidad.

Se empleó el procedimiento de tinción sucesiva safranina-fast green (101) y (102).

La preparación una vez teñida y deshidratada se monta en Bálsamo de Canadá y se procede a su observación. Si se dispone de un microscopio con contraste de fase se puede observar la preparación directamente sin teñir.

### 2.3. RADIOCROMATOGRAFIA.

Se ha utilizado la cromatografía sobre capa fina, (gel de sílice), en los estudios de degradación del CMU-2-<sup>14</sup>C en suelos y plantas, así como para controlar la pureza de los compuestos sintetizados. Se han usado placas de 20 x 20 cm. de la casa Camag DF-A con indicador fluorescente a 254 nm. Las placas se activaron en estufa a 110°C durante 20 minutos antes

de su utilización. Para la separación de los diferentes productos de degradación se utilizaron varias mezclas eluyentes cuya composición es la siguiente:

Mezcla I: Cloroformo, Nitrometano 1:1 (tiempo de desarrollo 1 hora).

Mezcla II: Hexano, Acetona 7:3 (tiempo de desarrollo 4 horas)

Mezcla III: Butanol, Acético, agua 4:1:6 (tiempo de desarrollo 8 horas).

Las mezclas I y II se han utilizado para el monurón- $2-^{14}\text{C}$  siendo los Rf 0,54 y 0,27 respectivamente. La mezcla III se ha usado para control de pureza del p-clorobenzoico- $1-^{14}\text{C}$ , producto intermedio en la síntesis del monurón- $2-^{14}\text{C}$ , siendo el Rf de aquel compuesto para esta mezcla de 0,68. (103) y (104).

La visualización de los compuestos con anillo bencénico en el cromatograma, se efectuó bajo luz ultravioleta de 254 nm. y se completó mediante autorradiografía para detectar la localización de los compuestos marcados con  $^{14}\text{C}$ .

La determinación cuantitativa de los compuestos marcados aislados por cromatografía, se efectuó en un radioregistrador para cromatogramas y por medio de contaje en contelleo líquido de las manchas raspadas de las placas de gel de sílice.

### 2.3.1. Detección autorradiográfica.

Se utilizaron películas de rayos X Kodak RB-54 que se sobrepusieron sobre el cromatograma después del desarrollo y evaporación de la mezcla eluyente.

### 2.3.2. Radiorregistrador para cromatogramas.

El modelo de registrador utilizado ha sido el PW 4004 de la casa Philips. Consta de un detector, un sistema mecánico, un sistema electrónico y un sistema para registro.

El detector, es un Geiger-Müller de gas en flujo continuo con una abertura del diafragma de 35 mm. de longitud y posee una placa deslizable con tres colimadores de anchura de rendija de 1, 2 y 4 mm, fácilmente intercambiables. El gas, (se utilizó propano), fluye con ritmo constante a una velocidad de 0,5 litros/hora.

El uso de un colimador u otro depende de la separación de las manchas y del poder discriminador del preamplificador, no pudiéndose utilizar con ventana dada la baja energía de las radiaciones del  $^{14}\text{C}$ .

Debido a la posición del detector con respecto a la placa, la "geometría" de contaje es 2 $\pi$ . Los impulsos procedentes del detector, son inicialmente amplificados por el preamplificador que lleva el detector.

El conjunto electrónico consta de una fuente de

alimentación capaz de suministrar una tensión de hasta 6.000 voltios y un amplificador lineal. El sistema mecánico consta de un carro-soporte con dos posibilidades de movimiento, una longitudinal y otra transversal. Este sistema móvil en el cual se coloca el cromatograma, tiene tres velocidades: 120, 300 y 600 mm/hora y puede medir placas de hasta 20 x 20 cm. La velocidad del carro-soporte debe escogerse teniendo en cuenta la separación de las manchas y el poder de resolución del detector, así como, las posibles pérdidas por coincidencia. La velocidad del registro gráfico está sincronizada con la del carro-soporte.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Voltaje de operación . . . . .	2.500 voltios
Ganancia . . . . .	máxima
Anchura de colimador . . . . .	2 mm.
Velocidad del flujo de gas . . . . .	0,5 litros/hora
Velocidad del carro-soporte. . . . .	300 mm/hora
Velocidad del registro . . . . .	300 mm/hora
Distancia de separación entre la placa y detector . . . . .	1 mm.

La eficacia de medida en estas condiciones para el  $^{14}\text{C}$  es del 30%.

### 2.3.3. Técnica del raspado.

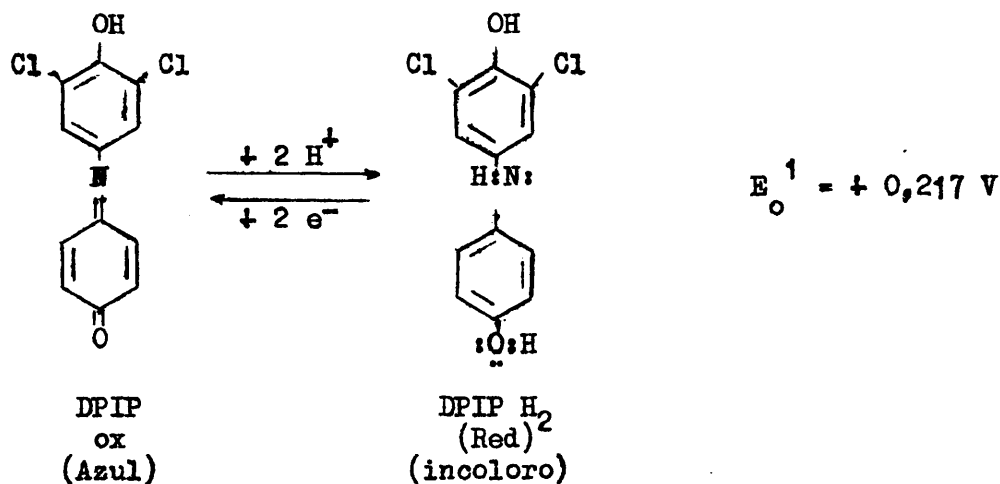
Después de efectuarse la autorradiografía del cromatograma se señalan los puntos activos que han impresionado la película en la placa y se raspan cuidadosamente. La actividad de la gel de sílice raspada que contenía las manchas radiactivas se midió en centelleo líquido mediante la técnica de suspensión descrita anteriormente.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. INFLUENCIA DEL CMU EN LA FOTOSINTESIS EN CLOROPLASTOS AISLADOS.

En este trabajo se utilizó el 2-6 diclorofenol-indofenol (DPIP) como indicador de óxido-reducción. Debido a que el potencial de óxido-reducción de este compuesto es de  $+ 0,217 \text{ V}$  (105), puede ser reducido por el citocromo b ( $E_o^n = + 0,05 \text{ V}$ ) o la plastoquinona ( $E_o^1 = 0 \text{ V}$ ) reducida y por lo tanto se puede valorar la reacción de Hill colorimétricamente, ya que el DPIP oxidado es azul y al reducirse se decolora.



Como se decía en la introducción los compuestos derivados de la fenil-urea, inhiben la reacción de Hill y por tanto inhibirán la reducción del DPIP en presencia de cloroplastos iluminados. Basándose en este principio se emprendió esta serie de experiencias para lograr determinar la relación existente entre la concentración de monurón y el grado de inhibición de la reacción de Hill en cloroplastos aislados de diversas especies vegetales cultivadas. Los resultados obtenidos

"in vitro" se correlacionan con las concentraciones que alcanza el CMU en el jugo celular de los órganos fotosintéticos de las plantas tratadas radicularmente con diversas dosis de este herbicida.

### 3.1.1. Especies vegetales empleadas.

Para estudiar el efecto del monurón sobre la reacción de Hill se aislaron cloroplastos de hojas de cebada, avena, judía, alfalfa y espinaca.

### 3.1.2. Aislamiento de cloroplastos.

Para aislar los cloroplastos se siguió el método de Whatley y Arnon (106). Se parte de 50 gramos de hojas frescas, mantenidas a baja temperatura (0 - 5°C), a las que se ha quitado las nerviaciones principales. Se añaden 100 ml de ClNa 2% (solución que es hipotónica con respecto a la célula que se quiere romper, pero isotónica respecto a los cloroplastos) y 10 ml de la solución tampón Tris 0,2 M. Se tritura en batidora se filtra a través de gasa doble y se recoge el filtrado en baño de hielo. El filtrado se centrifuga a 300 g durante 2 minutos con lo cual, se eliminan los restos de paredes y nucleos. En el sobrenadante quedan cloroplastos, mitocondrias, ribosomas, enzimas solubles, etc. Este sobrenadante se vuelve a centrifugar durante 7 minutos a 1000 g con lo que sedimentan los cloroplastos. Se tira el sobrenadante y se resuspende el sedimento con ClNa 2%, uti-

lizando para ello un algodón hidrófilo en el extremo de una varilla, después se repite la centrifugación durante 10 minutos a 1000 g. Completada ésta, se considera que los cloroplastos están suficientemente lavados. Se tira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en una solución de ClNa 0,2%, que es hipotónica con respecto a los cloroplastos, por lo cual estos se rompan liberando los granos.

El volumen de ClNa 0,2% añadido debe ser calculado teniendo en cuenta el % de clorofila deseado y el volumen necesario para la experiencia. Los cloroplastos aislados se conservan en baño de hielo, preservandolos de la luz forrando el matraz que los contiene con papel de estaño. Antes de empezar a trabajar, se calcula el contenido en clorofila de la suspensión de cloroplastos.

### 3.1.3. Determinación del contenido en clorofila.

Se toma 0,1 ml de la suspensión salina de cloroplastos recién preparada y se diluye con 20 ml de acetona al 80%. La suspensión, después de agitada, se filtra a través de papel Watman nº 1. El filtrado se recoge en una cubeta de espectrofotómetro y se determina su densidad óptica a 622 nanómetros, frente a un blanco de acetona al 80%. El contenido en clorofila, expresado en mg/ml de la suspensión original, viene dado al multiplicar la densidad óptica medida por 5,8 (107). Las medidas de densidad óptica se hicieron con un espectrofotómetro "Spectronic 20" Baush & Lomb.

El contenido en clorofila en nuestras experiencias oscilaba entre 0,0464 y 0,1032 mg/ml.

#### 3.1.4. Método de operación.

Se estudió el efecto de 4 concentraciones diferentes de CMU y un testigo, sobre los cloroplastos aislados de las especies vegetales antes mencionadas. En cada tratamiento se hicieron 6 repeticiones. Con objeto de comprobar la reducción que tiene lugar en el DPIP, independientemente de la fotosíntesis, se repitió el blanco forrando las cubetas con papel de aluminio y también con cloroplastos hervidos.

La experiencia se limitó a 6 repeticiones por tratamiento, debido a la necesidad de efectuar las lecturas de la densidad óptica, en el menor tiempo posible después de cada período de iluminación.

Para evitar errores, las cubetas correspondientes a un mismo tratamiento nunca se leyeron consecutivamente y además durante el tiempo que duraba la lectura, las restantes cubetas se mantenían en la obscuridad.

A cada cubeta según el tratamiento se le añadieron los componentes que se detallan en la tabla nº VI.

TABLA VI. Componentes añadidos a cada cubeta según tratamiento.

Concentrac. de CMU (M)	CMU ( $\mu$ M)	DPIP ( $\mu$ M)	Suspension de cloro- plastos (ml)	Tampón fosfato 0,1M- -pH-6,5 (ml)	Agua (ml)	Volúmen final (ml)
$6,6 \times 10^{-4}$	5,94	0,4	1	2	6	9
$6,6 \times 10^{-6}$	$5,94 \times 10^{-2}$	0,4	1	2	6	9
$6,6 \times 10^{-8}$	$5,94 \times 10^{-4}$	0,4	1	2	6	9
$6,6 \times 10^{-10}$	$5,94 \times 10^{-6}$	0,4	1	2	6	9
0	0	0,4	1	2	6	9

Una vez preparadas las cubetas y medida su densidad óptica inicial, se colocan en un baño termostatzado a 22°C transparente y dotado de agitación. Este baño se ilumina lateralmente por ambos costados, mediante dos paneles de 3 focos, OSRAM Nitraphot 3R, de 500 Watios que permiten en conjunto tener una iluminación de 75000 Luxes. Entre los focos y el baño se instalan dos paneles transparentes refrigerados por agua para evitar la transmisión de calor por parte de los focos al baño.

El conjunto de baño, sistema de iluminación y refrigeración se representa en la fig nº 10.

Después de cada período de iluminación se mide la densidad óptica de las cubetas, a 540 nanometros, con respecto a un patrón de igual contenido en clorofila, pero con todo el DPIP reducido.

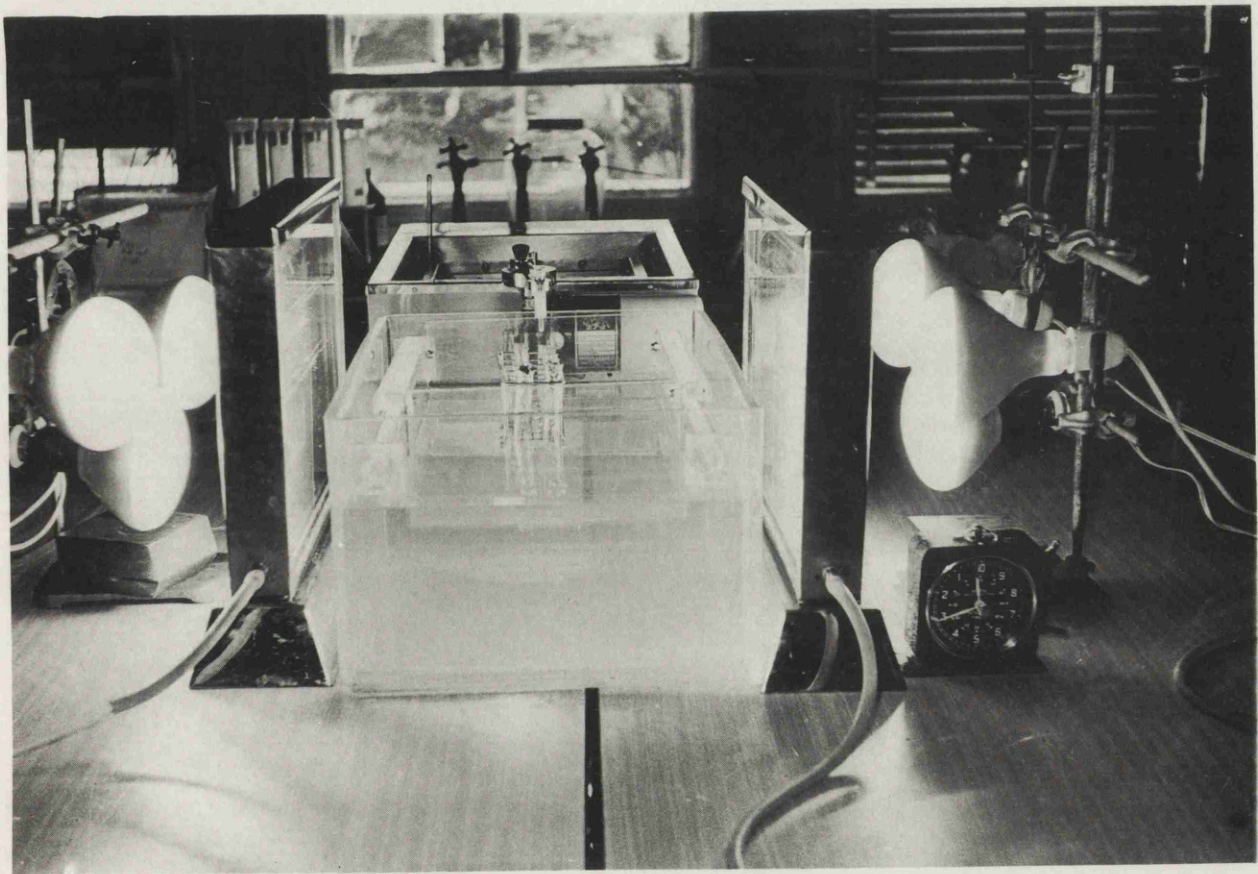


Fig. 10.- Conjunto de baño y sistema de iluminación-refrigeración para el estudio de la fotosíntesis en cloroplastos aislados.

3.1.5. Cálculo de la cantidad de DPIP reducido, a partir de las medidas de densidad óptica (D.O.)

Con objeto de calcular la correspondencia entre la D.O. leída y el DPIP reducido, se hizo una curva de calibrado para cada concentración de clorofila, determinada en cada ensayo, variando la concentración del DPIP oxidado desde el valor inicial de  $0,4 \mu$  moles en 9 ml ( $0,0444 \mu$  moles/ml) hasta cero. Se comprobó que en todas ellas se seguía la Ley de Beer-Lambert:

$$D.O. = K C$$

Siendo: D.O. = densidad óptica leída a 540 nanómetros frente a un patrón con el DPIP totalmente reducido y análogo contenido en clorofila.

K = constante de proporcionalidad.

C = concentración de DPIP oxidado presente en la muestra.

El valor de K obtenido fué para nuestras condiciones  $2,916 \times 10^3$ , viniendo C expresado en moles/ml de DPIP oxidado.

La cantidad de DPIP oxidado en los 9 ml contenidos en las cubetas de la experiencia será según la D.O. leída:

$$\begin{aligned} \text{DPIP ox} &= \frac{D.O.}{K} \times V = \frac{D.O.}{2,916 \times 10^3} \times 9 = \frac{D.O.}{0,324 \times 10^3} \text{ mM} = \\ &= \frac{D.O.}{0,324} \mu\text{M} \end{aligned}$$

La cantidad de DPIP que se ha reducido se obtiene restando los micromoles encontrados de DPIP oxidado de los 0,4 micromoles que había inicialmente. Para hacer comparativos los resultados entre las diferentes especies vegetales estudiadas, los valores de DPIP reducido en cada tratamiento se refieren a un micromol de clorofila, ya que el contenido clorofílico en las distintas experiencias varía con la cantidad de cloroplastos y con la especie estudiada.

### 3.1.6. Resultados.

#### 3.1.6.1. Cinética de la reacción de Hill.

La cinética de la reducción del DPIP por los cloroplastos aislados en presencia de diversas concentraciones de CMU, se siguió colorimetricamente determinando la D.O. de la solución después de iluminar durante 3, 8, 15, 22, 29 y 36 minutos.

Se ensayaron concentraciones de CMU de  $6,6 \times 10^{-4}M$ ,  $6,6 \times 10^{-6}M$ ,  $6,6 \times 10^{-8}M$  y  $6,6 \times 10^{-10}M$  y se compararon con un testigo sin CMU.

Los resultados obtenidos, expresados en  $\mu M$  de DPIP reducido por  $\mu M$  de clorofila para los cloroplastos de las distintas especies estudiadas, se expresan en las tablas número VII, VIII, IX, X y XI y se representan gráficamente en las figuras 11, 12, 13, 14 y 15.

TABLA VII. Cinética de la reducción del DPIIP por cloroplastos aislados de judía en función de la concentración de CMU (los valores expresan los  $\mu\text{M}$  de DPIIP que son reducidos por  $\mu\text{M}$  de clorofila). Contenido en clorofila:  $1,28 \times 10^{-2} \mu\text{M/ml}$ .

Tiempo minutos	0	3	8	15	22	29	36
concentración CMU (Molar)	0	0,80	1,25	1,49	1,87	1,97	2,11
$6,6 \times 10^{-4}$	0	2,01	2,98	3,44	3,96	4,26	4,30
$6,6 \times 10^{-6}$	0	3,18	4,35	4,91	5,20	5,30	5,30
$6,6 \times 10^{-8}$	0	3,18	4,75	5,04	5,60	5,60	5,60
$6,6 \times 10^{-10}$	0	4,34	5,50	6,03	6,25	6,34	6,42

TABLA VIII. Cinética de la reducción del DPIF por cloroplastos aislados de alfalfa en función de la concentración de CMU (los valores expresan los  $\mu\text{M}$  de DPIF que son reducidos por  $\mu\text{M}$  de clorofila). Contenido en clorofila:  $1,28 \times 10^{-2} \mu\text{M/ml}$ .

Tiempo minutos	0	3	8	15	22	29	36
$6,6 \times 10^{-4}$	0	0,175	0,33	0,45	0,51	0,57	0,63
$6,6 \times 10^{-6}$	0	0,81	1,70	2,24	2,76	3,01	2,77
$6,6 \times 10^{-8}$	0	1,82	2,41	2,80	3,37	3,46	3,65
$6,6 \times 10^{-10}$	0	3,01	4,79	5,68	6,58	6,58	6,78
0	0	4,02	4,91	5,62	6,93	7,29	7,35

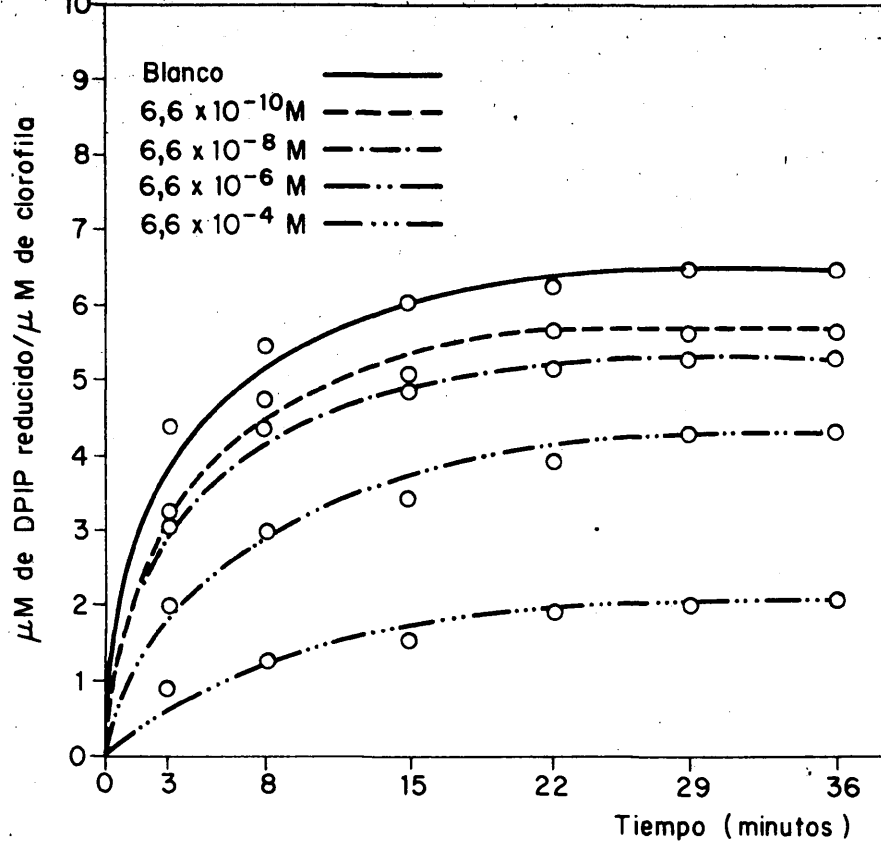


FIG. 11. — CINETICA DE LA REDUCCION DEL DPIP POR CLOROPLASTOS DE JUDIA, PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CMU.

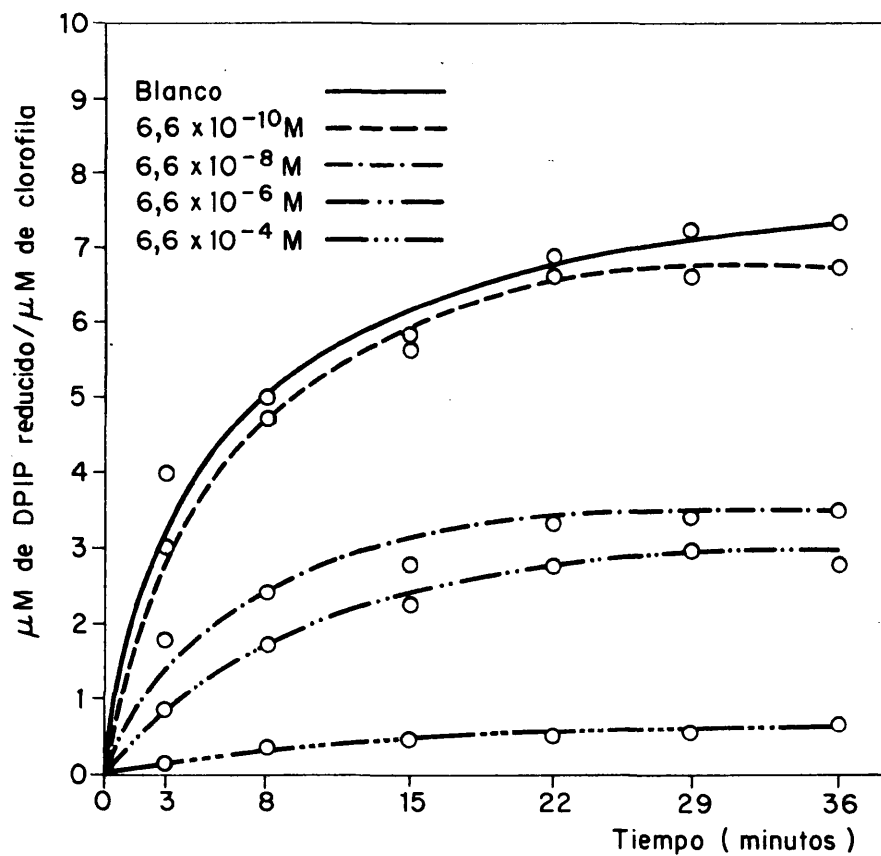


FIG. 12. — CINETICA DE LA REDUCCION DEL DPIP POR CLOROPLASTOS DE ALFALFA, PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CMU.

TABLA IX. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de avena en función de la concentración de CMU (los valores expresan los  $\mu\text{M}$  de DPIP que son reducidos por  $\mu\text{M}$  de clorofila). Contenido en clorofila:  $1,28 \times 10^{-2} \mu\text{M}/\text{ml}$ .

Tiempo minutos	0	3	8	15	22	29	36
$6,6 \times 10^{-4}$	0	0,445	0,61	1,22	1,33	1,41	1,36
$6,6 \times 10^{-6}$	0	0,578	0,71	1,73	2,11	2,34	1,43
$6,6 \times 10^{-8}$	0	0,75	1,53	2,35	2,81	3,13	3,21
$6,6 \times 10^{-10}$	0	1,04	1,62	2,41	3,05	3,36	3,43
0	0	1,09	1,66	2,45	3,13	3,42	3,48

TABLA X. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de espinaca en función de la concentración de CMU (los valores expresan los  $\mu\text{M}$  de DPIP que son reducidos por  $\mu\text{M}$  de clorofila).  
 Contenido en clorofila:  $5,77 \times 10^{-3} \mu\text{M/ml}$ .

Tiempo minutos concentración CMU (Molar)	0	3	8	15	22	29	36
$6,6 \times 10^{-4}$	0	0,57	0,99	1,22	1,50	1,76	1,80
$6,6 \times 10^{-6}$	0	0,81	1,70	2,10	2,60	2,57	2,59
$6,6 \times 10^{-8}$	0	2,47	3,01	3,60	4,26	4,52	4,73
$6,6 \times 10^{-10}$	0	4,51	5,34	5,75	5,76	5,67	6,65
0	0	5,5	6,22	7,20	7,55	7,59	7,71

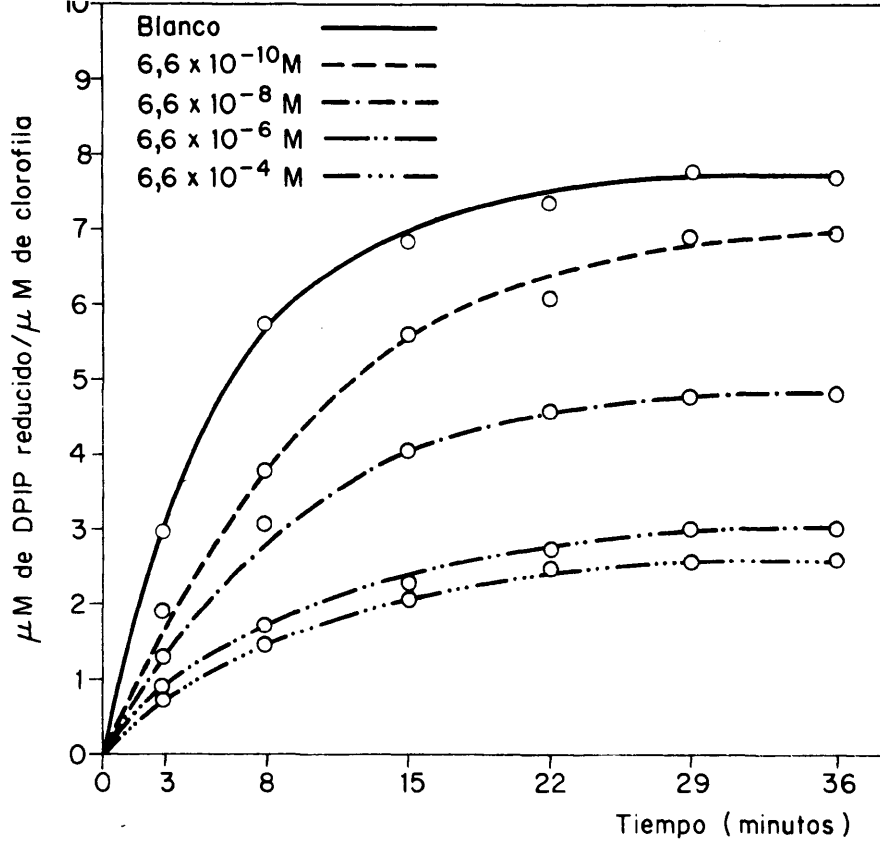


FIG. 13. — CINETICA DE LA REDUCCION DEL DPIP POR CLOROPLASTOS DE CEBADA, PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CMU.

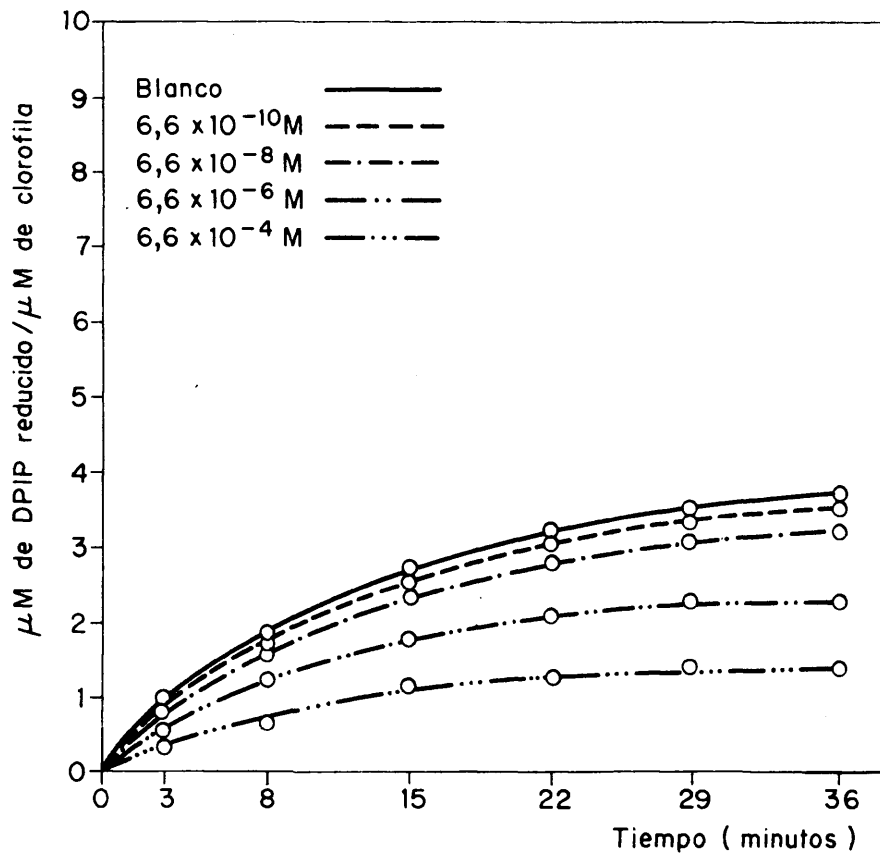


FIG. 14. — CINETICA DE LA REDUCCION DEL DPIP POR CLOROPLASTOS DE AVENA, PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CMU.

TABLA XI. Cinética de la reducción del DPIIP por cloroplastos aislados de cebada en función de la concentración de CMU (los valores expresan los  $\mu\text{M}$  de DPIIP que son reducidos por  $\mu\text{M}$  de clorofila).  
 Contenido en clorofila:  $1,08 \times 10^{-2} \mu\text{M/ml}$ .

Tiempo minutos	0	3	8	15	22	29	36
$6,6 \times 10^{-4}$	0	0,75	1,51	2,10	2,52	2,58	2,60
$6,6 \times 10^{-6}$	0	0,81	1,75	2,30	2,75	3,01	3,05
$6,6 \times 10^{-8}$	0	1,34	3,14	4,08	4,61	4,85	4,87
$6,6 \times 10^{-10}$	0	1,95	3,75	5,63	6,10	6,99	7,02
0	0	3,02	5,70	6,87	7,35	7,75	7,75

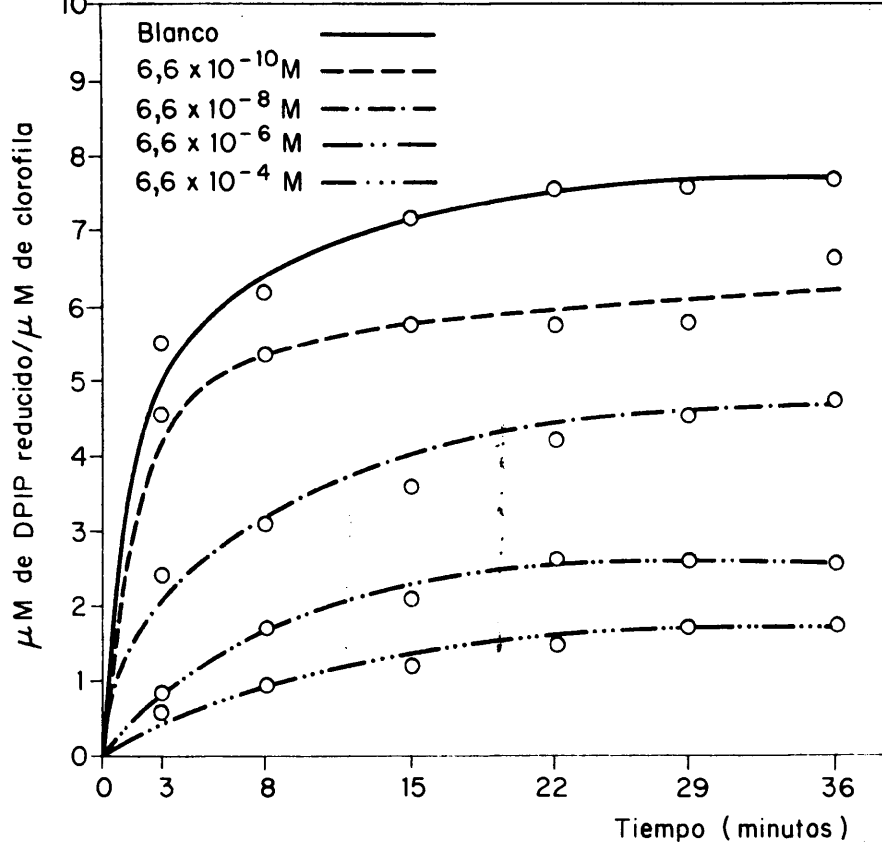


FIG. 15. — CINETICA DE LA REDUCCION DEL DPIP POR CLOROPLASTOS DE ESPINACA, PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CMU.

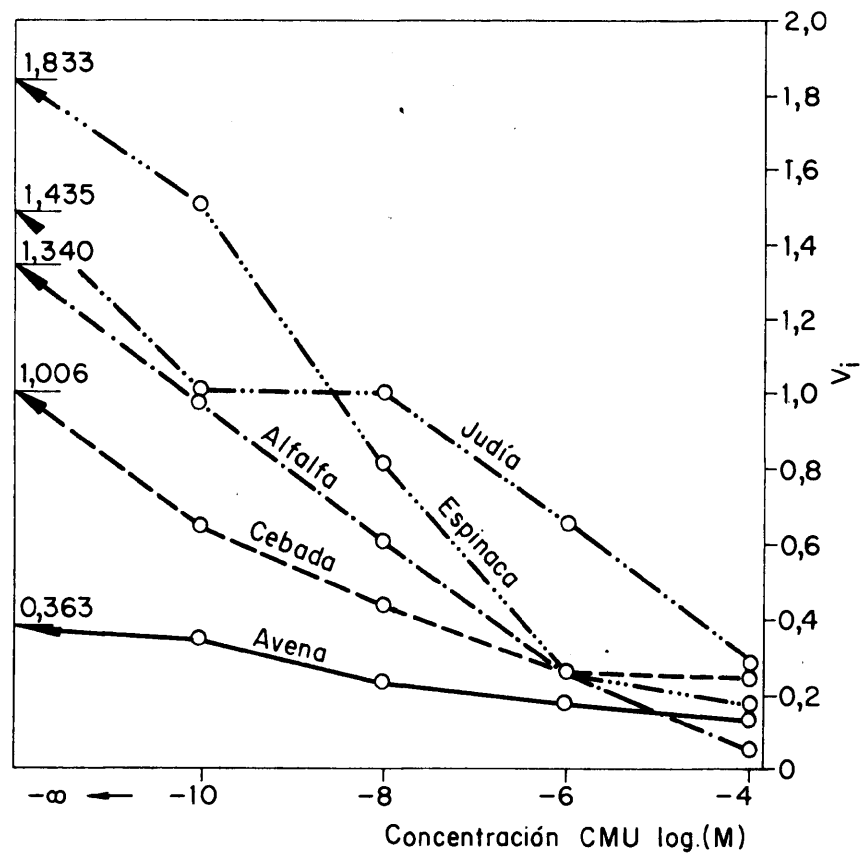


FIG. 16. — RELACION ENTRE LA VELOCIDAD INICIAL DE REDUCCION DE DPIP, POR MICROMOL DE CLOROFILA Y LA CONCENTRACION DE CMU, PARA LAS DISTINTAS PLANTAS.

La velocidad inicial de la reacción, que corresponde aproximadamente a la que se realiza en los cloroplastos "in situ" se expresa con respecto a la concentración de CMU en la tabla nº XII y se representa en la figura nº 16.

### 3.1.6.2. Análisis estadístico.

Observando las familias de pares de valores muestrales obtenidas para cada especie vegetal, se consideró que podrían ajustarse a hipérbolas de expresión :

$$Y = \frac{Y_M \times t}{t + T_{\frac{1}{2}}}$$

Siendo: Y = la cantidad de DPIP reducido por micromol de clorofila.

t = tiempo expresado en minutos.

$Y_M$  = una constante que determina el valor máximo de Y (asintota)

$T_{\frac{1}{2}}$  = una constante que equivale al intervalo de tiempo que debe transcurrir para que el valor de Y sea  $\frac{1}{2}$  de  $Y_M$ .

Los valores de  $Y_M$  y  $T_{\frac{1}{2}}$  varían para cada concentración de CMU y para cada especie vegetal.

El ajuste de las curvas se realizó por el método de los mínimos cuadrados y la bondad de dicho ajuste, utilizando el test de  $\chi^2$  fué en todos los casos superior

TABLA XII. Velocidad inicial de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de las diferentes especies vegetales. Los valores se expresan en microsoles de DPIP reducido por minuto y por micromol de clorofila.

Especie vegetal / concentración CMU (Molar)	Judfa	Alfalfa	Avena	Espinaca	Cebada
$6,6 \times 10^{-4}$	0,266	0,058	0,148	0,190	0,250
$6,6 \times 10^{-6}$	0,670	0,270	0,192	0,270	0,270
$6,6 \times 10^{-8}$	1,060	0,606	0,250	0,823	0,446
$6,6 \times 10^{-10}$	1,060	1,003	0,346	1,503	0,650
0	1,435	1,340	0,363	1,833	1,006

al 99% para un nivel de significación de la muestra del 5%. Los valores de  $Y_M$  y  $T_{\frac{1}{2}}$  para las diferentes curvas dentro de cada familia se expresan en la tabla nº XIII.

Considerando la velocidad de reacción inicial ( $V_r$ ) de reducción del DPIP por los cloroplastos aislados, como valor más aproximado de velocidad de reducción que se efectuaría en los cloroplastos "in situ", es interesante hallar la relación que guarda dicho valor de reducción con la concentración de CMU.

Si consideramos la concentración como una expresión exponencial,  $C = 6,6 \times 10^{-x}$ ,  $V_r$  puede relacionarse con  $x$  para valores de  $X \geq 4$  por medio de una función logística del tipo.

$$V_r = \frac{K}{1 + N \times 10^{-ax}}$$

Si efectuamos el cambio de variable  $10^{-x} = \frac{C}{6,6}$ , nos quedaría la función.

$$V_r = \frac{K}{1 + N \left( \frac{C}{6,6} \right)^a}$$

o lo que es lo mismo:

$$V_r = \frac{K}{1 + \left( \frac{C}{B} \right)^a} \quad (1)$$

TABLA XIII. Valores de  $Y_M$  (cantidad máxima de DPIP reducido expresado en  $\mu M/\mu Mol$  de clorofila) y  $T_{\frac{1}{2}}$  (intervalo de tiempo que se tarda en alcanzar el 50% de la reducción máxima del DPIP), para cada planta en función de la concentración de CMU.

Especie vegetal concentración CMU (Molar)	Judfa		Alfalfa		Avena		Espinaca		Cebada	
	$Y_M$	$T_{\frac{1}{2}}$	$Y_M$	$T_{\frac{1}{2}}$	$Y_M$	$T_{\frac{1}{2}}$	$Y_M$	$T_{\frac{1}{2}}$	$Y_M$	$T_{\frac{1}{2}}$
$6,6 \times 10^{-4}$	2,65	9,70	1,19	29,89	1,64	6,04	2,32	10,93	3,71	12,59
$6,6 \times 10^{-6}$	4,98	5,50	3,27	4,00	3,53	15,98	3,05	5,67	3,96	10,13
$6,6 \times 10^{-8}$	5,67	2,25	4,06	5,15	4,38	12,59	5,71	7,51	5,84	6,48
$6,6 \times 10^{-10}$	6	2,23	7,68	4,63	4,57	11,59	6,59	2,06	8,79	4,39
0	7,34	3,80	8,44	5,24	4,99	13,87	8,15	2,04	9,06	9,85

siendo para cada especie:

K = una constante que expresa el valor de la asintota equivalente a la velocidad de reducción máxima del DPIP cuando la concentración de CMU (C) es nula.

B = una constante que nos indica la concentración necesaria de CMU, para que el valor de Vr se reduzca a la mitad respecto al valor asintótico.

a = una constante.

La ecuación (1) puede expresarse en la forma:

$$C = B \left( \frac{K}{V_r} - 1 \right)^{1/a}$$

Tomando logaritmos se transformaría en una función lineal:

$$\log C = 1/a \log \left( \frac{K}{V_r} - 1 \right) + \log B$$

ya que efectuando el cambio:

$$\begin{aligned} \log C &= y \\ \log \left( \frac{K}{V_r} - 1 \right) &= x \end{aligned}$$

quedaría la expresión:

$$y = 1/a x + \log B$$

Al efectuar el ajuste por el método de los mínimos cuadrados, obtenemos los valores de a y B para cada especie vegetal.

Las ecuaciones matemáticas que ligan el valor de la velocidad de reducción inicial, expresada en micromoles de DPIP reducido por minuto y por micromol de clorofila, con la concentración molar de CMU para cada especie vegetal estudiada, se expresan a continuación:

$$\text{Judía: } V_r = \frac{1,435}{1 + \left( \frac{C}{1,14 \times 10^{-6}} \right)^{0,215}}$$

$$\text{Alfalfa: } V_r = \frac{1,340}{1 + \left( \frac{C}{3,43 \times 10^{-8}} \right)^{0,301}}$$

$$\text{Avena : } V_r = \frac{0,363}{1 + \left( \frac{C}{1,81 \times 10^{-5}} \right)^{0,269}}$$

$$\text{Espinaca: } V_r = \frac{1,833}{1 + \left( \frac{C}{7,09 \times 10^{-8}} \right)^{0,290}}$$

$$\text{Cebada: } V_r = \frac{1,006}{1 + \left( \frac{C}{2,97 \times 10^{-8}} \right)^{0,139}}$$

En la tabla nº XIV se dan los valores de  $V_r$  teóricos (calculados según las ecuaciones anteriores) y experimentales, en función de la concentración de CMU en cada especie vegetal. También se indican los valores de  $\chi^2$  que permiten estimar la bondad del ajuste.

Si expresamos la velocidad inicial de la reacción de Hill para cada concentración de CMU, como el % de la velocidad máxima en el ensayo testigo sin CMU, y este valor lo restamos de 100, podremos expresar los resultados en función del % de inhibición. Estos resultados se expresan en la tabla nº XV.

La ecuación (1) que liga la velocidad de reducción inicial del DPIP con la concentración de CMU, puede expresarse como % de inhibición ó "poder inhibidor" (P. I.) según la ecuación:

$$P.I. = 100 - \frac{V_r}{K} \times 100$$

quedando la expresión:

$$P.I. = \frac{1}{1 + \left(\frac{B}{C}\right)^a} \times 100$$

Es interesante notar que B expresa la concentración correspondiente al  $PI_{50}$ , es decir la concentración de CMU que produce el 50% de inhibición.

Para comparar la influencia del CMU en la reacción de Hill entre las diferentes especies vegetales, es

TABLA XIV. Valores teóricos y experimentales de  $V_r$  expresados en micromoles de DPIP por minuto y micromol de clorofila.

Especie vegetal Concen- tración CMU (Molar)	Judía		Alfalfa		Avena		Espinaca		Cebada	
	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.
$6,6 \times 10^{-4}$	0,291	0,266	0,065	0,058	0,100	0,148	0,121	0,190	0,200	0,250
$6,6 \times 10^{-6}$	0,583	0,670	0,228	0,270	0,206	0,192	0,387	0,270	0,322	0,270
$6,6 \times 10^{-8}$	0,930	1,060	0,603	0,606	0,297	0,250	0,924	0,823	0,474	0,446
$6,6 \times 10^{-10}$	1,193	1,060	1,026	1,003	0,341	0,346	1,456	1,503	0,633	0,650
	$\chi^2 = 0,04607$		$\chi^2 = 0,00882$		$\chi^2 = 0,03137$		$\chi^2 = 0,08721$		$\chi^2 = 0,02296$	

TABLA XV. % de inhibición de la fotosíntesis en función de la concentración de CMU para las diferentes plantas estudiadas.

Concentración de CMU (M)	% de inhibición de fotosíntesis en plantas de:				
	Judía	Alfalfa	Avena	Espinaca	Cebada
$6,6 \times 10^{-4}$	81,50	95,70	59,30	89,70	75,20
$6,6 \times 10^{-6}$	53,40	79,90	47,20	85,30	73,20
$6,6 \times 10^{-8}$	26,20	54,80	31,20	55,20	55,70
$6,6 \times 10^{-10}$	26,20	25,20	4,70	18,10	35,40
0	0	0	0	0	0

necesario fijar un PI. (normalmente se toma el PI<sub>50</sub>) y establecer la relación molar CMU/clorofila. En la tabla n<sup>o</sup> XVI se dan los valores de esta relación para el PI<sub>50</sub> en las distintas especies.

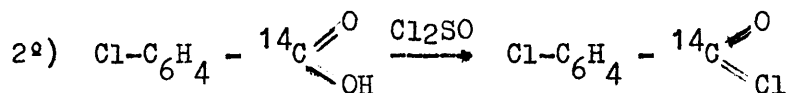
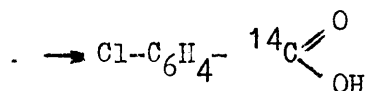
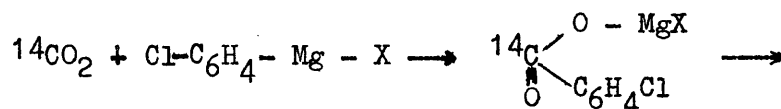
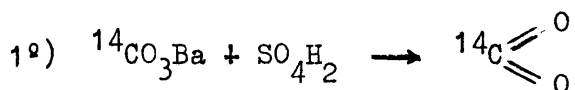
TABLA XVI. Relación molecular CMU/clorofila para un PI<sub>50</sub> (valor teórico) en las distintas especies estudiadas.

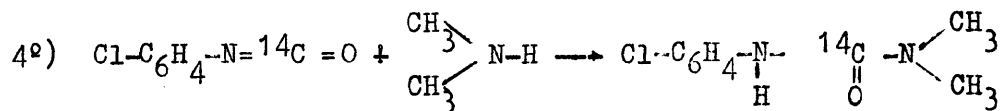
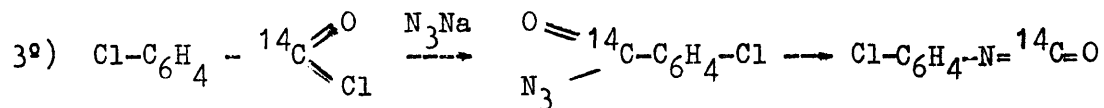
Especie	Concentración de clorofila (M)	Concentración de CMU para PI <sub>50</sub> (M)	Relación CMU/clorofila M/M
Judía	$1,08 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-6}$	0,1055
Alfalfa	$1,28 \times 10^{-5}$	$3,43 \times 10^{-8}$	0,00267
Avena	$1,28 \times 10^{-5}$	$1,81 \times 10^{-5}$	1,4140
Espinaca	$5,77 \times 10^{-6}$	$7,09 \times 10^{-8}$	0,01228
Cebada	$1,08 \times 10^{-5}$	$2,97 \times 10^{-8}$	0,00275

3.2. PREPARACION DEL (3-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea-2-<sup>14</sup>C)  
(MONURON).

Como ya se ha mencionado anteriormente, con objeto de facilitar el estudio de la absorción radicular, así como, el comportamiento del monurón en el suelo, ha sido preciso disponer de monurón marcado con <sup>14</sup>C por lo que se sintetizó, marcándolo en el carbono 2.

El primer paso para obtener el monurón (3-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea-2-<sup>14</sup>C), es disponer del ácido p-clorobenzoico-<sup>14</sup>C, el cual se origina por carbonatación del correspondiente magnesiano; siguiendo la reacción de Grignard. Una vez obtenido el ácido p-clorobenzoico se forma el cloruro de ácido por reacción con el cloruro de tionilo. Seguidamente se obtiene el ester isocianico por tratamiento con la azida sódica. En un último paso, se trata el p-clorofenil isocianato-<sup>14</sup>C con dimetilamina y se obtiene el (3-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea-2-<sup>14</sup>C). Las reacciones son las siguientes:





MONURON

Vamos a considerar con cierto detalle las condiciones óptimas de las mencionadas etapas.

3.2.1. Carbonatación del reactivo de Grignard.

3.2.1.1. Consideraciones generales.

El magnesiano debe prepararse añadiendo lentamente el derivado halogenado, previamente disuelto en eter anhidro, al magnesio y preservando la reacción del contacto del aire y de la humedad.

Si al magnesiano recién preparado, se le hace reaccionar con CO<sub>2</sub> a baja temperatura, se obtienen ácidos monocarboxílicos.

Por ser el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> la fuente normal de <sup>14</sup>C, este método resulta altamente útil para conseguir moléculas marcadas con <sup>14</sup>C. Normalmente se usa un exceso de CO<sub>2</sub> que se hace reaccionar con una cantidad determinada de magnesiano, pero en el tratamiento que ahora nos ocupa, el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, por su coste, resulta el compuesto limitante de la reacción, por ello, se invierte el proceso clásico y es

el reactivo de Grignard el que entra en exceso en la reacción. El rendimiento, trabajando a baja temperatura y alto vacío, es del orden de 80-95%. Las ventajas de efectuar la reacción en estas condiciones son:

- a) Se evita la formación de mezclas de cetonas y alcoholes terciarios que aparecerían si se trabajase con dióxido de carbono a temperatura ambiente.
- b) Se evita el oxígeno y la humedad que perjudicarían e hidrolizarían el reactivo de Grignard, disminuyendo el rendimiento.
- c) Se puede recoger cuantitativamente el  $^{14}\text{CO}_2$  sobre el matraz de carbonatación, evitando la pérdida de  $^{14}\text{CO}_2$  por posibles fugas.

### 3.2.1.2. Preparación del reactivo de Grignard a partir del cloro-bromobenceno.

Se pesan 64 m. at. -- g de virutas finas de magnesio, (1,556 g ), que se desengrasan previamente y se introducen en un matraz de dos bocas con fondo redondo. Se acopla un refrigerante, con tubo de desecación y válvula de seguridad, ya que las condiciones han de ser rigurosamente anhidras, se desaloja el aire por medio de una corriente de Nitrogeno. Se disuelven 64 micromoles de cloro-bromobenceno, (12,25 g ), en 100 ml de eter anhidro y se añade al magnesio por medio de un embudo de decantación, muy lóntamente. Inmediatamente aparece un flocula-

do blanco. En caso de que el éter hierva con demasiada rapidez, se enfriaría el matraz, pues el éter puede evaporarse formando espumas. A continuación de haber añadido toda la solución etérea, se completa la reacción calentando a reflujo; después de una media hora se obtiene una solución incolora que es el reactivo de Grignard. Esta solución debe valorarse y utilizarse inmediatamente, en caso contrario, habrá que guardarla bien cerrada en nevera y valorarla momentos antes de su utilización.

### 3.2.1.3. Valoración del Magnesiano.

Para conseguir la hidrólisis de la solución etérea del magnesiano, a 10 ml de éter, se le añaden 10 ml de agua y una vez hidrolizado el magnesiano, 10 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1N con unas gotas de anaranjado de metilo, A continuación se valora el exceso de ácido con NaOH, (1N).

Normalidad de la solución etérea del magnesiano=

$$= \frac{V_{AC} \times N_{AC} \times f_{AC} - V_{ALC} \times N_{ALC} \times f_{ALC}}{V_{MAG}}$$

Siendo:  $V_{AC}$  = Volumen del ácido.

$N_{AC}$  = Normalidad del ácido.

$f_{AC}$  = factor del ácido.

$V_{ALC}$  = Volumen del alcalí.

$N_{ALC}$  = Normalidad del alcalí

$f_{ALC}$  = factor del alcalí

$V_{MAG}$  = Volumen de la solución del magnesiano.

Como habíamos hecho reaccionar 64 mmoles de  $\text{Cl-C}_6\text{H}_4\text{-Br}$  con 64 m.at.-g de magnesio y lo habíamos llevado a un volumen de unos 100 ml., nos debería salir una concentración de 0,64 mmoles/ml. La normalidad resultante de la valoración fué de 0,66, algo mayor de la esperada debido posiblemente a la evaporación de una parte del éter.

#### 3.2.1.4. Obtención del p-clorobenzoico-1- $^{14}\text{C}$ .

Esencialmente se ha seguido el método de obtención de Calvin (108), aunque se han introducido algunas simplificaciones propuestas por Murray (109). El aparato utilizado se representa en la figura 17 y consta de una línea de alto vacío con varias entradas para conectar: a) El matraz de reacción, b) El matraz generador de  $^{14}\text{CO}_2$ , c) El manómetro de mercurio, d) Un Pirani, e) Corriente de  $\text{N}_2$  y f) Un frasco lavador con NaOH.

El matraz de carbonatación (A) tiene forma cilíndrica y lleva en la parte superior un agitador magnético recubierto de teflón. La parte inferior del agitador, tiene forma de hélice. Al fondo del matraz se le ha dado forma de pera con objeto de evitar la rotura, en caso de que se congele la solución de Grignard. Este matraz tiene dos bocas, una para entrada del magnesiano y otra, conectada a la línea múltiple, que sirve para introducir el  $\text{N}_2$ , hacer vacío y por donde penetra la corriente de  $^{14}\text{CO}_2$  (ver figura 17).

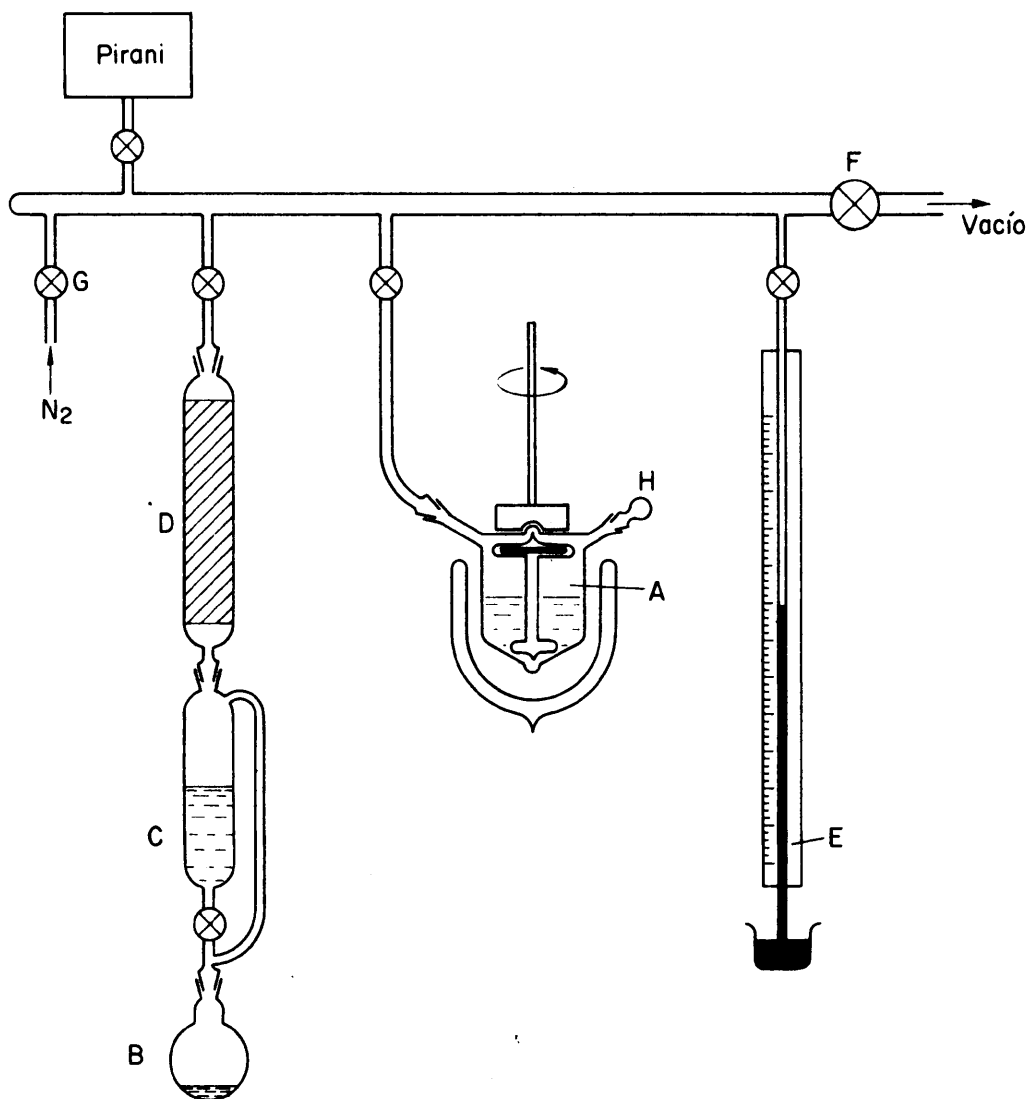


FIG. 17. - ESQUEMA DEL APARATO DE CARBONATACION DE GRIGNARD.

El generador de  $^{14}\text{CO}_2$  está formado por un matraz (B) de fondo redondo en donde se introduce el  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$  y un embudo igualador de presión (C) que contiene el  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Para evitar posibles trazas de humedad, se intercala entre la línea y el matraz, un tubo de desecación con drierita (D). El manómetro utilizado fué de mercurio con una rama abierta a la atmósfera (E).

Como el  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$  de partida tenía una actividad específica de 37 mCi/mmol, equivalentes a un 66% de  $^{14}\text{C}$ , (1 mCi/mmol equivale a 1,8% de  $^{14}\text{C}$ ), para obtener 10 mmoles de producto con una actividad específica de 5 mCi/mmol, se pesó 1,35 mmoles, (268,06 mg), de  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$  y se enfriaron con 8,65 mmoles, (1,706 g), de carbonato inactivo.

Estos 10 mmoles de carbonato se depositaron en el matraz (B) y se cargó el embudo regulador (C) con 15 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado.

Se hizo un vacío en el sistema de 0,1  $\mu$  y después de comprobar la ausencia de fugas, se cerró la llave de unión (F) al equipo de vacío y se introdujo  $\text{N}_2$  puro, (a través de G), hasta que se alcanzó la presión atmosférica. En este momento se abrió el tapón (H) del matraz de reacción y se añadió 32 ml de solución etérea del magnesiano recién preparada (0,66 N), que para evitar contaminación con el aire se introdujo por medio de una jeringa y agregándose también 38 ml de éter seco, con lo que se consiguió que la normalidad resultante fuese 0,3N, valor más adecuado para

reducir al máximo las reacciones secundarias.

Se tapó rápidamente el matraz y una vez cerrada la llave del  $N_2$  se congeló el contenido del mismo con aire líquido. El  $N_2$  que hubiese podido quedar atrapado en la masa éterea congelada se elimina aplicando un vacío de  $0,1 \mu$  y dejando que la masa se caliente hasta que el éter comience a hervir. En este momento vuelve a congelarse la solución de Grignard y suavemente se hace vacío hasta asegurar la completa eliminación del  $N_2$ .

Una vez solidificada la masa se abre la llave de vacío y cuando éste llega a  $0,1 \mu$  se cierra, cambiándose el baño de aire líquido por uno de nieve carbónica-acetona de  $-25^\circ C$ . Cuando el contenido del matraz alcanza el equilibrio térmico con el baño, que tendrá una temperatura de  $-25^\circ$  a  $-30^\circ C$ , se pone en marcha el agitador y se inicia la carbonatación, haciendo gotear el  $SO_4H_2$  sobre el  $CO_3Ba$  en el matraz (B). El ácido sulfúrico se añade al principio con precaución para evitar posibles salpicaduras y formación de espumas que arrastrarían partículas de carbonato sin reaccionar. La velocidad de adición, se regula de tal manera que la presión no exceda de 50 cms. Una vez que el desprendimiento gaseoso ha terminado, se calienta ligeramente el matraz (B) con lo que se disuelve gran parte del  $SO_4Ba$  y se favorece la expulsión de las últimas trazas de  $^{14}CO_2$ . Como la transferencia de estas últimas fracciones de  $^{14}CO_2$ , podrían verse interferidas por los vapores de

éter, se interrumpe la agitación y se enfría de nuevo con aire líquido el contenido del matraz de carbonatación, con lo que todo el  $^{14}\text{CO}_2$  que pueda quedar, destila a este matraz.

Después se cierra la llave (a) y se reemplaza el baño de aire líquido por el de acetona-nieve carbónica y se reanuda la agitación durante unos veinte minutos más, al cabo de los cuales se da por terminada la operación. Se rompe el vacío introduciendo cuidadosamente una corriente de  $\text{N}_2$ , se retira el baño de nieve carbónica-acetona y se agregan 25 mls de  $\text{NaOH}$  (2M), manteniendo la agitación; se pasa la mezcla a un embudo de decantación donde se separa la capa etérea de la alcalina. Se lava repetidamente la solución etérea con la solución alcalina, hasta que al acidificar ésta, no aparezca precipitado, lavandose luego la solución alcalina con éter para arrastrar las últimas impurezas. A continuación se acidifica, con lo que precipita el ácido p-clorobenzoico, prácticamente insoluble en agua y se separa por filtración.

#### 3.2.1.4.1. Observaciones al método.

- a) El reactivo de Grignard debe utilizarse inmediatamente después de preparado, en caso contrario habrá que tener en cuenta que la oxigenación del reactivo conduce a carbinoles e introduce errores en la determinación de la con-

centración al valorar. La manera de evitar esto, es trabajar con corriente de  $N_2$ .

- b) Las condiciones de todo el tratamiento tienen que ser rigurosamente anhidras, ya que la humedad reduce también la concentración del reactivo.
- c) Es conveniente operar con una concentración del reactivo de Grignard en la solución etérea, de 0,3M ya que así se evita la formación de cetonas y carbinoles, al mismo tiempo que es favorable para mantener el reactivo en solución a la temperatura de operación.

#### 3.2.1.4.2. Resultados obtenidos.

Trabajando en las condiciones descritas, se obtuvo un rendimiento del 98% a partir de los 10 mmoles iniciales de  $CO_3Ba$ . (Se determinó por pesada). La actividad específica se determinó por contaje en centelleo líquido. Para ello, se neutralizó el ácido p-clorobenzoico- $1-^{14}C$ , con sosa IN y se tomó para medir una alícuota de la solución acuosa de la sal sódica. La actividad específica resultante fue de 4,57 mCi/ $\mu M$  a 31,9  $\mu Ci/\mu g$ .

#### 3.2.1.4.3. Pureza radioquímica.

La pureza radioquímica se estableció por compara-

ción de los análisis cromatográficos de una muestra de  $2\lambda$  de una solución de ácido p-clorobenzoico-1- $^{14}\text{C}$  de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , con otra 100 veces más diluida, en la misma placa. Comparando los ennegrecimientos obtenidos al revelar el autorradiograma, se determinó que la pureza radioquímica del producto era superior al 99%.

Se empleó como solución desarrolladora una mezcla butanol-acético-agua, 4:1:6. El tiempo de desarrollo fué de 6 horas, siendo el Rf del p-clorobenzoico igual a 0,68.

### 3.2.2. Obtención del monurón-2- $^{14}\text{C}$ .

Existen en la bibliografía diferentes trabajos sobre la obtención del monurón marcado con  $^{14}\text{C}$ , Basandose en la reacción de Hoffman (110), hay un procedimiento que se podría tener en cuenta por su sencillez, pero tiene un rendimiento bastante bajo (18%); el método consiste en la adición de KBr a una mezcla de p-clorobenzamida y N,N dimetilamina, calentando durante dos horas a  $75^\circ\text{C}$ .

Aún cuando los rendimientos sean aceptables, hemos tenido que desechar otros métodos de obtención (111) y (112) de monurón, bien por la dificultad en la obtención de los compuestos intermedios o por requerir un largo proceso de purificación final, que en el caso de moléculas marcadas debe ser acertado al máximo. Se seleccionó como más conveniente la síntesis propuesta por Logan y Odell. El rendimiento que la bibliografía consigna para éste

método es del 56,6%. Si bien introduciendo algunas modificaciones en la purificación, se alcanzó el 74%, (operando a escala de 9 mmoles). (113).

### 3.2.2.1. Preparación del cloruro de ácido,

Se parte de 9 mmoles de p-clorobenzóico-1-<sup>14</sup>C (1,409 g.), a los que se añadieron 15 ml de Cl<sub>2</sub>SO y 40 ml de tolueno, la mezcla resultante se calienta a la temperatura de ebullición del Cl<sub>2</sub>SO (80°C), manteniéndose durante una hora a reflujo. El exceso de Cl<sub>2</sub>SO se elimina por destilación. Para asegurarnos que todo el Cl<sub>2</sub>SO ha desaparecido, se añaden 20 ml de tolueno para arrastrar las últimas porciones de Cl<sub>2</sub>SO. Se repite la operación hasta que desaparezca el olor de Cl<sub>2</sub>SO. La solución residual debe ajustarse para que contenga los 40 ml de tolueno con los que se empezó la reacción.

### 3.2.2.2. Formación del ester isociánico.

A la solución toluénica de p-cloruro de clorobenzóico-1-<sup>14</sup>C se le añaden 20 mmoles (1,3004 gr), de azida recién activada.\* Se refluje esta mezcla durante 24 horas, calentando

---

\* Para activar la azida basta con disolverla en agua caliente y reprecipitarla en medio litro de acetona fría. La azida activada debe utilizarse antes de las 24 horas, pues al cabo de este tiempo, pierde su activación.

a 130°C y agitando para que la mezcla con la azida sea más eficaz. Al cabo de las 24 horas se forma el éster isociánico a partir del p-clorobenzoilo.

### 3.2.2.3. Obtención del monurón a partir del correspondiente ester isociánico.

Se destilan 7,5 ml de dimetilamina seca sobre 25 ml de tolueno frío, (la temperatura de ebullición de la dimetilamina es de 7°C) y se agrega esta solución toluénica al isocianato de p-clorofenilo-1-<sup>14</sup>C. La reacción se verifica enfriando con una mezcla frigorífica que alcance la temperatura de -10°C. La solución resultante, se mantiene en este baño durante media hora y seguidamente se calienta para expulsar el exceso de dimetilamina. La total eliminación de la dimetilamina es fácil de determinar debido a su carácter básico. Luego se filtra y el residuo se lava con 30 ml de acetona. Una vez bien seco, se disuelve en ácido clorhídrico del 32% y se precipita el monurón de la solución ácida por dilución con agua ó bien agregando hidróxido sódico diluido. A continuación se filtra el monurón y se recristaliza en metanol (1).

### 3.2.2.4. Resultados obtenidos.

Siguiendo el procedimiento anterior se consiguió un rendimiento a partir de los 9 mmoles de ácido p-clorobenzoico-1-<sup>14</sup>C, del 74%. El punto de fusión fué de 170,5 - 171°C, que coincide con el encontrado en la bibliografía para el producto

puro (6), (33) y (50).

La actividad específica se determinó como en el caso del ácido p-clorobenzoico-1-<sup>14</sup>C por contaje en centelleo líquido de una muestra de 50  $\lambda$  de una solución de 16 mgr de monurón en 100 ml de etanol. La actividad específica obtenida fué de 4,50 mCi/mmol.

### 3.2.2.5. Pureza radioquímica.

En la figura 18 se muestra la autorradiografía correspondiente al análisis en placas de gel de sílice, con las tres mezclas desarrolladoras ya mencionadas.

Comparando los ennegrecimientos producidos por las manchas originales del monurón-2-<sup>14</sup>C y los producidos por la dilución 1:100. Se observa que la pureza radioquímica es superior al 99%.

### 3.3. ESTUDIO DE LA ABSORCION RADICULAR

Para estudiar la absorción radicular del monurón-2-<sup>14</sup>C por la raíz aislada y la planta completa, se utilizaron plantas de judía y cebada, cultivadas durante tres semanas en solución nutritiva con vermiculita como soporte, sometidas a una iluminación continua de 5000 lux, una temperatura de 22°C y una humedad relativa del 65%.

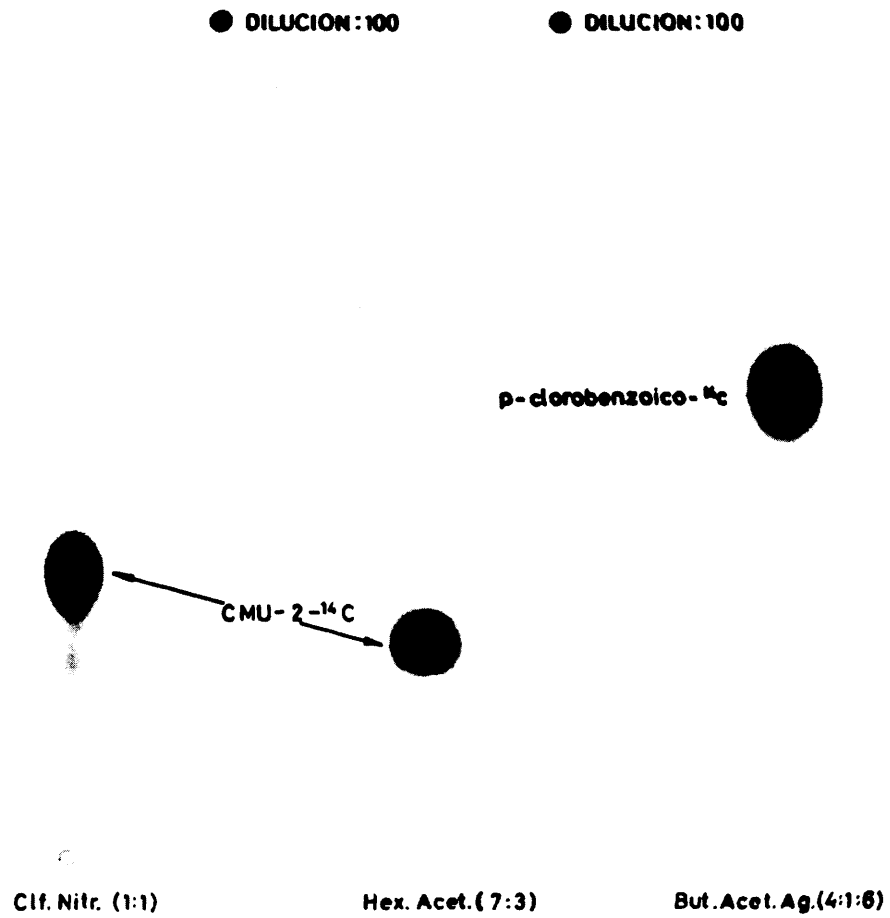


Fig. 18.- Autorradiografías de los radiocromatogramas de CMU-2-<sup>14</sup>C y ácido p-clorobenzoico-<sup>14</sup>C efectuadas en capa fina de gel de sílice.

### 3.3.1. Absorción por la planta completa.

Después de tres semanas, las plantas se extrajeron de la vermiculita y se pasaron a unos vasos de color topacio con solución nutritiva de Hoagland cuya composición se expresa en la tabla XVII. En esta solución se mantuvieron durante 24 horas con objeto de estabilizar la absorción radicular.

Las dosis de aplicación fueron análogas a las utilizadas en el campo para aplicaciones selectivas 0,5 y 1,5 Kg/Ha. Si se admite que el monurón se distribuye homogéneamente entre los 20 primeros centímetros de profundidad de un suelo que se encuentra a la capacidad de campo y que ésta sea del 50%; la dosis superficial recibida por el suelo expresada en Kg/Ha, es igual a la concentración de la solución expresada en  $\mu\text{g/ml}$  (p.p.m.).

Las cantidades de herbicida añadido a la solución nutritiva según las dosis empleadas, se expresa en la tabla XVIII.

A continuación del período de estabilización, las plantas se introdujeron en las respectivas soluciones con la dosis de CMU correspondiente, procurando que solo quedase sumergido el sistema radicular y manteniendo una aireación continua de la solución hasta el momento de extracción de la planta, que se realizó al final del período de tiempo deseado.

TABLA XVII. Solución nutritiva de Hoagland.

Producto	Concentración (g/l)
$K_2PO_4 \cdot H_2O$	$1,36 \times 10^{-1}$
$KNO_3$	$5,05 \times 10^{-1}$
$Ca(NO_3)_2$	$8,20 \times 10^{-1}$
$MgSO_4$	$2,40 \times 10^{-1}$
$BO_3H_3$	$2,86 \times 10^{-3}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	$1,81 \times 10^{-3}$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$0,22 \times 10^{-3}$
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$0,08 \times 10^{-3}$
$MoO_4H_2 \cdot H_2O$	$0,02 \times 10^{-3}$
Citrato Férrico	$2,00 \times 10^{-3}$

TABLA XVIII. Concentración del herbicida en la solución nutritiva.

Herbicida	Concentración del herbicida en la solución nutritiva.		Concentración radiactiva.	Actividad específica		pH de la solución.
	µg/ml	(M)		µCi/mg	µCi/mM	
CMU	0,5	$2,5 \times 10^{-9}$	$1,06 \times 10^{-2}$	22,65	4,53	6,6
	1,5	$7,5 \times 10^{-9}$	$3,18 \times 10^{-2}$	22,65	4,53	

Después de la extracción, se separó la raíz, el tallo y las hojas, se pesaron y prepararon para determinar la actividad mediante contaje en centelleo líquido de monurón-2-<sup>14</sup>C absorbido. También se tomó una muestra de la solución nutritiva al principio y al final de la experiencia, para determinar la pureza por cromatografía en capa fina y la variación de la concentración radiactiva .

La pureza del monurón-2-<sup>14</sup>C en la solución, al final del período de absorción, fué superior al 95% y la variación de la concentración radiactiva puede considerarse nula.

Las extracciones se realizaron a las 0,5; 1; 2; 4; 10; 20; 35; 50; 72; y 100 horas, se efectuaron 6 repeticiones para cada hora, planta y dosis de herbicida.

A partir de los valores de la actividad de C-14, obtenido por contaje, se dedujo la cantidad de herbicida fijado por gramo de materia fresca en los distintos órganos de las plantas. Los resultados obtenidos en función del tiempo de absorción, se expresan en las tablas XIX y XX y se representan en las figuras número 19 y 20.

### 3.3.2. Estimación del espacio externo e interno en raíces aisladas.

Se aislaron las raíces del tallo de plantas de judía y cebada cultivadas simultaneamente a las del tratamiento anterior, introduciendo las raíces en vasos que contenían solu-

TABLA XIX. Cantidad de CMU fijado por los distintos órganos de plantas de cebada, en función del tiempo de absorción y según la concentración del herbicida en la solución nutritiva. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}$  de CMU por gramo de materia fresca.

Tiempo de absorción (horas)	Concentración de la solución.		0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$		1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
	Organo		Raiz	Tallo y hoja	Raiz	Tallo y hoja
0,5			0,233	0,009	0,533	0,015
1			0,375	0,012	0,975	0,018
2			0,459	0,015	1,316	0,025
4			0,566	0,053	1,810	0,066
10			0,875	0,059	2,836	0,180
20			0,983	0,229	3,066	0,831
35			1,100	0,372	3,226	1,530
50			1,080	0,480	3,025	1,750
72			1,128	0,528	3,150	1,823
100			1,360	0,553	2,780	1,987

TABLA XX. Cantidad de CMU fijado por los distintos órganos de planta de judía, en función del tiempo de absorción y según la concentración del herbicida en la solución nutritiva. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}$  de CMU por gramo de materia fresca.

Concentración de la solución	Organo	0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$			1,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
		Raiz	Tallo	Hoja	Raiz	Tallo	Hoja
0,5		0,660	0,025	0	1,800	0,030	0,034
1		0,820	0,042	0,011	2,600	0,072	0,056
2		0,910	0,062	0,073	3,060	0,100	0,064
4		1,430	0,077	0,079	4,200	0,250	0,184
10		1,800	0,133	0,230	4,730	0,266	0,306
20		2,170	0,517	0,415	5,225	0,333	1,060
35		2,200	0,623	1,060	6,112	0,543	1,750
50		2,300	0,450	0,958	5,703	0,825	1,820
72		2,366	0,517	1,016	4,553	0,970	1,709
100		2,396	0,527	1,074	3,335	1,180	1,892

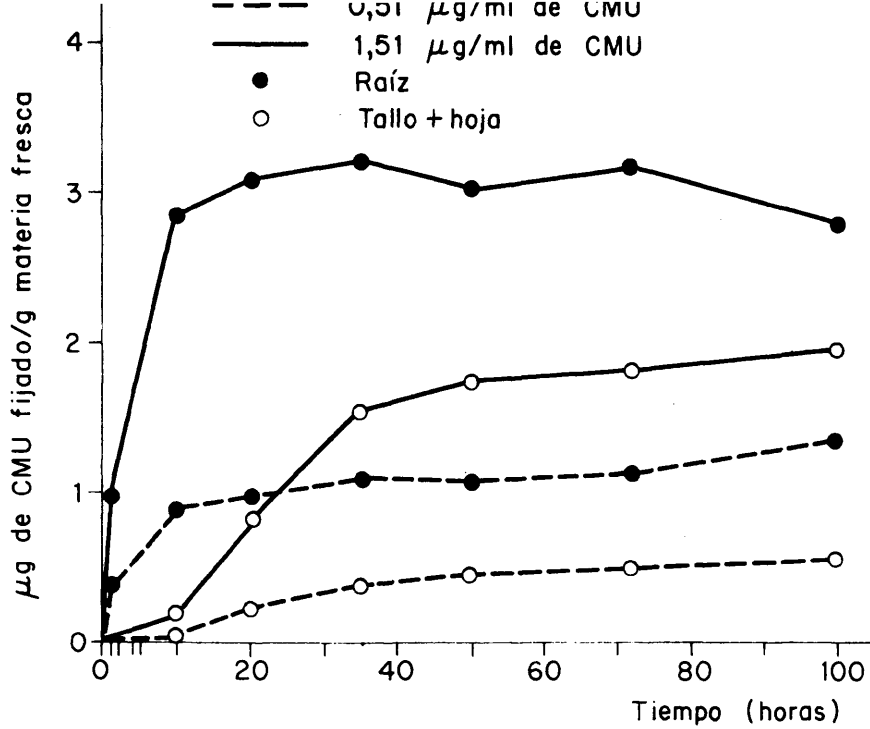


FIG. 19. — CANTIDAD DE CMU FIJADO POR LA RAIZ Y PARTES AEREAS DE CEBADA EN FUNCION DEL TIEMPO DE ABSORCION Y LA CONCENTRACION DEL HERBICIDA.

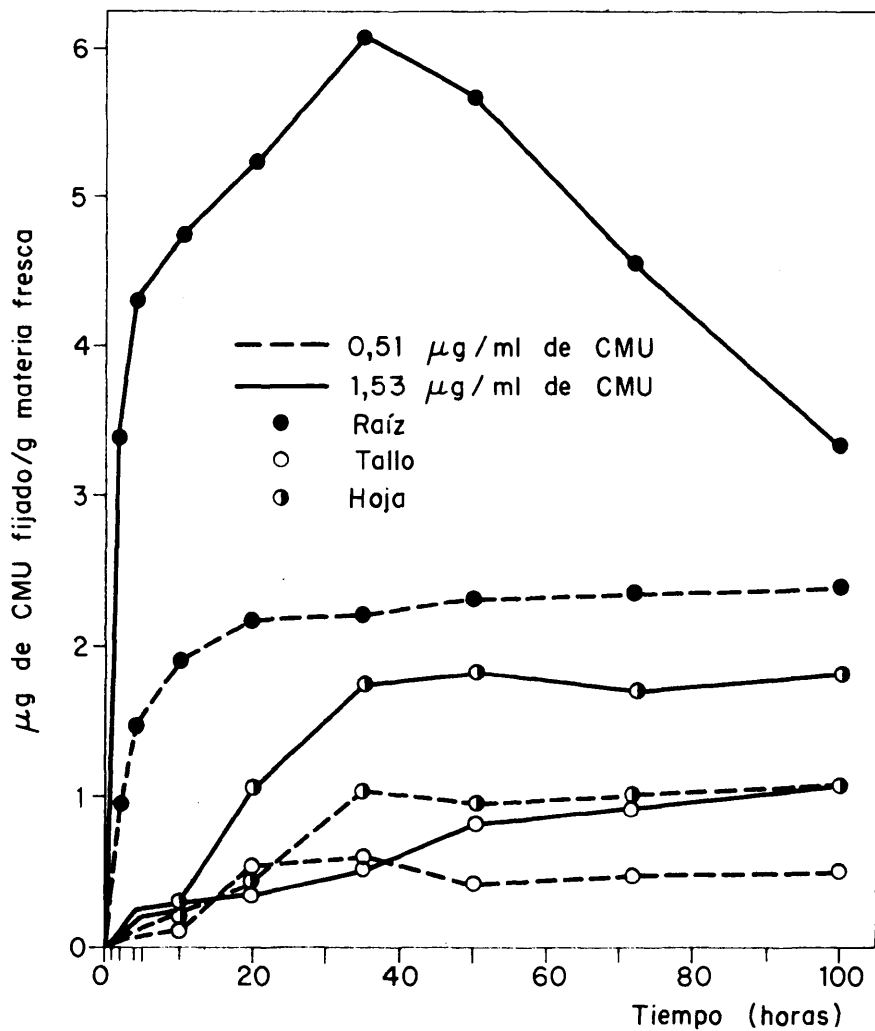


FIG. 20. — CANTIDAD DE CMU FIJADO POR LA RAIZ, TALLO Y HOJAS DE JUDIA EN FUNCION DEL TIEMPO DE ABSORCION Y LA CONCENTRACION DEL HERBICIDA.

ción nutritiva con el monurón-2-<sup>14</sup>C. El tratamiento fué análogo al recibido por las plantas, completas y se efectuaron extracciones a las 0,5; 1; 2, 4, 10 y 20 horas. Cada raíz extraída se dividió en dos partes aproximadamente iguales; una de ellas era lavada superficialmente, secada con papel de filtro, pesada y preparada para contaje en centelleo líquido; la otra parte separada, se introducía en un vaso que contenía agua destilada y se mantenía en agitación durante una hora. Durante este tiempo, la parte de herbicida absorbida pasivamente, salía por difusión, quedando solamente el herbicida que había sido absorbido activamente y que estaba ocupando el llamado espacio interno. La semirraíz extraída del agua destilada, sufría un tratamiento análogo al recibido por la otra mitad determinándose la actividad correspondiente al herbicida fijado.

Los valores obtenidos para las raíces que se contaron inmediatamente después de sacadas de la solución radiactiva, indican la absorción total de herbicida. Los valores obtenidos por las raíces que estuvieron en agua destilada después de ser sacadas de la solución radiactiva, expresan la cantidad de herbicida fijado activamente y que ocupa el llamado "espacio interno".

El valor del "espacio libre" según el concepto de Epstein (39), o mejor dicho el valor del "espacio libre aparente", según la idea actual, podría ser obtenido, para la primera hora de absorción, considerando que la concentración

que se alcanza en este espacio es igual a la de la solución. Es decir, si es  $c$  el valor de la concentración del herbicida en la solución, el valor del espacio libre será  $\frac{d}{c}$  siendo  $d$  la diferencia entre el valor obtenido para la absorción total menos el correspondiente a la absorción activa.

Para el cálculo del espacio libre aparente, deben tenerse en cuenta los valores de la absorción en la fase inicial solamente, ya que a medida que aumente la concentración en el espacio interno, se puede inducir alguna reacción reversible que haga salir moléculas de éste durante el tiempo de permanencia en agua destilada y como consecuencia nos falsearía los resultados.

La preparación de muestras para contaje en centelleo líquido se realizó según el procedimiento descrito anteriormente en (2.1.4.2.).

A partir de los valores de la actividad del C-14 obtenidos por contaje, se dedujo la cantidad de herbicida absorbido por gramo de materia fresca en las raíces aisladas.

En las tablas XXI y XXII se expresan los valores correspondientes a la absorción total y activa del herbicida, en función del tiempo y se indica también, el tanto por ciento que representa la absorción activa frente a la absorción total. En las figuras número 21 y 22 se representa gráficamente la variación del espacio interno y externo para cada planta en función del tiempo. El cálculo del espacio externo

TABLA XXI. Valores de la absorción activa y total de CMU por raíces aisladas de cebada.

Concentración de la solución	0,50 µg/ml			1,50 µg/ml				
	Tiempo (horas)	Absorción	Total µg CMU/g. raiz	A c t i v a µg CMU/g. raiz	% total	Total µg CMU/g. raiz	A c t i v a µg CMU/g. raiz	% total
0,5			0,344	0,060	17,20	0,755	0,226	29,90
1			0,511	0,081	15,80	0,877	0,256	29,10
2			0,616	0,165	26,70	1,359	0,577	42,40
4			1,094	0,268	24,40	1,914	0,884	46,10
10			1,600	0,700	43,70	3,015	1,700	56,30
20			1,750	0,963	55,00	4,121	2,526	61,30

TABLA XXII. Valores de la absorción activa y total de CMU por raíces aisladas de judía.

Concentración de la solución Absorción	0,50 µg/ml		1,50 µg/ml	
	Total µg CMU/g. raíz	A c t i v a µg CMU/g. raíz % total	Total µg CMU/g. raíz	A c t i v a µg CMU/g. raíz % total
0,5	1,104	0,113 10,20	2,088	0,149 6,70
1	1,240	0,320 25,80	2,508	0,590 23,50
2	1,379	0,472 34,20	2,926	1,176 40,10
4	1,685	0,512 30,30	3,100	1,563 50,40
10	2,053	0,755 36,70	4,553	1,885 41,40
20	2,241	1,130 50,40	4,739	2,131 44,90

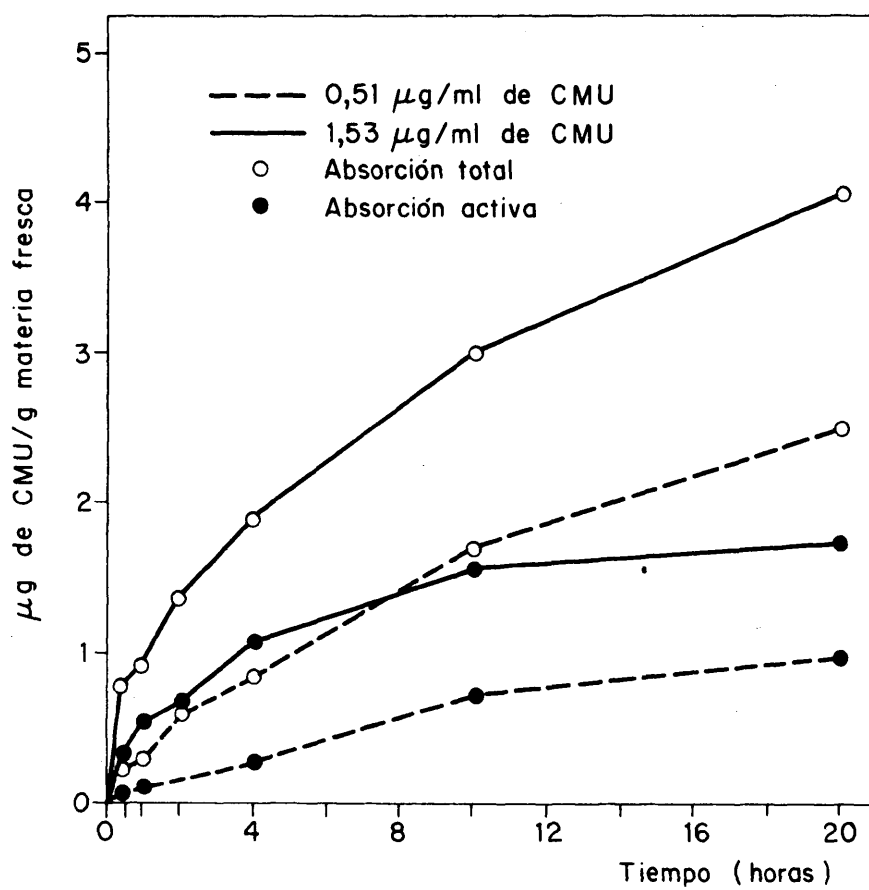


FIG. 21. — CINETICA DE LA ABSORCION ACTIVA Y TOTAL DE CMU, POR RAICES AISLADAS DE CEBADA.

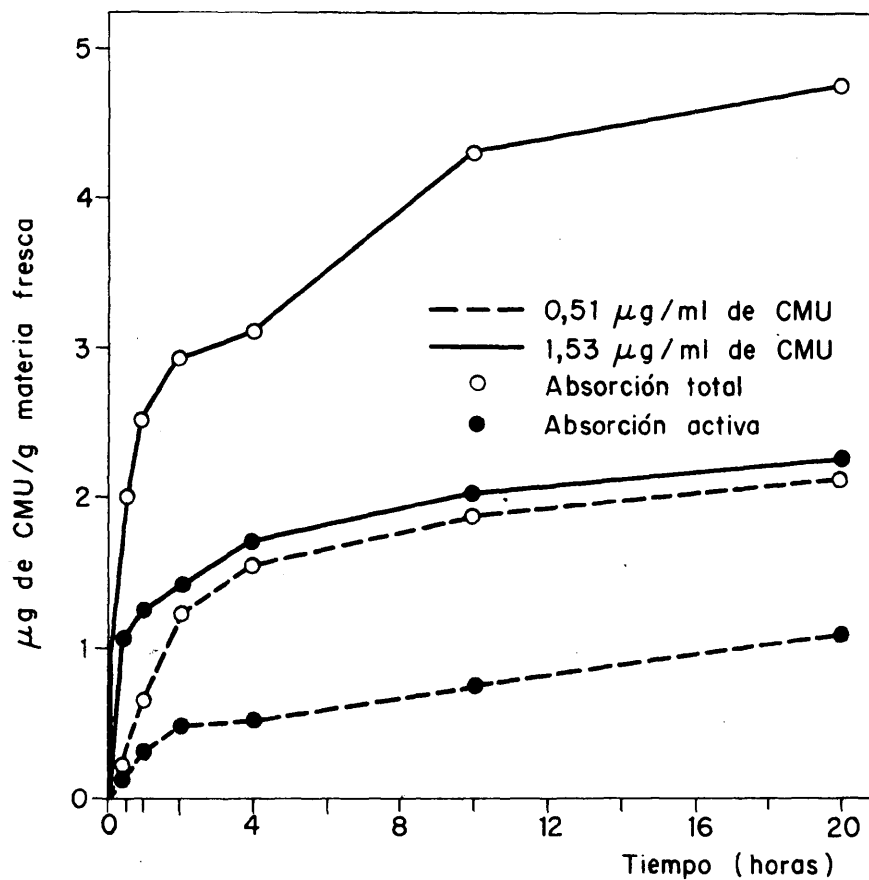


FIG. 22. — CINETICA DE LA ABSORCION ACTIVA Y TOTAL DE CMU, POR RAICES AISLADAS DE JUDIA.

para la 0,5 y 1 hora iniciales de absorción, según la dosis y planta considerados, expresado en ml/g de raíz, se indica en la tabla XXIII.

El valor medio para cada planta, se ha determinado considerando que el "espacio libre" es independiente de la concentración y del tiempo dentro de ciertos límites.

TABLA XXIII. Estimación del valor del "espacio libre aparente" para el CMU absorbido por plantas de cebada y judía.

Planta	Concentración µg/ml	Tiempo de absorción horas	Espacio libre aparente para CMU ml/g raíz
Cebada	0,5	0,5	0,557
		1	0,843
	1,5	0,5	0,346
		1	0,406
	M E D I A		
Judía	0,5	0,5	1,943
		1	1,804
	1,5	0,5	1,267
		1	1,253
	M E D I A		

### 3.3.3. Análisis macroautorradiográfico.

Para seguir la cinética de absorción en forma gráfica, se efectuaron autorradiografías de las plantas que iban siendo extraídas y contadas, pudiéndose observar la distribución del CMU entre los diferentes órganos de la planta. Las plantas se deshidrataron por el procedimiento de congelación-desección. Se utilizaron películas Kodak Royal Blue 24 x 30. El tiempo de exposición fué de 15 días, al cabo de los cuales fueron reveladas.

En las figuras número 23 y 24, se representan las autorradiografías correspondientes a las plantas con diferente tiempo de tratamiento de monurón-2-<sup>14</sup>C.

### 3.3.4. Análisis microautorradiográfico.

Para la localización del producto marcado a nivel histológico se utilizó el método microautorradiográfico, empleándose la técnica del "dipping" en secciones microtómicas de 5  $\mu$  de los órganos fotosintéticos, con objeto de localizar la zona de concentración máxima del monurón-2-<sup>14</sup>C a nivel histológico. Como ya se ha mencionado, el revelador utilizado fué el Kodak D-19 y el tiempo de exposición fué de 15 días.

En las figuras número 25, 26, 27 y 28 se representan las microautorradiografías correspondientes a los diferentes órganos de la planta.

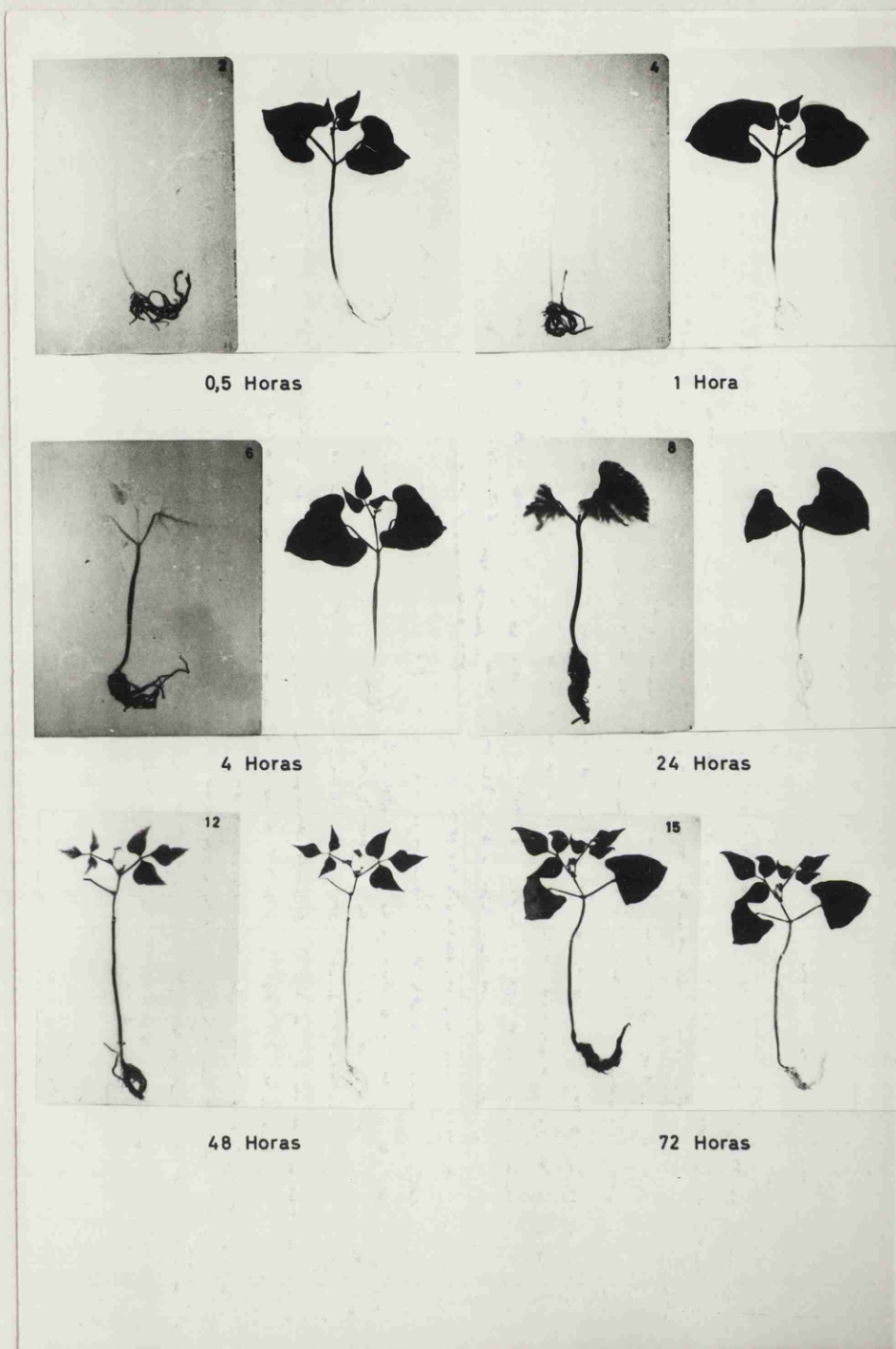


Fig. 23. - Autorradiografías que muestran la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C, en plantas de judía, a las 0,5;1;4;24;48 y 72 horas de absorción radicular. Dosis de herbicida 1,5 Kg/Ha. t<sup>a</sup> 25 °C.

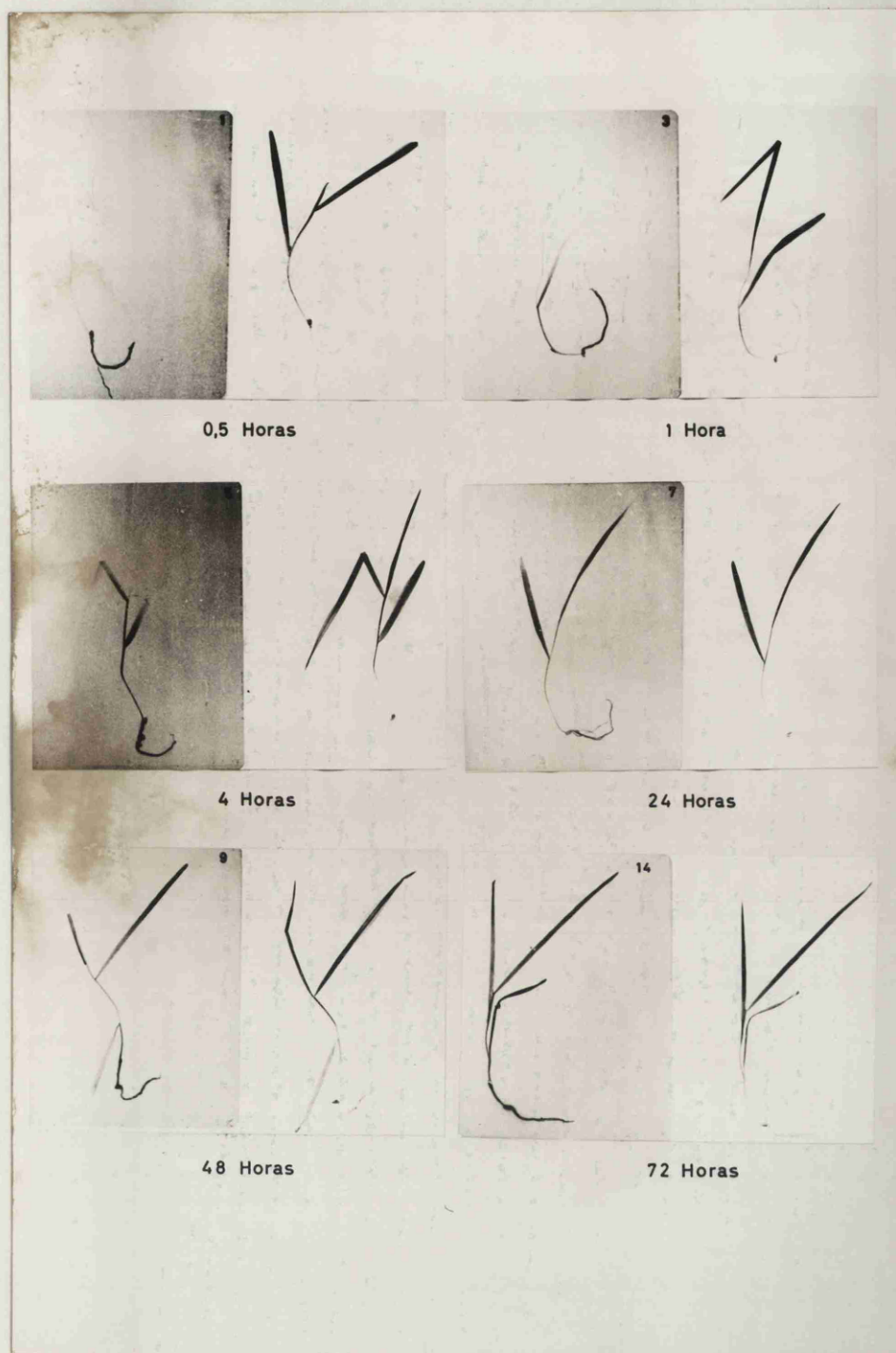


Fig. 24. - Autorradiografías que muestran la distribución de monurón-2- $^{14}\text{C}$ , en plantas de cebada, a las 0,5;1;4;24;48 y 72 horas de absorción radicular. Dosis de herbicida 1,5 Kg/Ha.  $t^a$  25  $^{\circ}\text{C}$ .

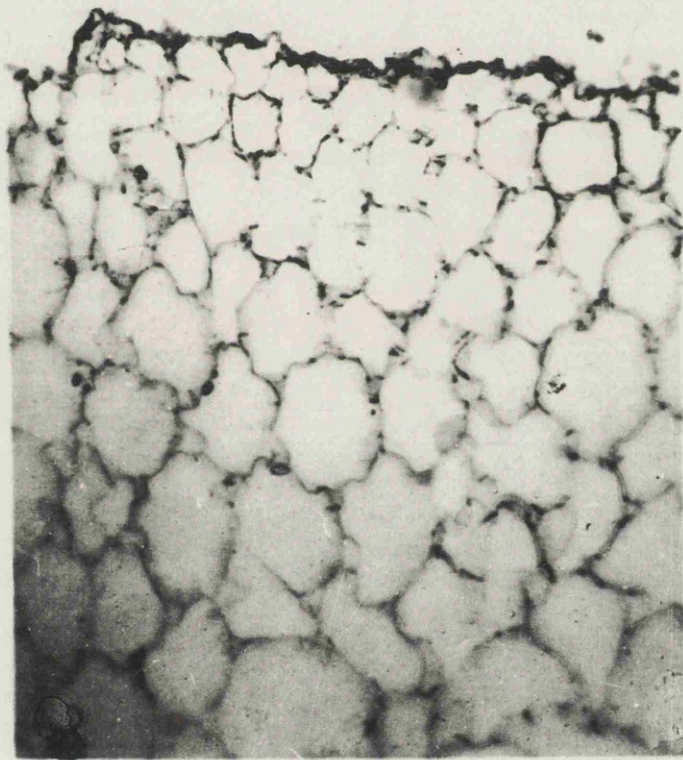


Fig. 25.- Detalle de la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C  
en raíz de judía. Microautorradiografía de  
sección transversal.

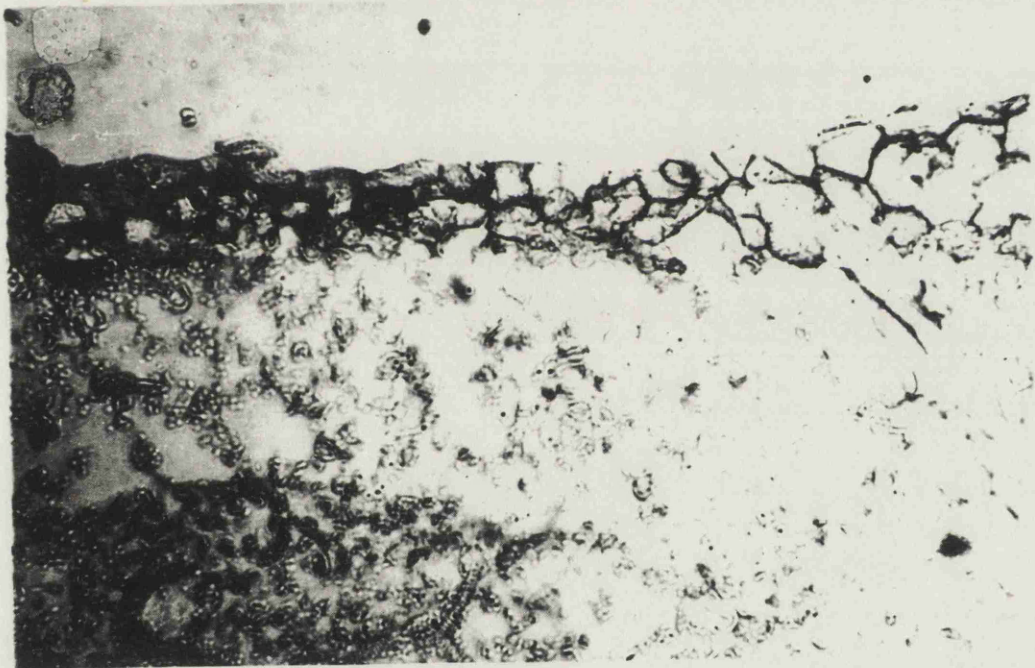


Fig. 26.- Microautorradiografía que muestra la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C en hojas de judía. Sección transversal.

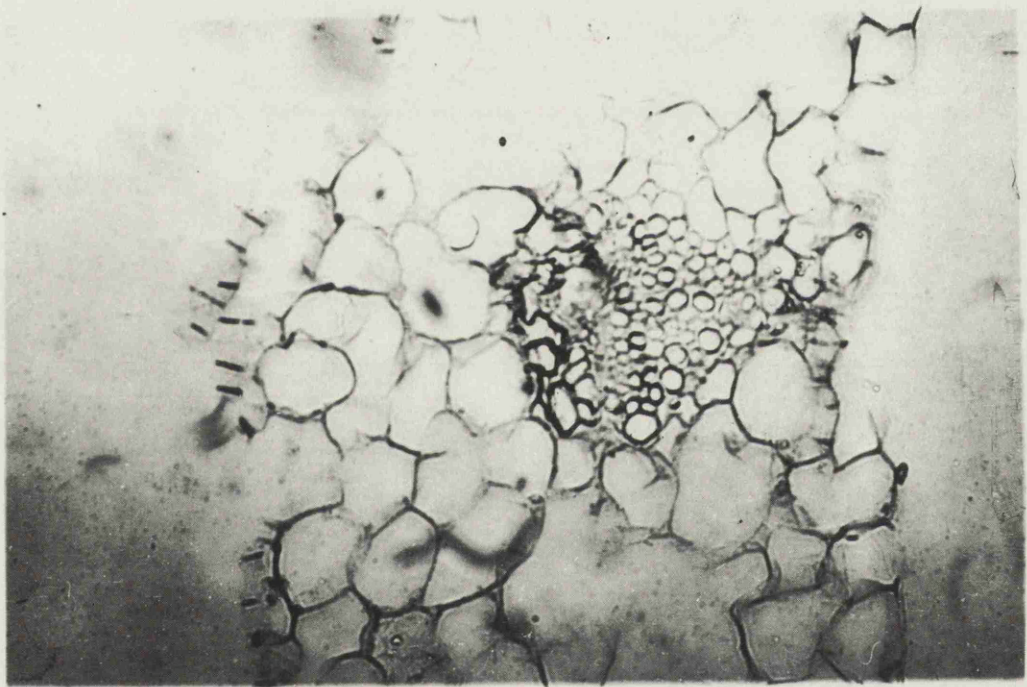


Fig. 27.- Microautorradiografía que muestra la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C en sección transversal de hojas de cebada.



Fig. 28.- Microautorradiografía que muestra la localización del monurón-2- $^{14}\text{C}$  en la zona epidérmica del tallo de judía. Sección longitudinal.

3.3.5. Determinación de la viabilidad de las plantas de judía y cebada tratadas con CMU y cálculo de la concentración de éste en el jugo celular de los órganos fotosintéticos.

Considerando que la dosis de aplicación del monurón en el campo, varía desde 0,5 Kg/Ha., para aplicaciones muy selectivas, hasta 20 y 30 Kg/Ha. en casos de esterilización de suelos; se ha calculado la concentración que debe alcanzar el producto en la solución nutritiva, para que exista una cierta correlación entre los datos obtenidos en el laboratorio y los datos de campo. La relación Kg/Ha., con ug/ml, se calculó del modo descrito anteriormente y se emplearon también plantas de judía y cebada cultivadas en solución nutritiva. Según la dosis de monurón empleada, las características de la solución nutritiva se expresa en la tabla XXIV

TABLA XXIV. Características de las soluciones nutritivas empleadas según las dosis de CMU-2-<sup>14</sup>C.

Concentración del CMU en la solución nutritiva		Concentración Radiactiva (uCi/ml)	Actividad específica	
(ug/ml)	(M)		(uCi/mg)	(mCi/mM)
0,5	$2,5 \times 10^{-9}$	$1,06 \times 10^{-2}$	22,65	4,53
1,5	$7,5 \times 10^{-9}$	$3,18 \times 10^{-2}$	22,65	4,53
3	$1,5 \times 10^{-8}$	$3,18 \times 10^{-2}$	11,33	2,26
9	$4,5 \times 10^{-8}$	$3,18 \times 10^{-2}$	3,77	0,75
15	$7,5 \times 10^{-8}$	$3,18 \times 10^{-2}$	2,26	0,45
30	$1,5 \times 10^{-7}$	$3,18 \times 10^{-2}$	1,13	0,226

Las plantas estuvieron en la solución nutritiva con CMU durante una semana en las condiciones de iluminación, temperatura y humedad relativa descritas anteriormente.

Al cabo de una semana se anotaron los efectos observados en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en cuanto a su viabilidad o daño aparente.

Cada tratamiento comprendía 15 plantas. La actividad del CMU contenida en las hojas, se determinó mediante contaje en centelleo líquido y de este dato, se dedujo la concentración que existía en el jugo celular de los órganos fotosintéticos. También se efectuó radiocromatografía de la solución extractada de los diferentes órganos de la planta con objeto de determinar el % de actividad que correspondía al monurón- $2-^{14}\text{C}$  no degradado. La cromatografía se realizó en placas de gel de sílice Camag DS-A, utilizando como eluyente la mezcla Nitrometano-cloroformo, 1:1 (V:V), durante un tiempo de desarrollo de 2 horas. El revelado se efectuó mediante autorradiografía.

El % de actividad correspondiente al CMU respecto a la actividad total detectada en el jugo celular se obtuvo por contaje de los diferentes puntos de actividad de la placa, en centelleo líquido. El orden de magnitud para el CMU sin degradar, fué de  $90 \pm 5\%$ .

La concentración de CMU- $2-^{14}\text{C}$  en el jugo celular de las hojas, se obtuvo considerandolo como el cociente de la

cantidad de CMU detectada y el contenido acuoso de la muestra medida.

La cantidad de CMU detectada se obtiene según la fórmula:

$$M_H = \frac{\text{d.p.m.} \cdot V \cdot C}{2,72 \times 10^6 \times \text{As}} = \frac{\text{d.p.m.} \times 300 \times 0,9}{2,22 \times 10^6 \times \text{As}} =$$
$$= 1,2 \times 10^{-4} \frac{\text{d.p.m.}}{\text{As}}$$

Siendo:

$M_H$  = cantidad de CMU expresada en micromoles.

d.p.m. = desintegraciones por minuto obtenidas al dividir las cuentas por minuto corregidas, entre la eficacia de conteo determinada por extandarización externa.

V = 300; factor de volumen que procede de tomar para el conteo 10 lambdas de los 3 ml que se utilizan para la extracción.

C = 0,9; equivale al % de CMU sin degradar, detectado por cromatografía.

As = Actividad específica de cada solución de CMU-2-<sup>14</sup>C expresada en  $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$ . Si As se expresa en  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ,  $M_H$  vendrá expresado en mg.

En las tablas XXV y XXVI se expresa la concentración molar alcanzada por el CMU en la fase acuosa de la hoja, la relación molar CMU/clorofila y el estado general de la planta después del período de absorción.

TABLA XXV. Concentración de CMU en hojas de Cebada después de 7 días de absorción radicular. Concentración de clorofila referida al volumen acuoso  $9,5 \times 10^{-5}$  mM/ml.

Concentración de CMU en solución nutritiva ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>¶</sup>	Concentración de CMU (M)	Estado de la planta	Peso fresco de la hoja (g)	Cantidad de agua (ml)	Cantidad de CMU ( $\mu\text{g}$ )	Concentración molar del CMU en la fase acuosa de la hoja (M)	Relación molar CMU/clorf.
0,5	$2,5 \times 10^{-9}$	Normal	0,2222	0,2067	0,10	$2,37 \times 10^{-6}$	0,025
1,5	$7,5 \times 10^{-9}$	Normal	0,3521	0,3276	0,21	$3,22 \times 10^{-6}$	0,034
3	$1,5 \times 10^{-8}$	Alguna diferencia	0,2569	0,2390	0,72	$1,50 \times 10^{-5}$	0,158
9	$4,5 \times 10^{-8}$	Muy deficiente	0,4278	0,3979	3,9	$4,90 \times 10^{-5}$	0,516
15	$7,5 \times 10^{-8}$	Muerta al 4º día	0,4726	0,4396	5,1	$5,80 \times 10^{-5}$	0,611
30	$1,5 \times 10^{-7}$	Muerta al 4º día	0,2915	0,2711	3,4	$6,27 \times 10^{-5}$	0,66

¶ Según consideraciones teóricas, la concentración expresada en  $\mu\text{g/ml}$  corresponde a dosis de campo expresadas en Kg/Ha, considerando que el producto esté repartido homogéneamente en los 20 primeros centímetros de profundidad de un suelo que se encuentra a la capacidad de campo, siendo esta de un 50%.

TABLA XXVI. Concentración de CMU en las hojas de judfa después de 7 días de absorción radicular. Concentración de clorofila referida al volumen acuoso  $4,7 \times 10^{-4}$  mM/ml.

Concentración de CMU en solución nutritiva (µg/ml) <sup>#</sup>	Concentración de CMU (M)	Estado de la planta	Peso fresco de la hoja (g)	Cantidad de agua (ml)	Cantidad de CMU (µg)	Concentración molar del CMU en la fase acuosa de la hoja (M)	Relación molar CMU/clorof.
0,5	$2,5 \times 10^{-9}$	Normal	0,2851	0,2500	0,18	$3,60 \times 10^{-6}$	0,007
1,5	$7,5 \times 10^{-9}$	Alguna deficiencia	0,2451	0,2150	1,29	$3,00 \times 10^{-5}$	0,064
3	$1,5 \times 10^{-8}$	Muertas al 6º día	0,3286	0,2882	5,88	$1,02 \times 10^{-4}$	0,217
9	$4,5 \times 10^{-8}$	Muertas al 4º día	0,2361	0,2071	4,35	$1,05 \times 10^{-4}$	0,223
15	$7,5 \times 10^{-8}$	Muertas al 3 días	0,1583	0,1388	1,25	$4,5 \times 10^{-5}$	0,096
30	$1,5 \times 10^{-7}$	Muertas al 2º día	0,3392	0,2974	1,41	$2,37 \times 10^{-5}$	0,051

<sup>#</sup> Según consideraciones teóricas, la concentración expresada en µg/ml corresponde a dosis de campo expresadas en Kg/Ha, considerando que el producto esté repartido homogéneamente en los 20 primeros centímetros de profundidad de un suelo que se encuentra a la capacidad de campo, siendo esta de un 50%.

### 3.4. ABSORCION FOLIAR.

Con objeto de estudiar la absorción foliar del monurón en plantas de judía y cebada, se depositaron cuidadosamente con microjeringa 0,2 ml de una solución acuosa de monurón-2-<sup>14</sup>C de 30 µg/ml, distribuidos en gotas sobre el haz de una de las hojas de cada planta.

Se estudió el efecto de la temperatura y la iluminación sobre la traslocación de este herbicida después de la aplicación foliar. La experiencia se realizó en cámaras de ambiente controlado a temperaturas de 5, 15 y 25°C durante períodos de tratamiento de 24, 48 y 72 horas. Este estudio se realizó con iluminación continua y constante de 6500 lux y en oscuridad completa.

Después de cada período de absorción, las plantas se fijaron por congelación, se desecaron al vacío y se expusieron en una placa de autorradiografía.

Después de revelado el autorradiograma, se determinó la actividad de estas plantas, midiendo en centelleo líquido una muestra de las hojas no tratadas, otra de tallo y otra de raíz en cada planta.

En las tablas XXVII y XXVIII se expresan los resultados medios obtenidos para ambas plantas, judía y cebada, iluminadas y sin iluminar en los diferentes períodos de tiempo y a las distintas temperaturas. Los resultados se expresan en % de traslocación con respecto a la actividad original depositada en la hoja tratada.

TABLA XXVII. Absorción foliar en hojas de cebada y judía tratadas con 6  $\mu$ g de CMU-2- $^{14}$ C. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Plantas mantenidas en iluminación continua. Los valores expresan el % de CMU traslocado con respecto al total depositado.

Temperatura (°C)		5°			15°			25°		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72
Especie	Tiempo de exposición. (Horas)									
	Cebada	Hoja <sup>⊛</sup>	1,98	2,68	3,73	2,45	3,96	5,36	2,80	3,85
Tallo		2,46	2,20	3,38	4,30	4,81	6,63	5,06	4,95	6,38
Raiz		-	-	0,21	-	-	0,28	0,16	0,26	0,40
Actividad total traslocada.		4,45	4,88	7,32	6,75	8,78	12,11	8,03	9,06	12,83
Judía	Hoja <sup>⊛</sup>	0,86	2,06	2,25	1,36	7,50	10,80	9,16	9,84	10,83
	Tallo <sup>⊛⊛</sup>	-	-	1,61	-	1,08	3,91	0,51	1,31	4,40
	Tallo <sup>⊛⊛⊛</sup>	-	-	-	-	0,18	0,35	0,30	0,25	0,45
	Raiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Actividad total traslocada	0,86	2,06	3,86	1,36	8,76	15,06	10,97	11,38	15,68

⊛ Hoja no tratada

⊛⊛ Mitad superior del tallo, 5 cm.

⊛⊛⊛ Mitad inferior del tallo, 5 cm.

TABLA XXVIII. Absorción foliar en hojas de cebada y judía tratadas con 6  $\mu\text{g}$  de CMU-2- $^{14}\text{C}$ . Actividad depositada 0,13  $\mu\text{Ci}$ . Plantas mantenidas en obscuridad completa a lo largo de la experiencia. Los valores expresan el % de CMU traslocado con respecto al total depositado.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) Tiempo de exposición (horas)		5 $^{\circ}$			15 $^{\circ}$			25 $^{\circ}$		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72
Cebada	Hoja <sup>##</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15
	Tallo	-	0,81	0,71	1,03	1,3	1,16	0,96	1,06	1,43
	Raiz	-	-	-	-	0,15	0,20	-	0,2	0,22
	Actividad total traslocada.	-	0,81	0,71	1,03	1,45	1,36	0,96	1,26	1,66
Judía	Hoja <sup>##</sup>	-	-	0,75	-	0,90	1,78	-	1,78	1,58
	Tallo <sup>###</sup>	-	-	-	-	0,65	1,61	-	1,38	1,55
	Tallo <sup>####</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Actividad total traslocada.	-	-	0,75	-	1,61	3,40	-	3,05	3,13

<sup>##</sup> Hoja no tratada

<sup>###</sup> Mitad superior del tallo, 5 cm.

<sup>####</sup> Mitad inferior del tallo, 5 cm.

En las figuras números 29, 30 y 31 se representan los autorradiogramas correspondientes a las plantas mantenidas en iluminación continua para las temperaturas y períodos de tiempo mencionados.

La figura número 32 representa los autorradiogramas de las plantas mantenidas a 25°C sin iluminar después del tratamiento.

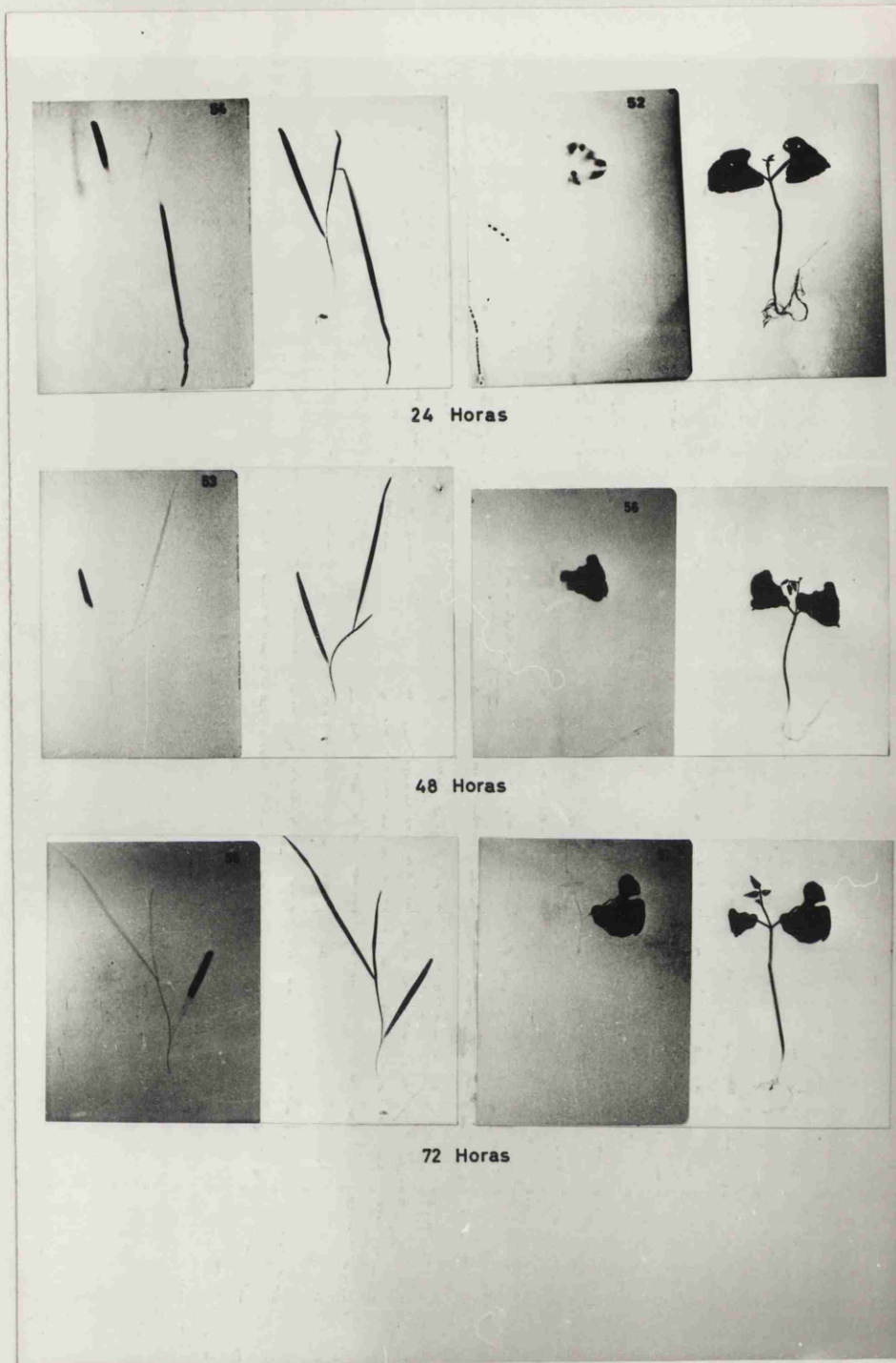


Fig. 29. - Autorradiografías que muestran la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Temperatura durante la experiencia 5°C. Plantas iluminadas con 6.500 lux.

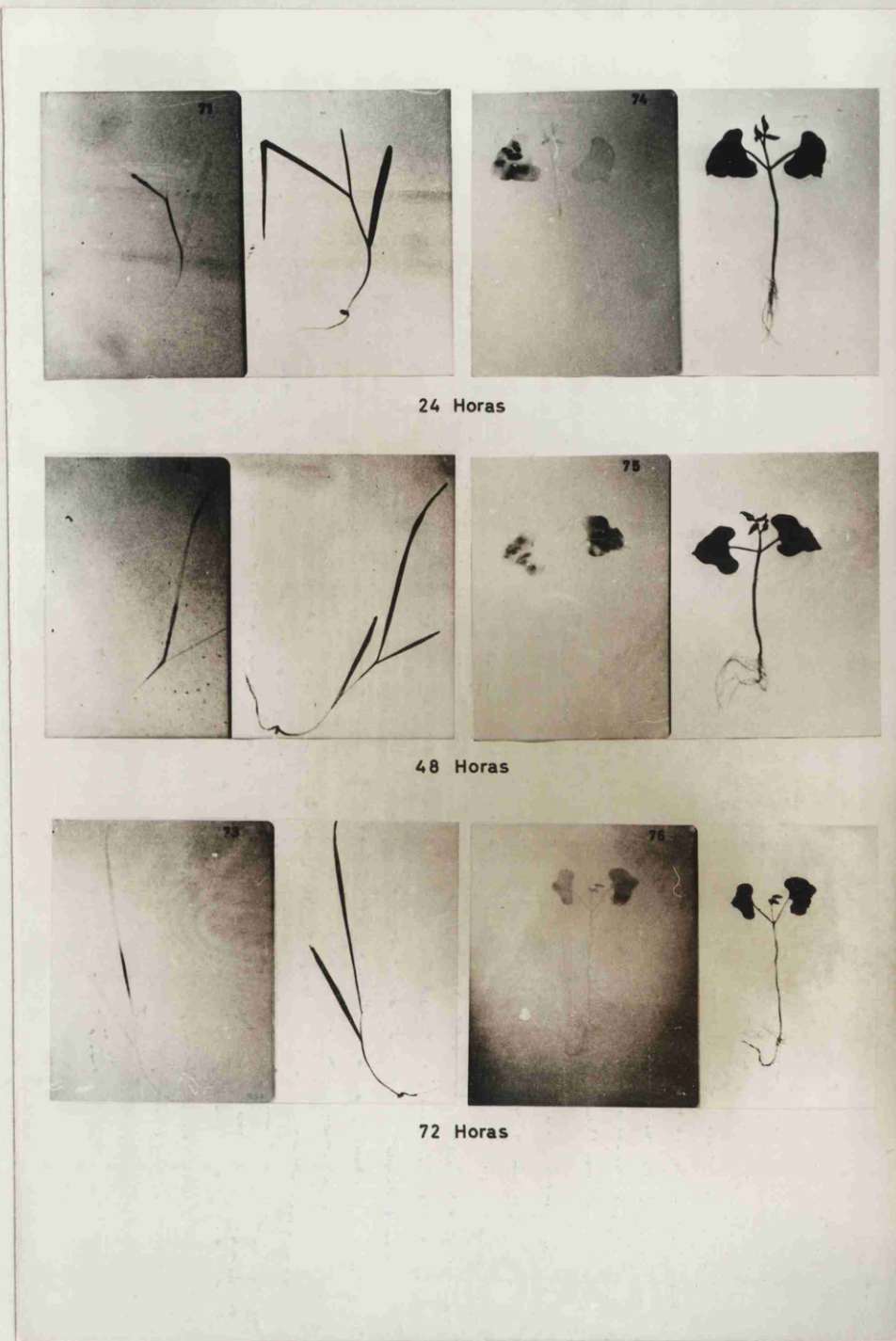


Fig. 30. - Autorradiografías que muestran la distribución del monurón-2- $^{14}\text{C}$  en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu\text{Ci}$ . Temperatura durante la experiencia  $15^{\circ}\text{C}$ . Plantas iluminadas con 6.500 lux.

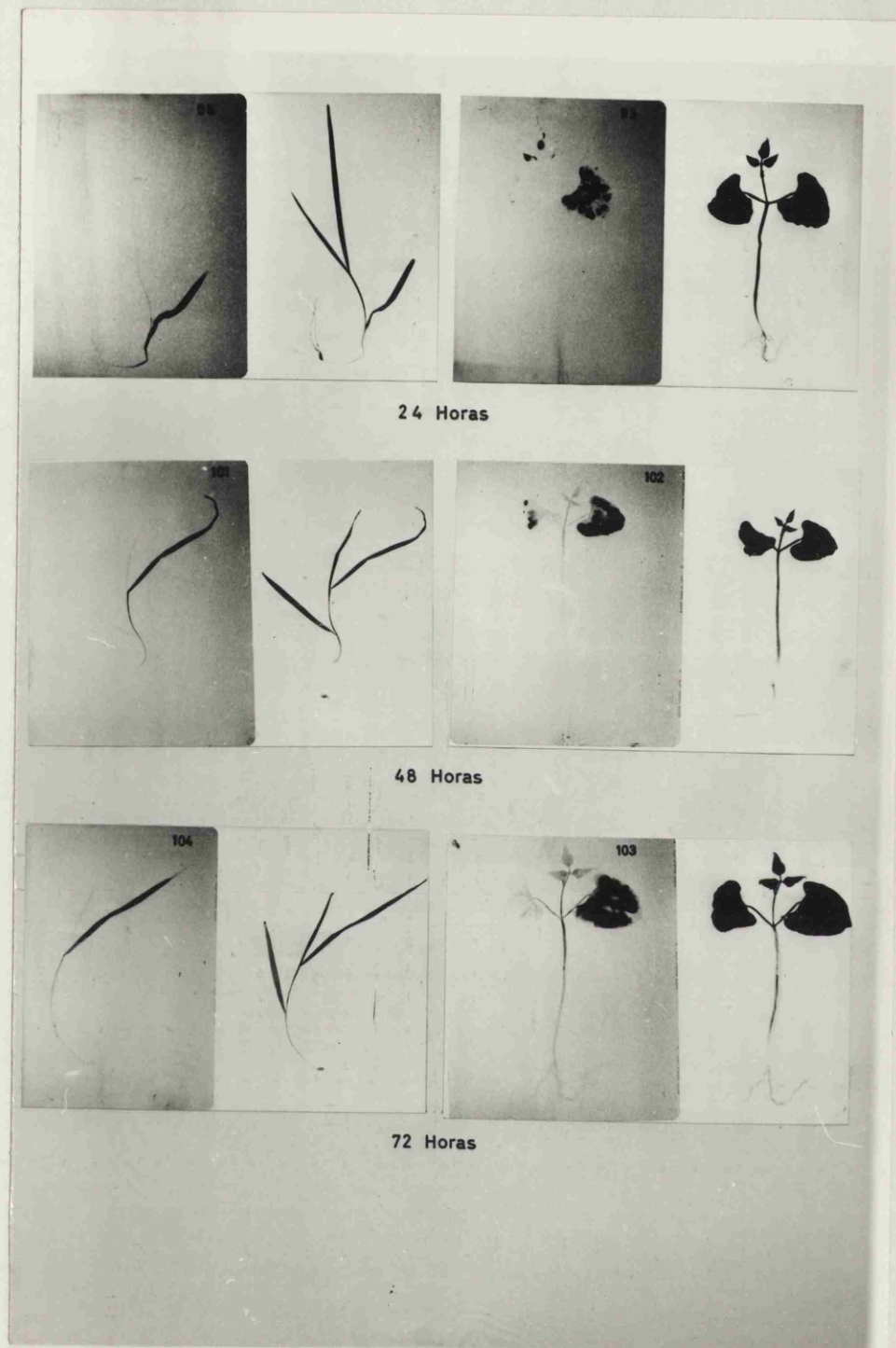


Fig. 31. - Autorradiografías que muestran la distribución del monurón-2- $^{14}\text{C}$  en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada  $0,13 \mu\text{Ci}$ . Temperatura durante la experiencia  $25^{\circ}\text{C}$ . Plantas iluminadas con  $6.500 \text{ lux}$ .

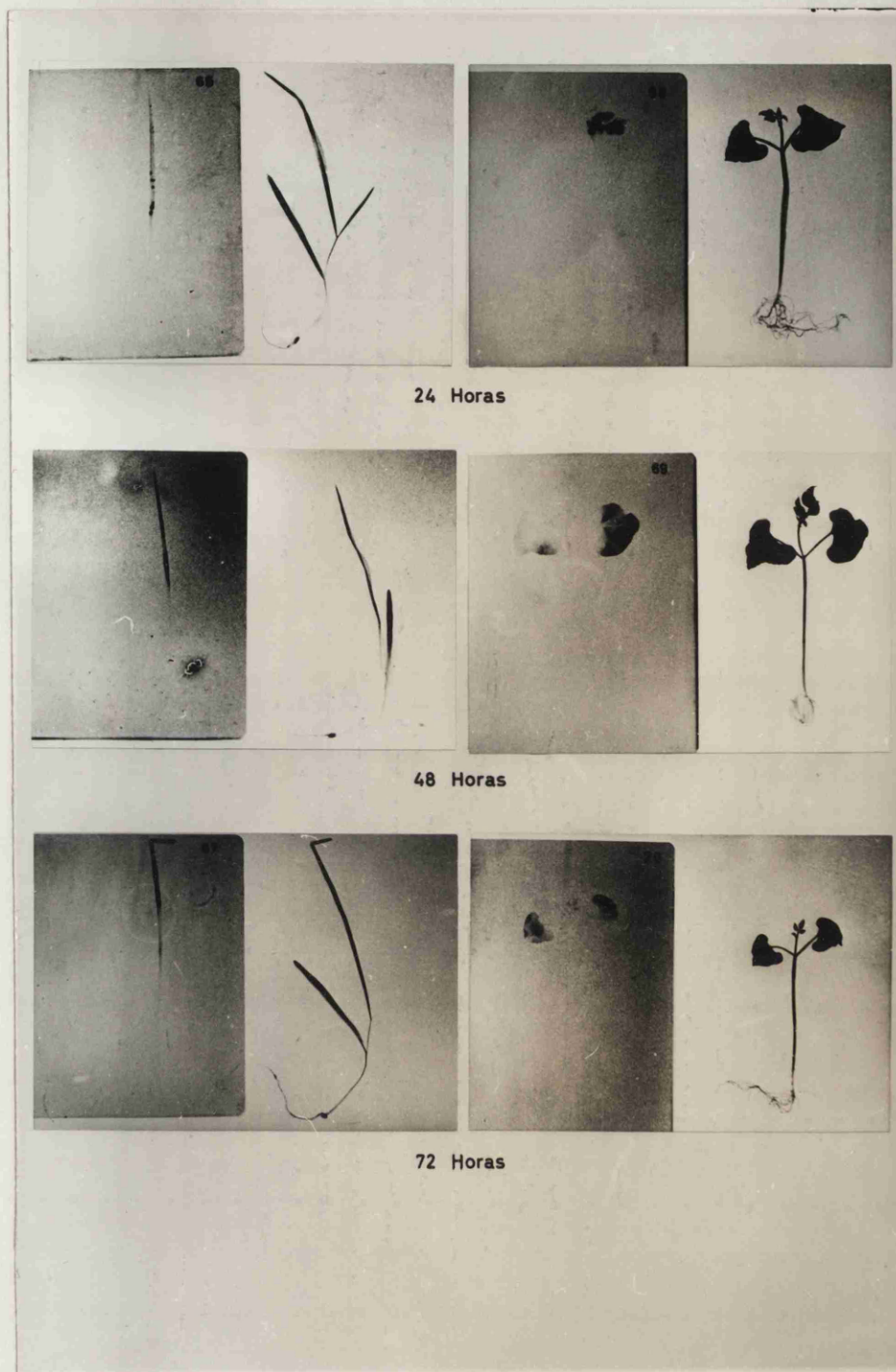


Fig. 32. - Autorradiografías que muestran la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Temperatura durante la experiencia 25 °C. Plantas mantenidas en la obscuridad.

### 3.5. COMPORTAMIENTO DEL MONURON EN EL SUELO.

Se eligieron cuatro suelos cuyas características se expresan en la tabla XXIX.

El suelo I procede de Santa-Olalla (Toledo), es de textura "franco-arenosa", su contenido en materia orgánica y nitrógeno total son normales. Es de destacar la baja proporción de  $P_2O_5$  (expresado como fracción asimilable en Kg/Ha hasta 20 cm de profundidad).

El suelo II es de la misma procedencia que el anterior, siendo las características y texturas similares. El contenido en materia orgánica es muy alto debido a que este suelo había sido estercolado abundantemente en años anteriores.

El suelo III es de textura "arena franca", procede de la Ciudad Universitaria de Madrid, su contenido en materia orgánica es muy bajo, por lo que en la tabla XXIX no se ha reflejado la relación C/N debido a la poca garantía que merecen los valores de ambos elementos; la proporción de  $P_2O_5$  es normal. Este suelo es ligeramente básico.

El suelo IV es de textura "franco muy arcillosa", con contenido en Ca, (fracción asimilable en Kg/Ha hasta 20 cm de profundidad), bastante elevada, por lo que podría ser tóxico para algunas especies de plantas. Este suelo fué tomado en Tierra de Barros (Badajoz).

TABLA XXIX. Análisis de suelos

Tipo de análisis	Suelo I	Suelo II	Suelo III	Suelo IV
<u>Mecánico</u> *				
Arena Gruesa (2-0,2 mm)	31,5%	30,8%	55,95%	13,54%
Arena Fina (0,2-0,02 mm)	29,9%	39,2%	19,30%	30,46%
Limo (0,02-0,002 mm)	24,04%	19,04%	13,25%	30,00%
Arcilla (Inf. a 0,002 mm)	14,04%	11,04%	11,50%	26,00%
Textura:	Franco Arenosa	Franco Arenosa	Arena Franca	Franco muy Arcilloso
<u>Quimico-Fisico</u>				
pH (ClK)	6,60	6,55	7,40	7,30
pH (H <sub>2</sub> O)	7,40	7,35	8,10	7,95
<u>Quimico</u>				
Materia orgánica**	1,14	2,24	0,24	1,07
N**	0,054	0,085	0,029	0,062
C**	0,66	1,30	0,14	0,62
CO <sub>3</sub> Ca***	<1	-	<1	<1
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ***	141	105	480	300
K <sub>2</sub> O***	930	855	240	1.230
Ca***	10.800	6.950	12.900	18.600
Mg***	1.200	450	1.493	2.415
C/N	12,2	15,2	-	10

\* Se ha seguido el criterio, Internacional, basado en la clasificación de Atterberg (115)

\*\* Contenido total %

\*\*\* Fracción asimilable Kg/Ka. (hasta 20 cm de profundidad)

3.5.1. Estudio del movimiento vertical del monurón en función de las diferentes dosis de riego.

Suponiendo que la zona de influencia de las raíces de las plantas de cebada y judía, comprende los 20 primeros centímetros de profundidad aproximadamente, se ha pensado limitar a ésta el estudio de la emigración vertical del monurón como consecuencia de las diferentes dosis de riego.

Con este objeto se construyó una batería de columnas de policloruro de vinilo de 6,6 cm de diámetro interior y 30 cm de altura. Estas columnas estaban seccionadas por la mitad en forma de media caña, unidas herméticamente con masilla y cerradas por un extremo con papel de filtro y malla plástica, con objeto de sujetar el suelo y permitir el drenaje del agua. Las columnas se llenaron con suelo hasta una altura de 22 cm con un volumen de 752,4 cm<sup>3</sup>. Las dosis de riego empleadas fueron de 15, 30 y 60 mm, realizando dos repeticiones por dosis.

Las columnas se sometieron a vibración constante durante una hora para homogenizar y apelmazar el suelo de manera uniforme en todas. A continuación se les dió un riego de 500 ml de agua y se dejó percolar durante 24 horas, midiendo el agua recogida para poder determinar la humedad correspondiente a la capacidad de campo. En la tabla XXX se indican los valores medios obtenidos para los diferentes suelos, expresándose la capacidad de campo en ml de agua por 100 gr. de tierra.

TABLA XXX. Capacidad de campo para los diferentes suelos.

Suelo	Peso	Densidad	ml de agua retenida	Capacidad de campo.
I	1150	1,52	487	42,34
II	1010	1,34	412	41,78
III	1950	1,26	306,85	32,30
IV	1030	1,39	470	45,63

Después que los suelos alcanzaron su capacidad de campo, se añadieron 5 ml de una solución alcohólica de monurón- $^{14}\text{C}$  con actividad de 22  $\mu\text{Ci/ml}$ , distribuyéndose homogéneamente por la superficie.

Para proporcionar las dosis de riego de 15, 30 y 60 mm, se añadió a las respectivas columnas 51,3; 102,6 y 205,2 ml de agua. La adición de ésta, se efectuó lentamente, con objeto de evitar una excesiva acumulación de agua sobre la superficie del suelo.

Del agua de percolación procedente de estos riegos, se tomó una muestra para determinar su actividad. Solamente se detectó, en la muestra procedente del suelo franco-arenoso para el riego de 60 mm, siendo esta actividad de 0,017  $\mu\text{Ci/ml}$ . Una vez percolada el agua de riego se dejaron secar las columnas durante 72 horas, al cabo de las cuales se seccionaron por la mitad introduciendo un hilo de nylon entre los

bordes de unión de las dos medias cañas y recorriéndolas longitudinalmente. Esta operación es importante realizarla con sumo cuidado con el fin de evitar el arrastre de partículas de tierra que alterarían la distribución de la actividad. Estas semicolumnas que mostraban el perfil del suelo, se dejaron secar durante 3 días en posición horizontal. Transcurrido este tiempo, del suelo contenido en las dos semicolumnas se tomaron muestras a diferentes profundidades (cada 2 cm), para determinar su actividad (116) y (117).

De cada muestra de suelo se tomaron 10 gr y se extrajo el CMU con etanol mediante elución en columna, recogiendo los 50 primeros mililitros de los que se tomó una alicuota para su medida en centelleo líquido. Con este método, la eficiencia de extracción de CMU en los 4 suelos empleados fué de 75% para el suelo I, 68% para el suelo II, 85% para el suelo III y 51% para el suelo IV.

Los valores del reparto en profundidad del CMU para las diferentes dosis de riego y suelos, expresados en %, se indican en las tablas XXXI, XXXII y XXXIII y se representan en las figuras 33, 34, 35 y 36.

### 3.5.2. Degradación del monurón en el suelo.

El estudio de la degradación en el suelo de este compuesto, se realizó controlando periódicamente la pérdida de actividad del monurón- $2-^{14}\text{C}$  que previamente había sido añadido a los diferentes suelos. Se incorporó 1 mCi de

TABLA XXXI. Distribución de la actividad para un riego de 15 mm <sup>⊠</sup>.

Profundidad (cm)	Suelo I	Suelo II	Suelo III	Suelo IV
2	85,72	89,35	38,20	89,36
4	8,90	6,54	21,02	4,75
6	4,50	1,74	17,64	4,02
8	0,69	1,62	9,72	1,76
10	0,17	0,41	7,50	-
12	-	0,28	4,03	-
14	-	-	1,43	-
16	-	-	0,34	-
18	-	-	-	-
20	-	-	-	-

<sup>⊠</sup> Valores expresados en %.

TABLA XXXII. Distribución de la actividad para un riego de 30 mm <sup>\*</sup>.

Profundidad (cm)	Suelo I	Suelo II	Suelo III	Suelo IV
2	58,00	47,00	23,60	41,97
4	27,00	22,77	25,00	15,29
6	6,88	14,33	23,00	19,77
8	3,24	12,83	11,00	11,8
10	3,47	1,57	5,81	5,32
12	0,09	0,73	3,94	3,28
14	-	0,13	3,85	2,51
16	-	0,11	2,40	-
18	-	0,20	0,16	-
20	-	0,23	0,014	-

<sup>\*</sup> Valores expresados en %.

TABLA XXXIII. Distribución de la actividad para un riego de 60 mm <sup>⊠</sup>.

Profundidad (cm)	Suelo I	Suelo II	Suelo III	Suelo IV
2	15,72	24,21	9,30	25,53
4	7,93	10,93	9,25	14,64
6	41,76	8,12	8,65	17,16
8	13,70	20,14	9,10	21,48
10	14,66	20,64	9,67	6,90
12	4,46	4,18	12,20	5,87
14	0,62	3,54	11,80	6,01
16	0,78	3,14	10,40	0,37
18	0,22	2,50	10	-
20	0,12	1,61	9,63	-

<sup>⊠</sup> Valores expresados en %.

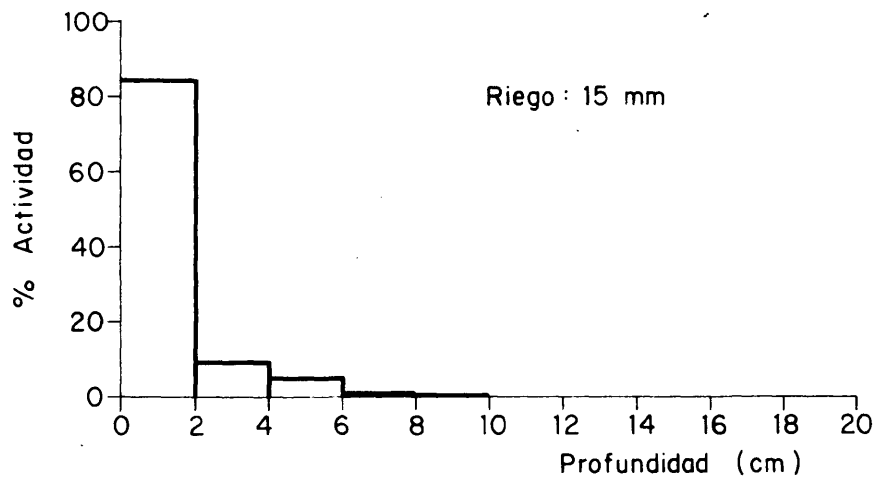
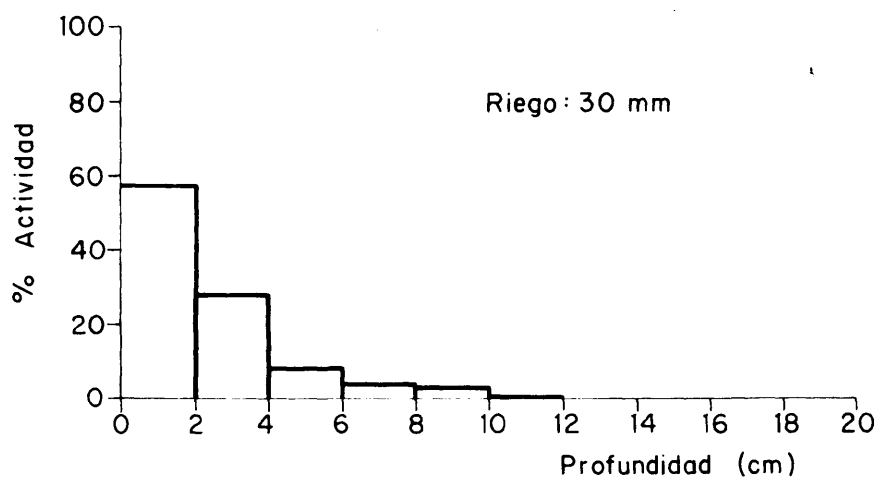
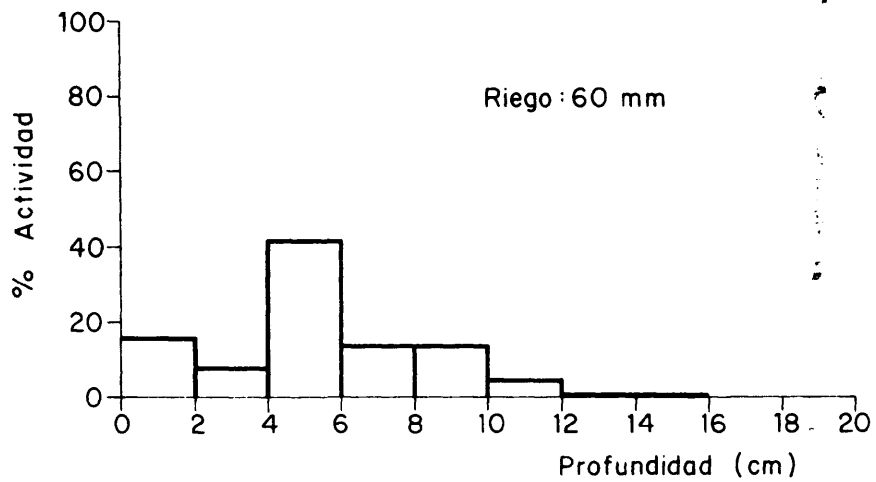


FIG. 33. — EMIGRACION VERTICAL DEL CMU EN EL SUELO I PARA LAS DIFERENTES DOSIS DE RIEGO.

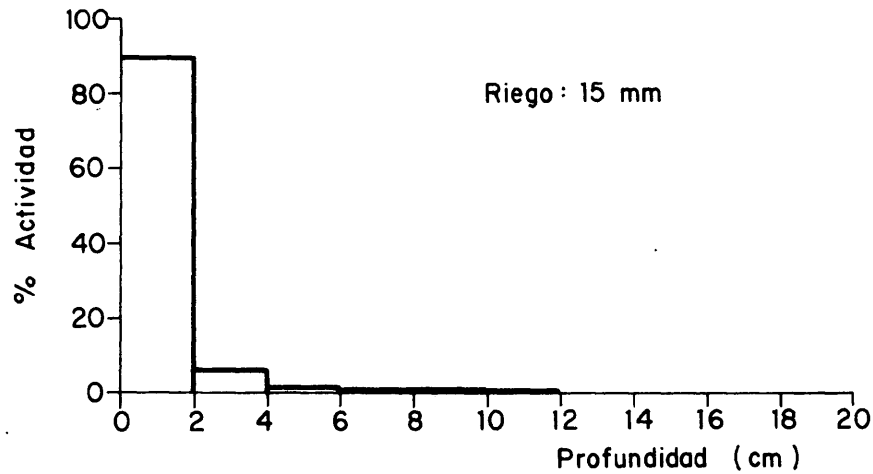
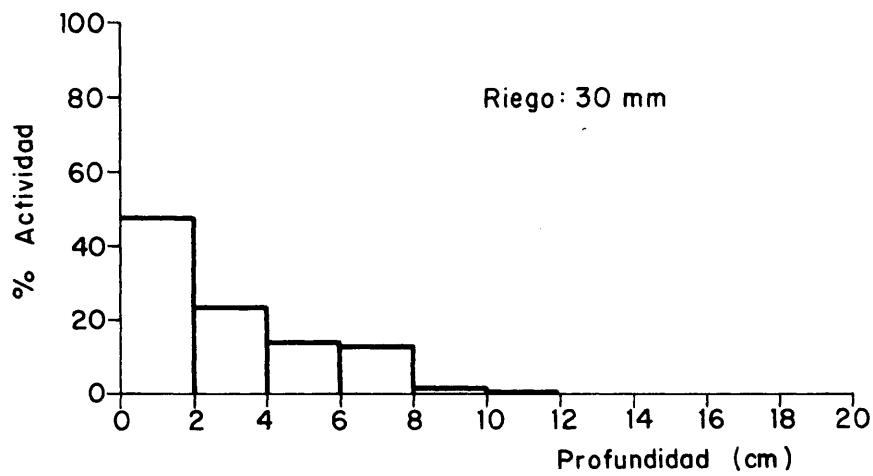
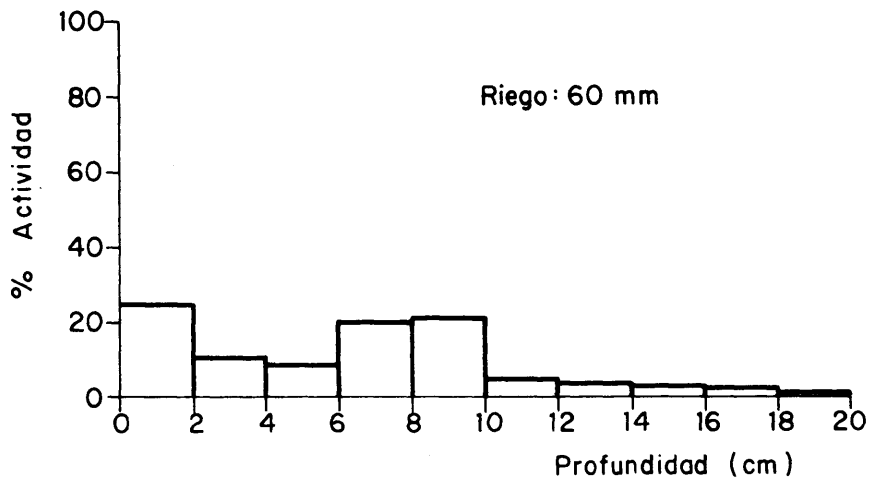


FIG. 34. — EMIGRACION VERTICAL DEL CMU EN EL SUELO II PARA LAS DIFERENTES DOSIS DE RIEGO.

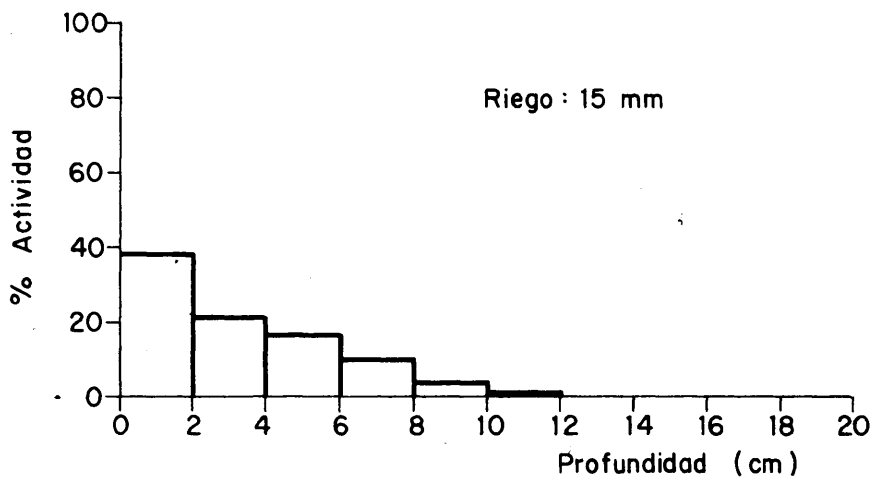
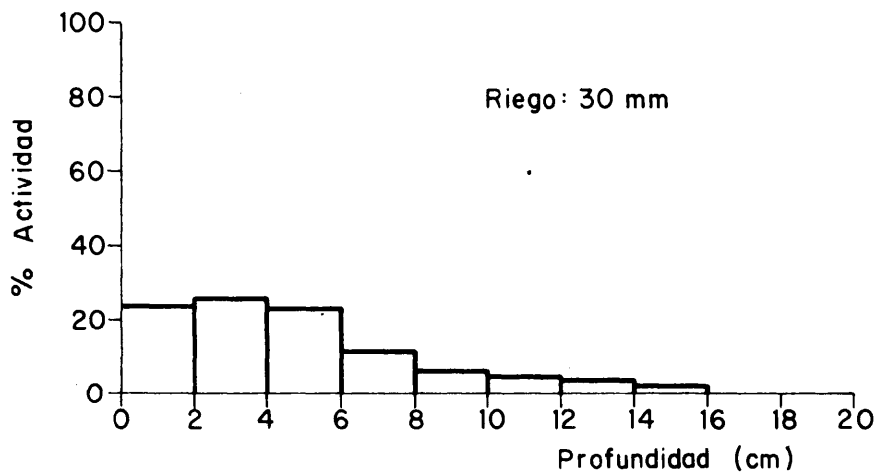
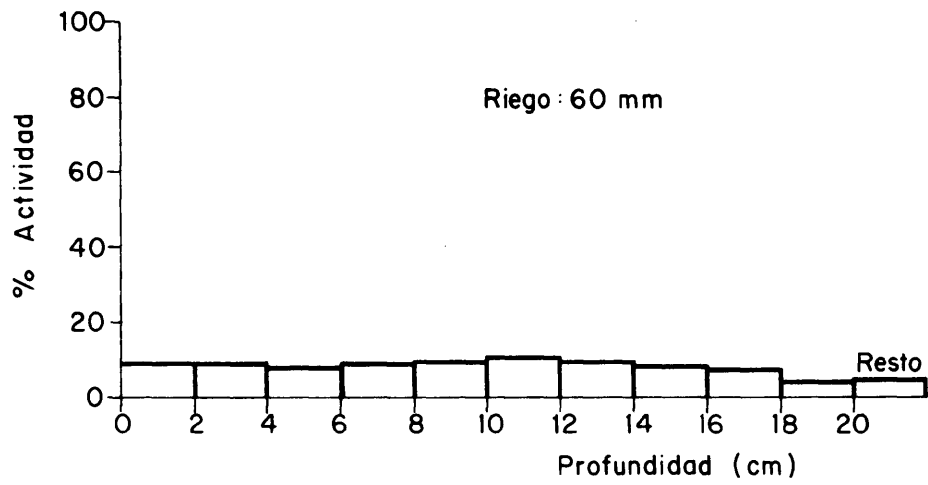


FIG. 35. — EMIGRACION VERTICAL DEL CMU EN EL SUELO III PARA LAS DIFERENTES DOSIS DE RIEGO.

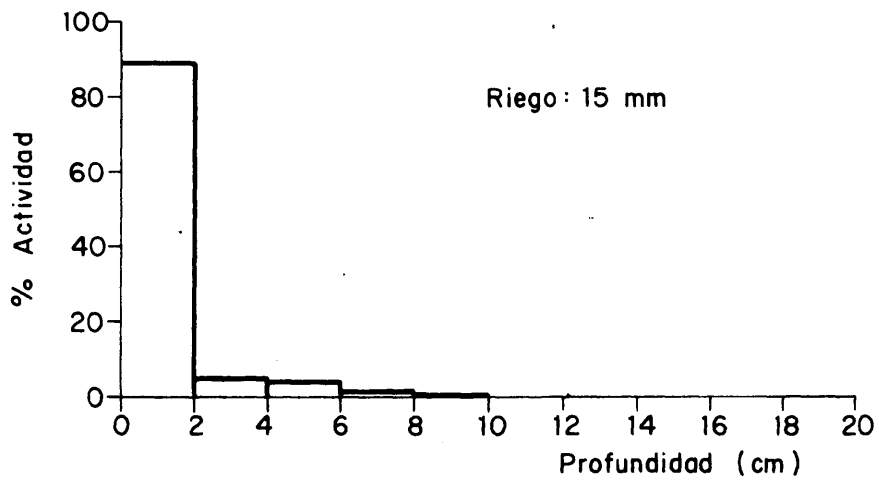
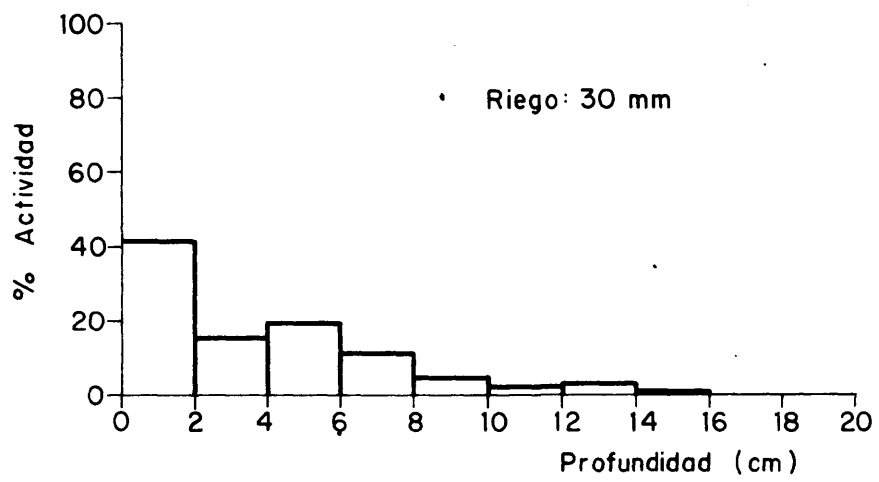
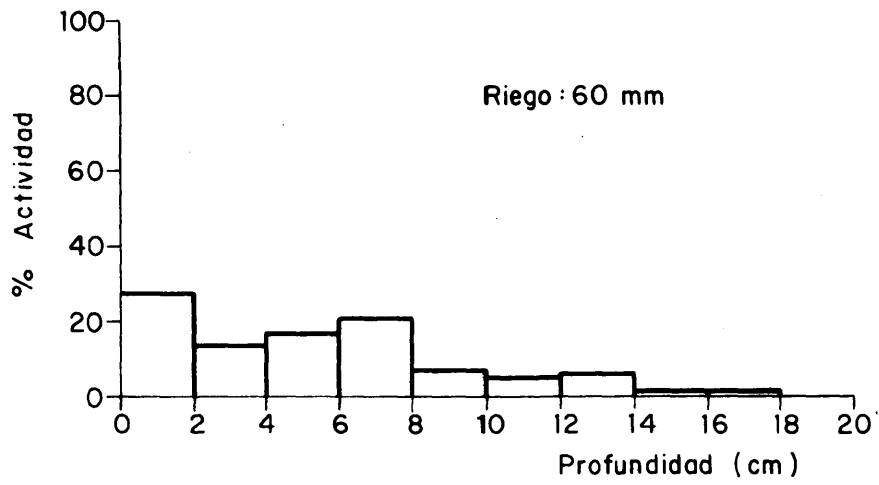


FIG. 36. — EMIGRACION VERTICAL DEL CMU EN EL SUELO IV PARA LAS DIFERENTES DOSIS DE RIEGO.

monurón-2-<sup>14</sup>C a 1 Kg de cada suelo, se homogenizaron perfectamente y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura ambiente, protegidos de la lluvia.

Con objeto de estudiar la influencia de la humedad en la degradación de este herbicida, se llevó paralelamente el estudio con 1 Kg de suelo II, mantenido durante toda la experiencia con una humedad correspondiente a su capacidad de campo. Durante los 12 meses que duró esta experiencia, se llevó un registro de humedad relativa y temperatura del ambiente.

Mensualmente, se tomó una muestra de 5 gr. de cada suelo, se extraía el monurón-2-<sup>14</sup>C como se indicó en el apartado anterior y se determinó su actividad en centelleo líquido.

También se efectuó un análisis radiocromatográfico de las extracciones alcohólicas de cada muestra. El objeto de este análisis era la determinación de la radiactividad que correspondía al CMU-2-<sup>14</sup>C, dentro de la actividad total detectada. Las cromatografías se realizaron sobre placas de gel de sílice con fluorescencia, con objeto de detectar con luz ultravioleta la presencia del anillo aromático y placas sin fluorescencia que después de reveladas con autorradiografía y analizadas con el Registrador de cromatogramas descrito en el apartado 2.3.2., eran raspadas en los puntos activos para determinar el % de actividad que correspondía al CMU. El hecho

de no emplear las placas con fluorescencia para el contaje en centelleo líquido, radica en las interferencias que se producen entre la sustancia fluorescente y el luminóforo.

La mezcla eluyente utilizada en cromatografía fué: nitrometano, cloroformo (1:1) por ser la que se encontró con mayor capacidad separadora para los compuestos de degradación del CMU.

En la tabla XXXIV se detalla la pérdida de la actividad del monurón-2-<sup>14</sup>C en función del tiempo en los suelos tratados durante el período de duración de la experiencia y están representados en las figuras número 37, 38, 39, 40 y 41.

El registro gráfico de las muestras correspondientes a la última extracción se representa en las figuras número 42, 43, 44, 45, 46 y 47. En la figura número 48 se visualizan las autorradiografías de los cromatogramas correspondientes a los 30, 60, 210 y 330 días.

Las cantidades de microorganismos totales en los suelos, estimados a partir de las extracciones de 10 gramos de muestra con 98 ml de solución de peptona al 0,1% en dilución  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  e incubados durante 72 horas a 30°C, según técnicas estandarizadas, en placa Petri en un medio "Plato Count Agar" de la casa Difco, se detallan en la tabla XXXV. Los contajes se efectuaron al comienzo, a los seis meses y al final de la experiencia.

TABLA XXXIV. Descenso de la actividad del monurón-2-<sup>14</sup>C (CMU), en función del tiempo en diferentes suelos. \*

Días	Temperatura media (°C)	Humedad relativa media %	Suelo I		Suelo II		Suelo II <del>III</del>		Suelo III		Suelo IV	
			Act. Total.	Act. correspondiente al CMU	Act. total.	Act. correspondiente al CMU	Act. total.	Act. correspondiente al CMU	Act. total.	Act. correspondiente al CMU	Act. total.	Act. correspondiente al CMU
30	11,30	75	98,75	97,50	94,25	92,75	86,35	80,55	100,00	92,65	97,75	97,00
60	14,50	87	97,50	93,75	92,80	87,25	77,50	70,50	96,65	81,65	95,88	94,50
90	17,20	65	92,50	88,25	92,00	82,90	70,43	61,75	87,23	70,70	95,57	92,87
120	21,00	90	87,25	82,15	89,00	78,25	64,30	55,25	77,20	62,90	95,33	91,75
150	22,40	69	82,00	75,25	83,00	74,10	58,25	48,56	69,08	57,45	94,65	89,30
180	26,00	63	77,85	70,00	81,00	71,25	53,17	42,25	69,00	54,25	93,72	87,25
210	25,10	58	75,60	65,90	78,00	68,75	52,23	37,15	68,75	50,55	90,25	84,10
240	21,30	54	74,12	64,40	77,25	67,53	51,50	32,70	68,50	48,61	87,40	81,30
270	20,50	73	70,00	61,15	76,00	65,47	51,10	31,23	68,33	47,80	85,36	75,60
300	14,90	77	68,21	56,75	73,25	65,62	51,15	32,15	67,66	47,00	80,27	72,97
330	12,10	71	65,31	55,54	71,80	61,82	50,37	29,78	65,44	45,85	75,48	68,68

\* Los valores expresados en esta tabla representan el % de la actividad detectada frente a la inicial.

\*\* Suelo mantenido en condiciones de humedad correspondiente a su capacidad de campo.

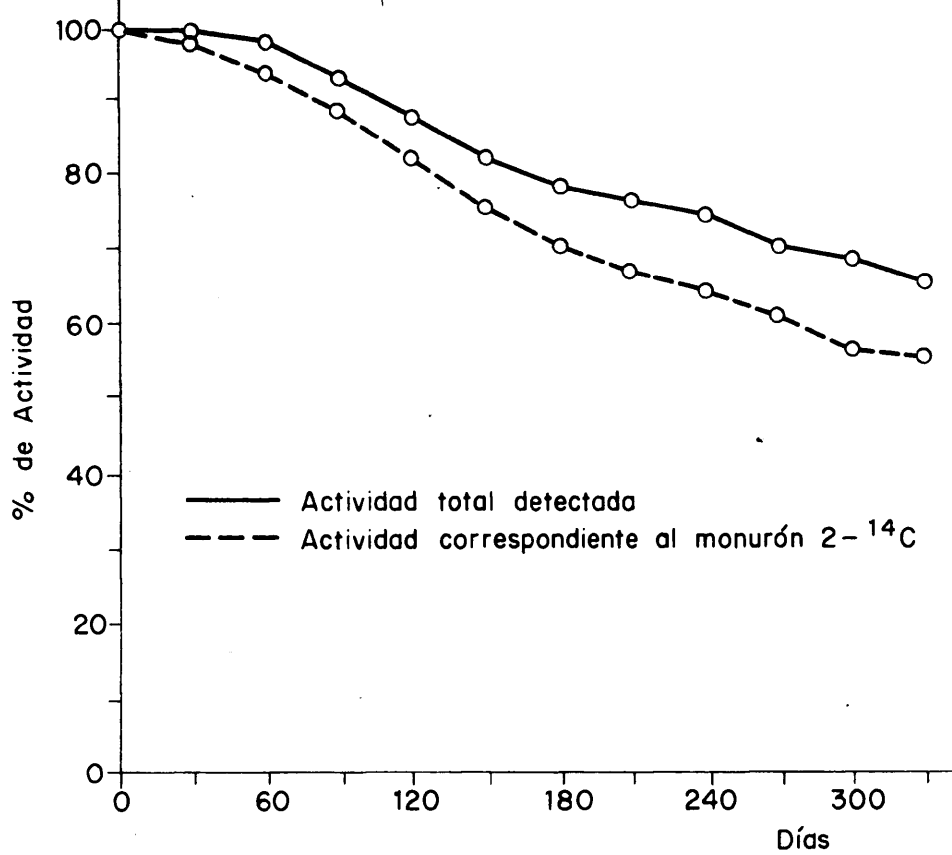


FIG. 37. — DEGRADACION DEL CMU-2-<sup>14</sup>C EN EL SUELO I EN FUNCION DEL TIEMPO.

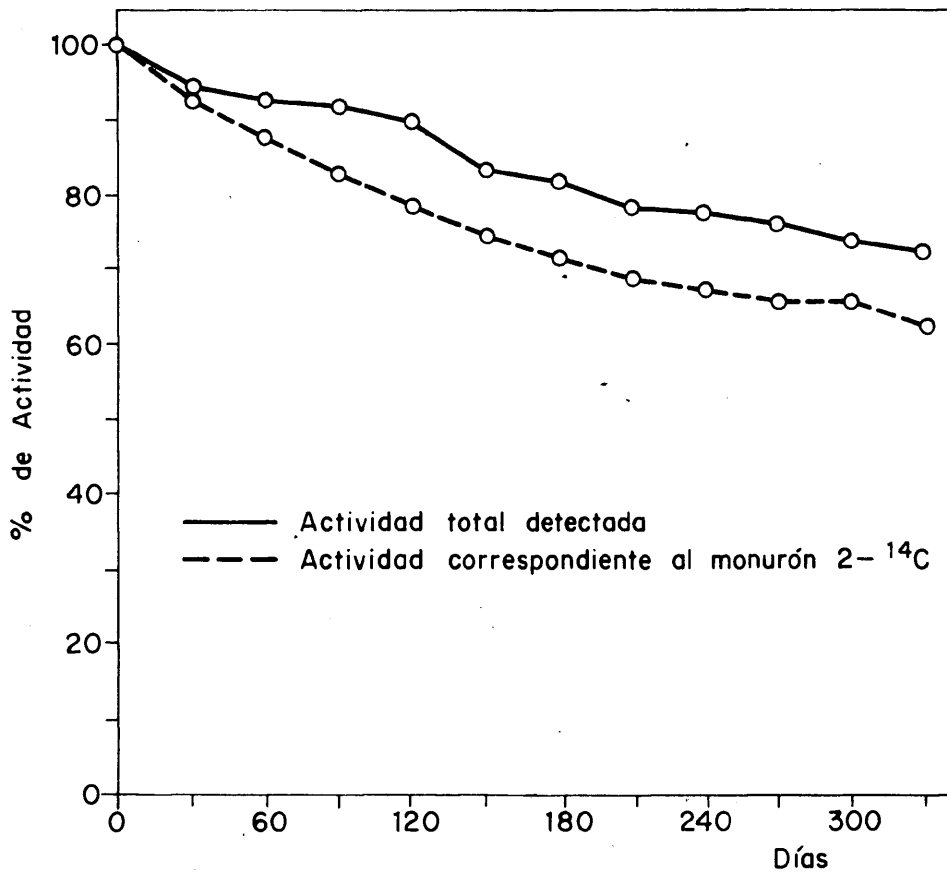


FIG. 38. — DEGRADACION DEL CMU-2-<sup>14</sup>C EN EL SUELO II EN FUNCION DEL TIEMPO.

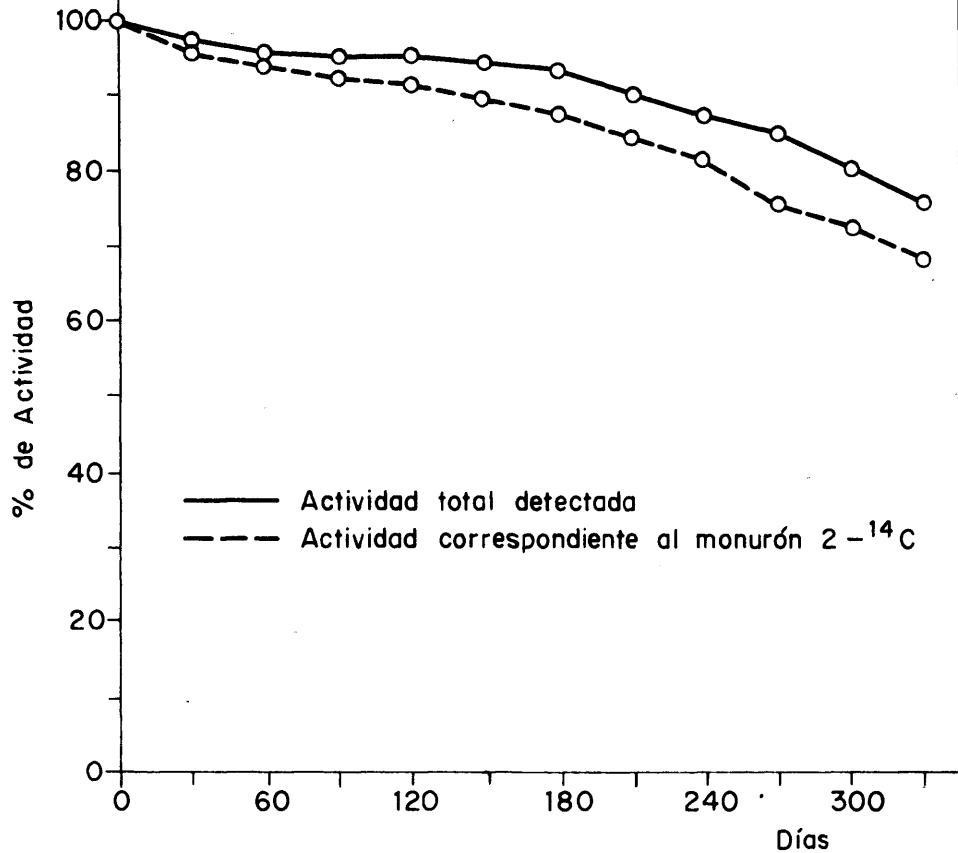


FIG. 39. — DEGRADACION DEL CMU-2-<sup>14</sup>C EN EL SUELO IV EN FUNCION DEL TIEMPO.

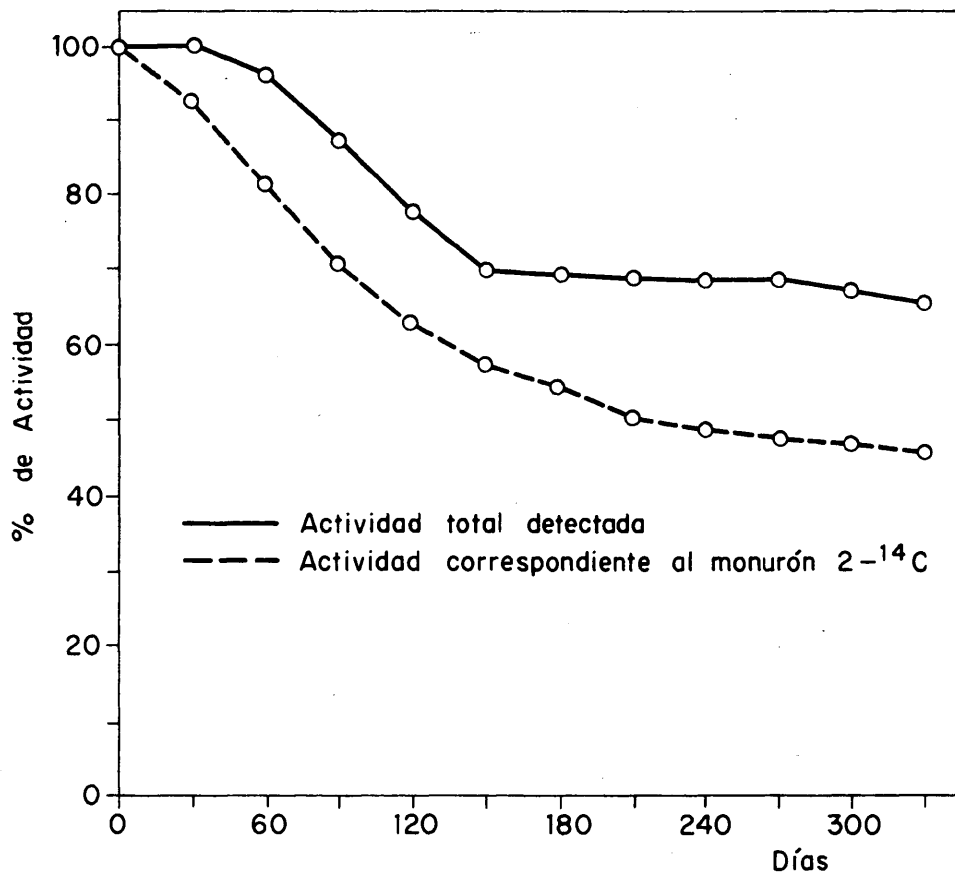


FIG. 40. — DEGRADACION DEL CMU-2-<sup>14</sup>C EN EL SUELO III EN FUNCION DEL TIEMPO.

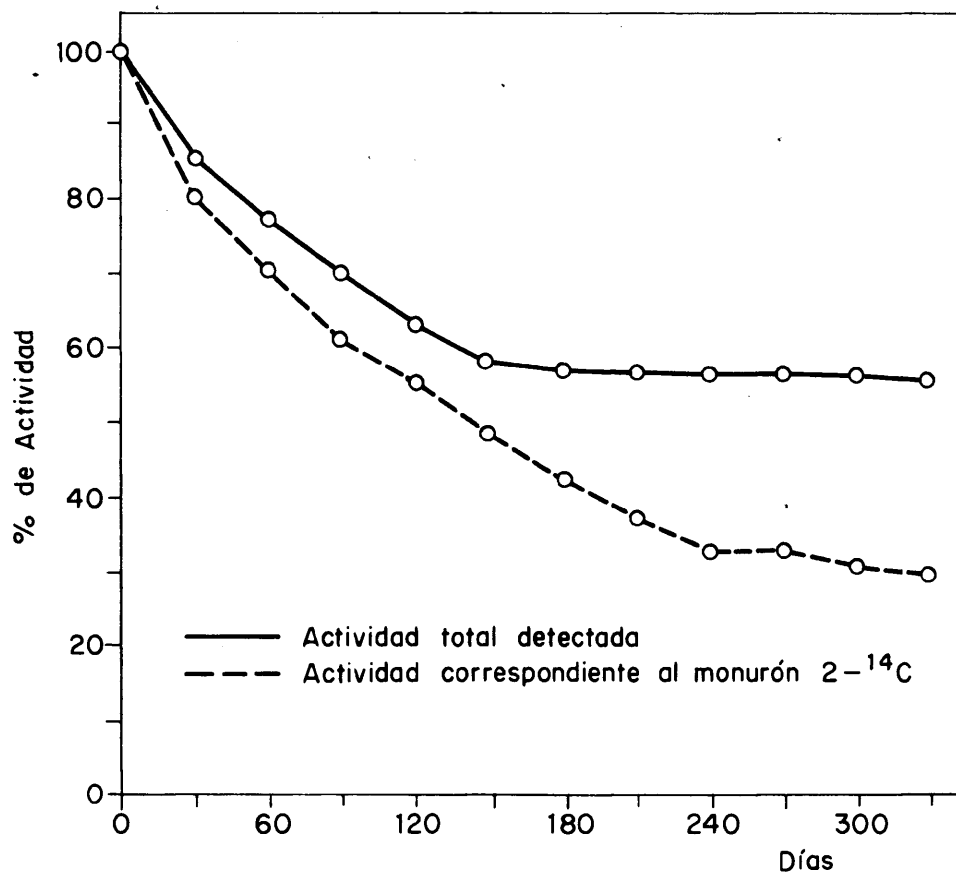


FIG. 41.— DEGRADACION DEL CMU-2-<sup>14</sup>C EN EL SUELO II, MANTENIDO EN CONDICIONES DE HUMEDAD CORRESPONDIENTE A LA CAPACIDAD DE CAMPO.

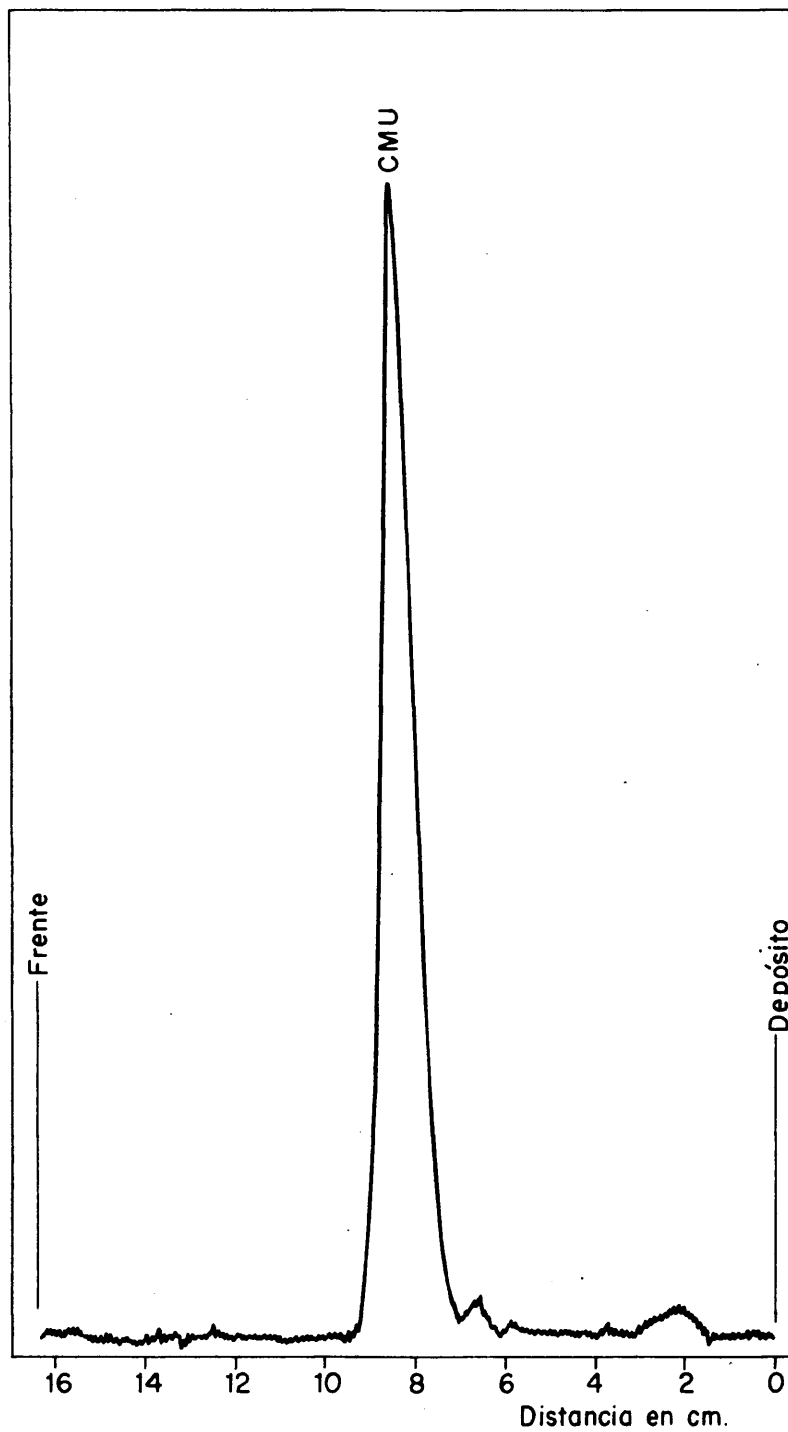


FIG. 42.—REGISTRO GRAFICO DE LA RADIOCROMATOGRFIA CORRESPONDIENTE A UN PATRON DE CMU-2-<sup>14</sup>C DISUELTO EN ETANOL.

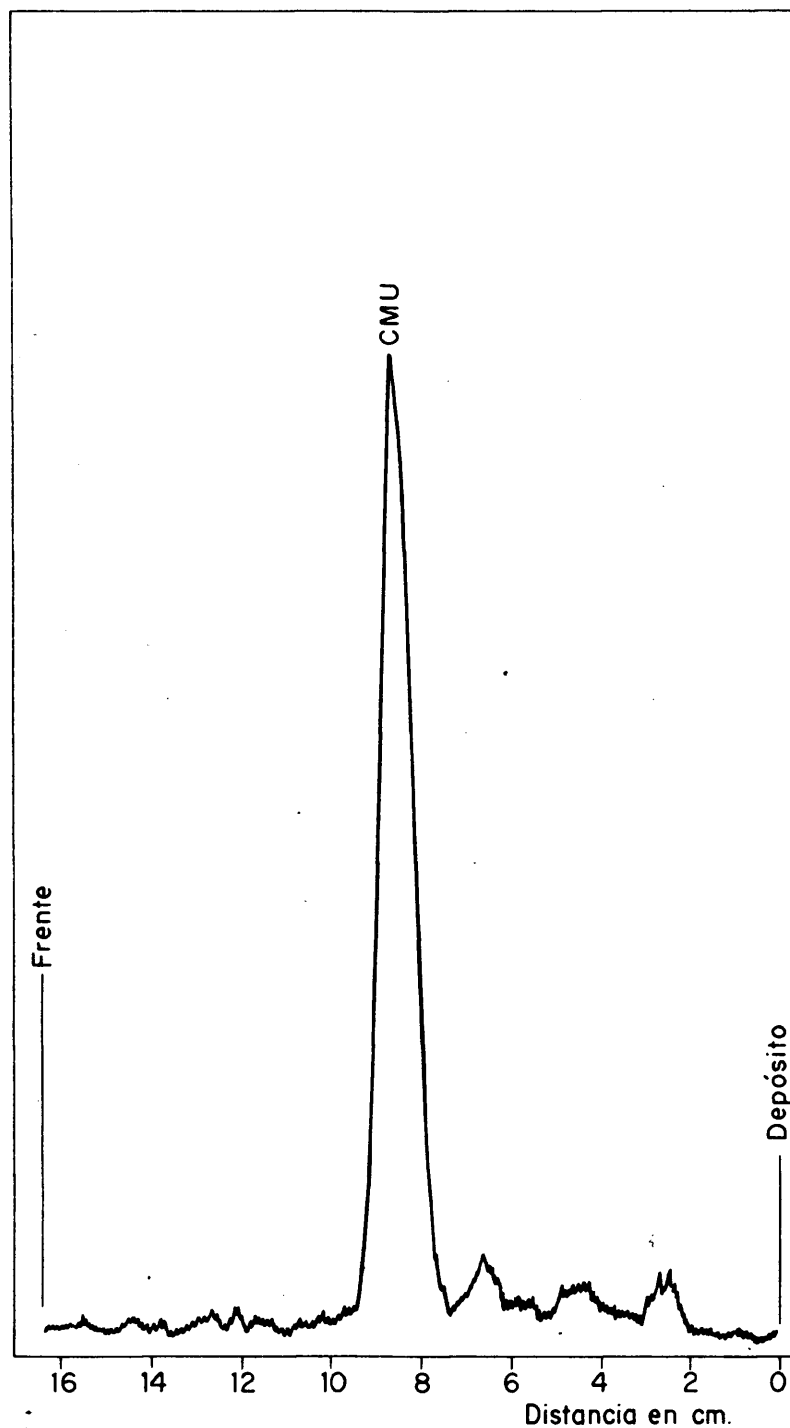


FIG.43.— REGISTRO GRAFICO DE LA RADIOCROMATOGRFIA CORRESPONDIENTE AL EXTRACTO ALCOHOLICO DEL SUELO I, A LOS 300 DIAS DE TRATAMIENTO CON CMU-2-<sup>14</sup>C.

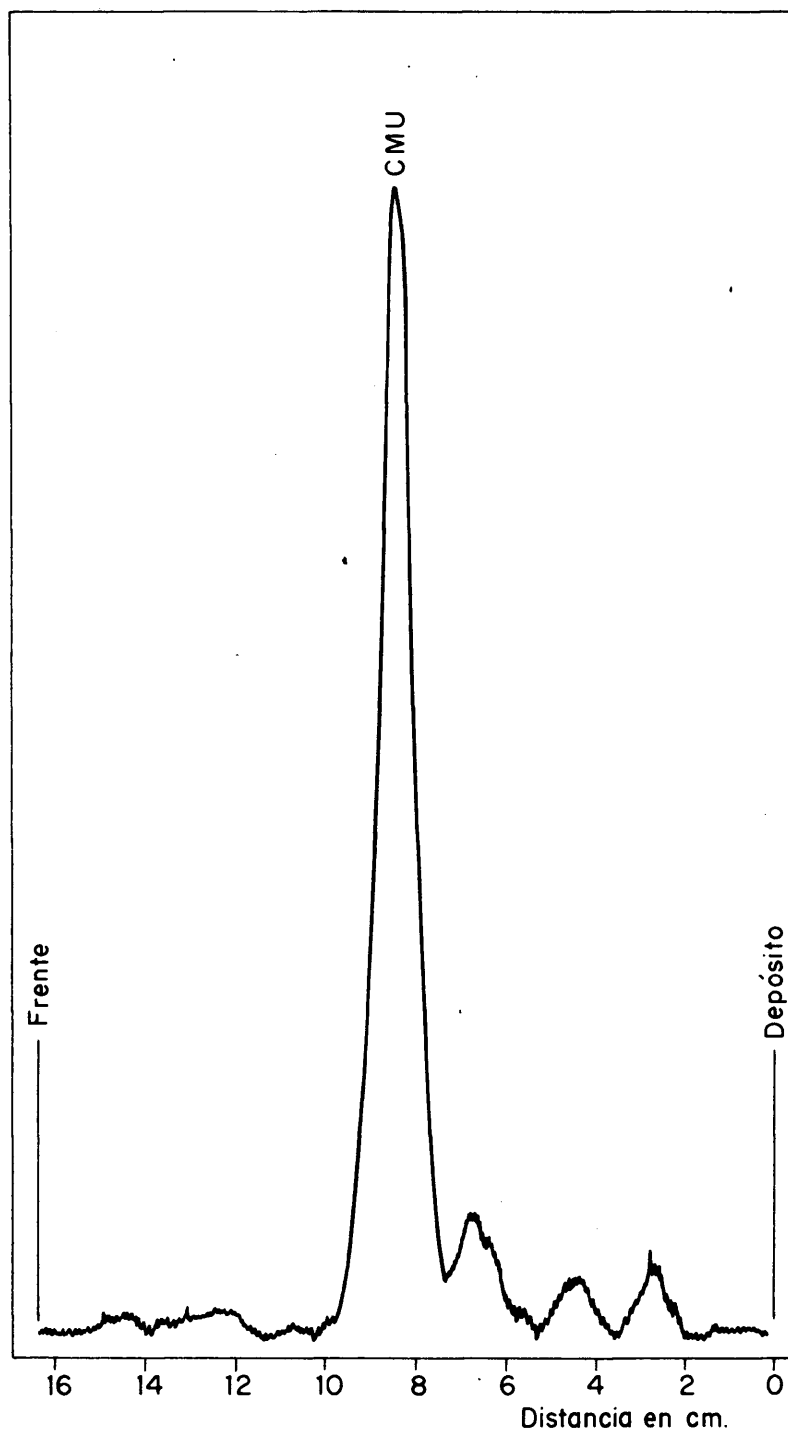


FIG.44. - REGISTRO GRAFICO DE LA RADIOCROMATOGRFIA CORRESPONDIENTE AL EXTRACTO ALCOHOLICO DEL SUELO II, A LOS 300 DIAS DE TRATAMIENTO CON CMU-2-<sup>14</sup>C.

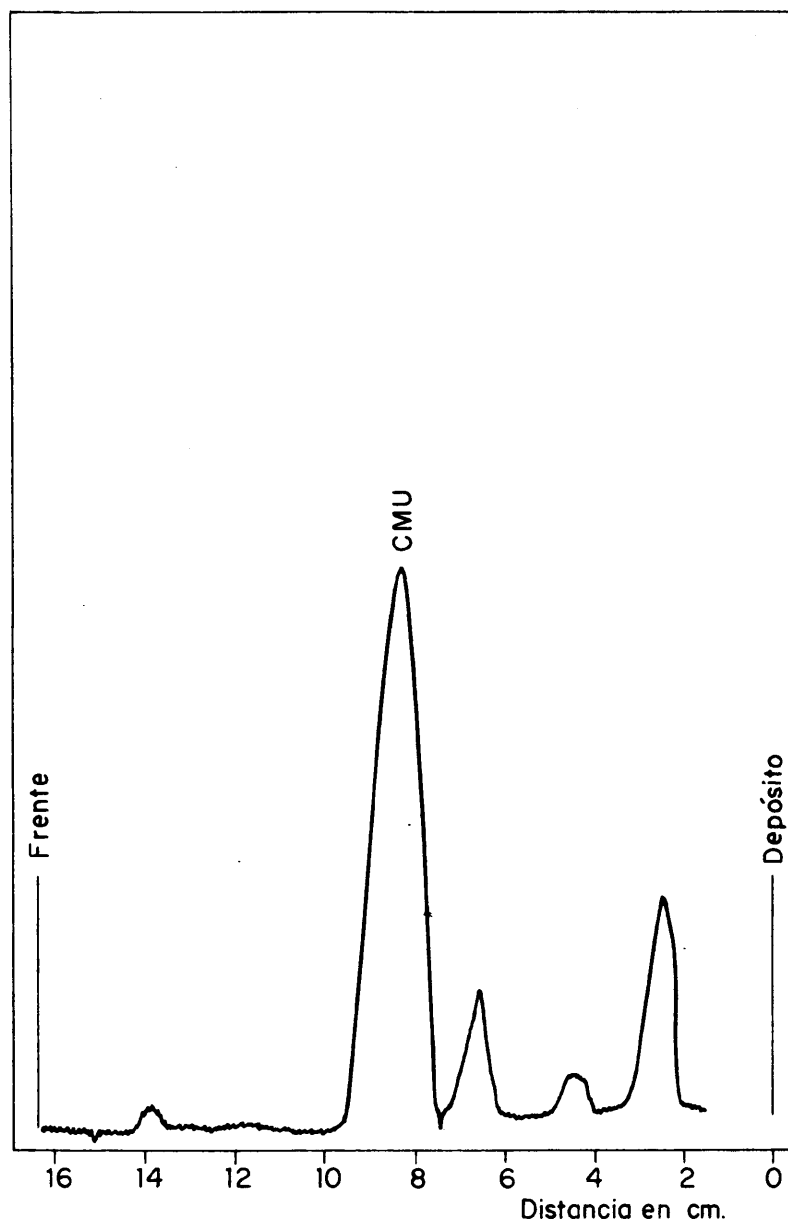


FIG.45.— REGISTRO GRAFICO DE LA RADIOCROMATOGRFIA CORRESPONDIENTE AL EXTRACTO ALCOHOLICO DEL SUELO III, A LOS 300 DIAS DE TRATAMIENTO CON CMU-2-<sup>14</sup>C.

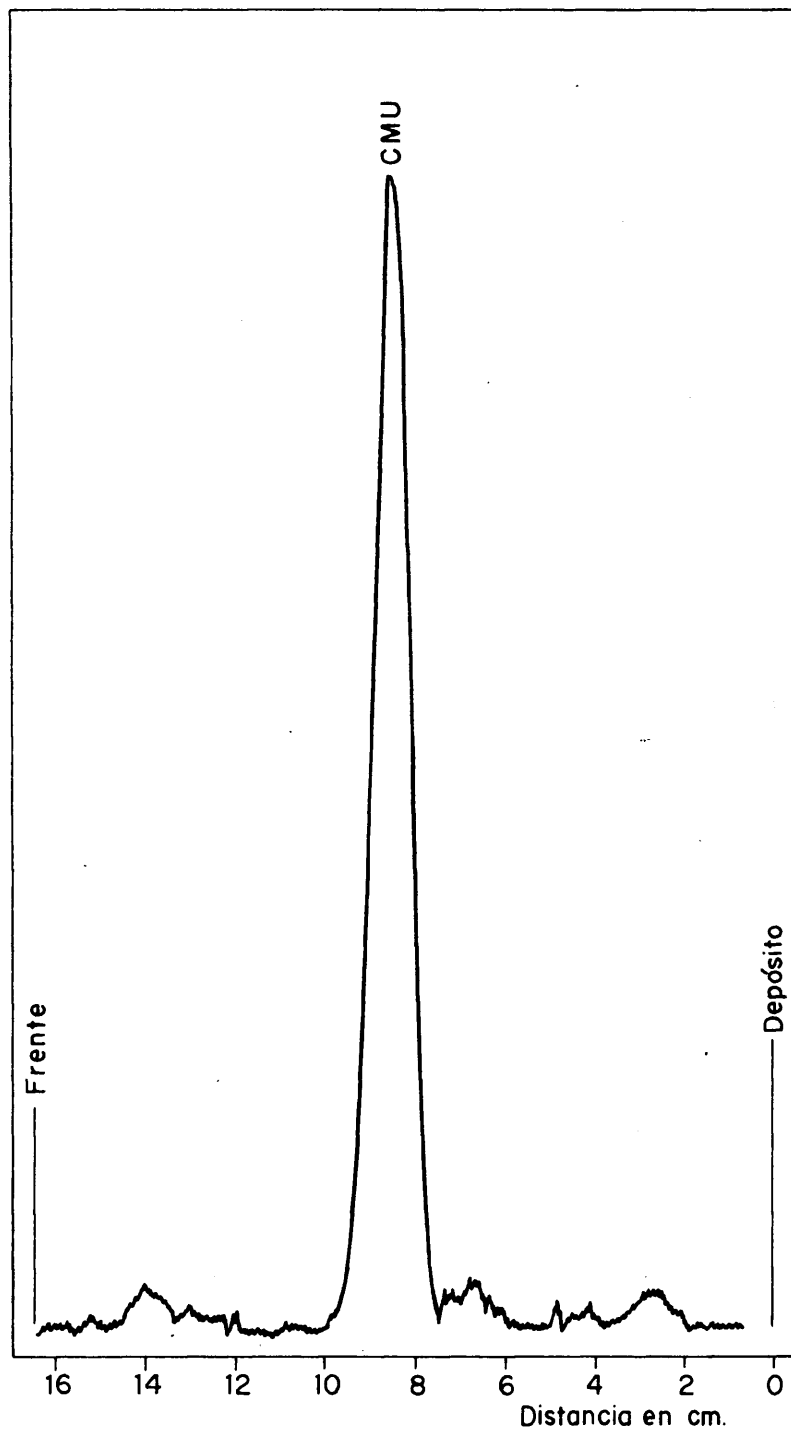


FIG.46.— REGISTRO GRAFICO DE LA RADIOCROMATOGRFIA CORRESPONDIENTE AL EXTRACTO ALCOHOLICO DEL SUELO IV, A LOS 300 DIAS DE TRATAMIENTO CON CMU-2-<sup>14</sup>C.

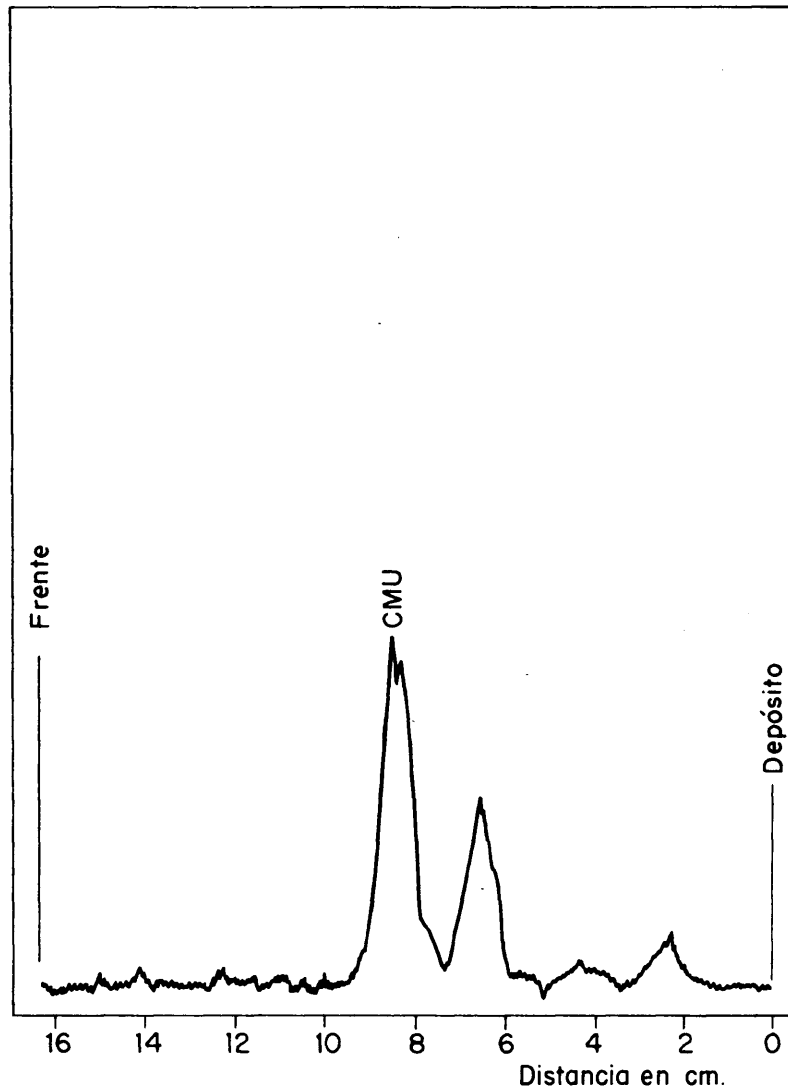
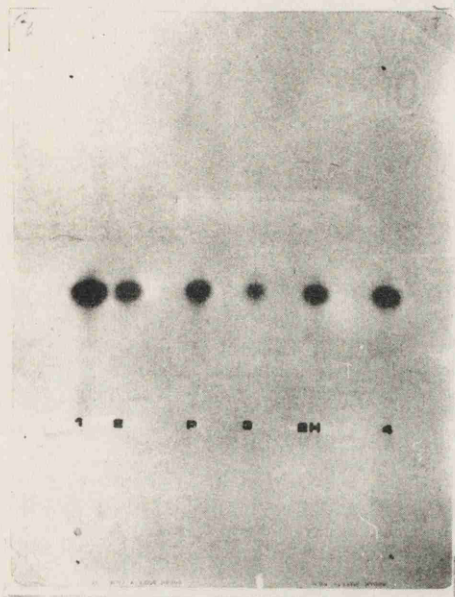
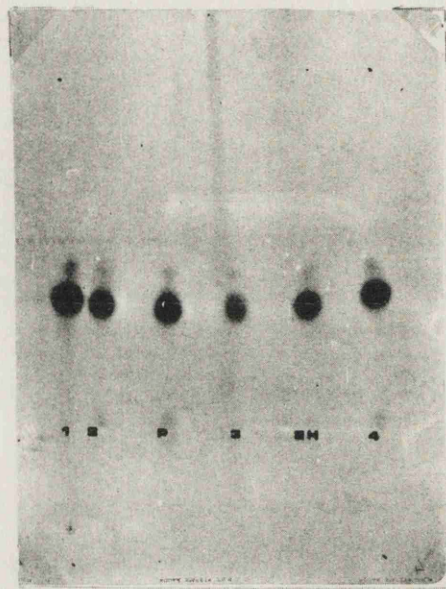


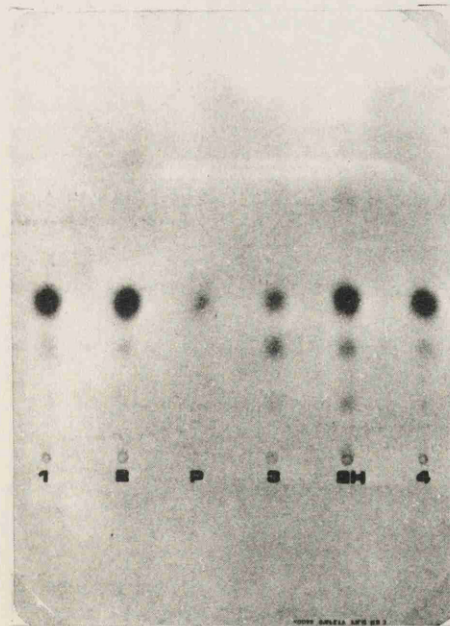
FIG.47. — REGISTRO GRAFICO DE LA RADIOCROMATOGRAFIA CORRESPONDIENTE AL EXTRACTO ALCOHOLICO DEL SUELO II, MANTENIDO EN CONDICIONES DE HUMEDAD, A LOS 300 DIAS DE TRATAMIENTO.



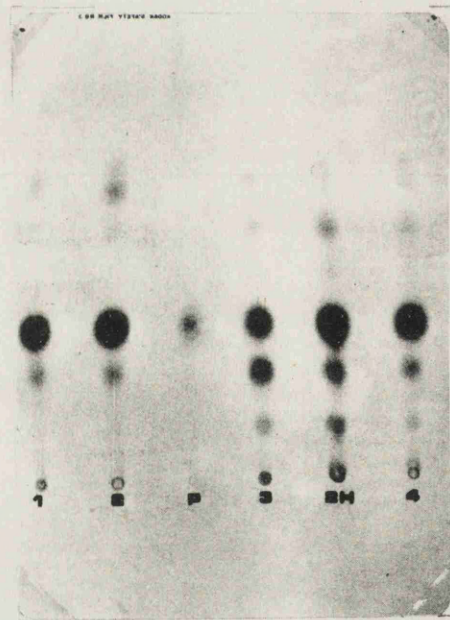
30 DIAS



60 DIAS



210 DIAS



330 DIAS

Fig. 48. - Radiocromatogramas de los extractos de los cuatro suelos a los 30, 60, 210 y 330 días. (P: Patron de CMU-2- $^{14}\text{C}$ ; 2H: extracto del suelo 2 mantenido en condiciones de humedad constante correspondiente a la capacidad de campo).

TABLA XXXV. Conteo de microorganismos totales.\*

Tipo de tratamiento  Tipo de suelo	Testigo	CMU 0,5 mg por gramo de suelo	
		Tiempo=0	Tiempo=6 meses
I	6,10	6,10	6,30
II	6,18	6,20	6,35
III	6,09	6,19	6,04
IV	6,01	6,15	6,03

\* Los valores expresados en la tabla representan el logaritmo decimal del número de microorganismos viables por gramo de suelo.

#### 4. DISCUSION DE RESULTADOS

### 3.5.3. Análisis estadístico.

Teniendo en cuenta las distribuciones muestrales que se representan en las figuras 37, 38, 39, 40 y 41, puede suponerse que cumplen con la hipótesis de pertenecer a funciones del tipo exponencial

$$M = M_0 e^{-Kt} \quad (1)$$

Donde M es la cantidad de monurón remanente en el suelo al cabo de un tiempo t de aplicación de la cantidad inicial  $M_0$  y K una constante característica para cada suelo.

Tomando logaritmos neperianos en la ecuación (1), resultará:

$$LM = LM_0 - Kt \quad (2)$$

Ajustando por el método de mínimos cuadrados los pares de valores muestrales anteriormente citados, a curvas del tipo (2), tendremos como resultados finales:

Suelo I	$LM = 4,62391 - 0,00193 t$	ó bien	$M = 101 e^{-0,00193 t}$
Suelo II	$LM = 4,546900 - 0,00136 t$	ó bien	$M = 94,34 e^{-0,00136 t}$
Suelo II (humedo)	$LM = 4,474750 - 0,00370 t$	ó bien	$M = 88,01 e^{-0,00370 t}$
Suelo III	$LM = 4,510013 - 0,00244 t$	ó bien	$M = 91,00 e^{-0,00244 t}$
Suelo IV	$LM = 4,615368 - 0,00104 t$	ó bien	$M = 101,00 e^{-0,00104 t}$

La bondad del ajuste mediante la  $\chi^2$  de Pearson es superior al 95% para un nivel de significación del 5%, para las cinco ecuaciones.

#### 4. DISCUSION DE RESULTADOS.

##### 4.1. ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA FOTOSINTESIS POR EL MONURON EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE DIVERSAS PLANTAS.

Los resultados obtenidos para los cloroplastos aislados de las cinco especies vegetales estudiadas, demuestran que la velocidad de la reacción de Hill es diferente para cada especie. El valor encontrado para los cloroplastos de avena, es de unas cinco veces menor que el obtenido para las de judía y alfalfa y aproximadamente la tercera parte del valor correspondiente a los cloroplastos de cebada.

Es de notar que la velocidad de la reacción decrece rápidamente a medida que transcurre el tiempo, llegando a anularse, en nuestras condiciones, al cabo de una media hora. El decrecimiento de la velocidad de reacción es distinto para las diversas especies estudiadas, motivo por el cual los valores máximos de DPIP reducido al final del período de reacción, para cada especie, no guardan la misma relación con los valores iniciales. Este decrecimiento es menor en la cebada y hace que aún teniendo una velocidad inicial baja, alcance el mayor valor de reducción del DPIP al final del período de iluminación.

El cálculo teórico de la velocidad de reacción en cada instante, lo podríamos obtener a partir de la derivada de la función obtenida para cada especie, sin embargo, la

velocidad inicial ha sido calculada experimentalmente en los tres primeros minutos de reacción, ya que, en el origen, la función matemática ajustada, podría no coincidir con el proceso real.

Los resultados de la velocidad inicial obtenida para los ensayos testigos, oscilaban entre 0,363 y 1,435 micromoles de DPIP reducidos por minuto y por micromol de clorofila para la avena y judía respectivamente, siendo estos valores concordantes con los encontrados en la bibliografía (118).

En todos los resultados obtenidos se observa la propiedad inhibidora de la reacción de Hill por el CMU. En trabajos anteriores (3), (60), (74) y (75) se había determinado que en cloroplastos de espinaca y células de *Chlorella*, se conseguía un 50% de inhibición de la fotosíntesis para concentraciones de CMU del orden de  $10^{-6}$  M; Cooke (2), sin embargo, había indicado anteriormente que para concentraciones de CMU del orden de  $10^{-6}$  M, la reacción de Hill se inhibía totalmente. El poder inhibidor del CMU depende de bastantes factores, además de la concentración, destacando principalmente, la relación molecular entre CMU/clorofila y la especie vegetal considerada. Por la razón anterior, en lugar de dar la concentración de CMU correspondiente al  $PI_{50}$ , tratándose de cloroplastos aislados, conviene dar la relación CMU/clorofila, que produce el  $PI_{50}$ , para cada especie.

Según los resultados obtenidos, la relación CMU/clorofila correspondiente al  $PI_{50}$  varía bastante para cada especie. Esto expresa que para producir el 50% de inhibición de la reacción de Hill en los cloroplastos aislados, la cantidad de moléculas de clorofila que son afectadas por una molécula de CMU es muy variable, dependiendo este valor de la sensibilidad específica de los cloroplastos.

Según los datos que se han obtenido para cloroplastos aislados de alfalfa y cebada (que resultaron las más sensibles), la relación molecular CMU/clorofila es de 1/374,5 y 1/363,6 respectivamente, para la espinaca 1/81,4; para la judía 1/9,5 y para la avena 1/0,7, siendo por tanto los cloroplastos de ésta los más resistentes a la inhibición por el CMU.

#### 4.2. ABSORCIÓN RADICULAR DEL MONURON POR PLANTAS DE JUDIA Y CEBADA.

A la vista de los resultados obtenidos por los métodos de contaje y autorradiografía, se observa una absorción gradual del herbicida. En las primeras horas, la velocidad de acumulación en las raíces es muy superior a la del resto de los órganos a medida que transcurre el tiempo. A partir de las 10 horas, la acumulación del herbicida en la raíz va perdiendo importancia y va aumentando la acumulación en los órganos aéreos.

Para la concentración de 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , la fase inicial de la absorción es semejante a la de la dosis 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , pero a medida que transcurre el tiempo en las plantas que absorben CMU se observa un decrecimiento de la acumulación del herbicida en la raíz y una estabilización del contenido en herbicida en el tallo y en las hojas. Este decrecimiento en la raíz es mucho más acusado para las plantas de judía que para las de cebada.

Una explicación de este comportamiento debe residir en el modo de actuación del herbicida en la fisiología de las plantas. El CMU que inhibe la reacción de Hill en la fotosíntesis como se ha comprobado anteriormente, inhibe, como consecuencia, la producción de hidratos de carbono, que es la fuente energética para todos los procesos que requieren energía metabólica. Como la absorción activa requiere un gasto energético, es evidente que con la disminución de hidratos de carbono, decrezca e incluso se llegue a anular la absorción activa. Esta observación, está de acuerdo con la idea de Freed (87), Geohagan (119), y otros autores, (120) y (80).

El hecho de que la acumulación en la raíz decrezca más acusadamente en la judía que en la cebada debe tener su explicación en la distinta sensibilidad de ambas plantas ante el herbicida, ya que la judía es mucho más sensible que la cebada.

Considerando solamente el proceso de absorción en la raíz aislada y dentro de la primera hora, se observa que el valor del "espacio libre aparente" para la judía es, por lo menos, doble que el alcanzado en la cebada. Los valores encontrados demuestran una vez más la arbitrariedad del concepto de "espacio externo", que según se decía, es el volumen de raíz en el cual los iones puedan entrar o salir libremente. El valor de 1,567 ml por gramo de raíz, es absurdo si se considera un espacio externo físico, por tanto, de acuerdo con la concepción moderna (121), conviene hablar de un "espacio externo aparente" para absorción de cada sustancia en cada planta.

En las microautorradiografías se observa que el monurón se distribuye homogéneamente en las raíces, mientras que en los órganos aéreos el monurón se acumula principalmente en la zona epidérmica y parenquima clorofílico.

Con respecto a la cantidad de CMU acumulado en las hojas de planta de judía y cebada que lo absorbieron radicalmente, no se observa una relación lineal entre las concentraciones acumuladas en las hojas y la concentración del monurón en la solución nutritiva. Es evidente, la existencia de un transporte activo que hace aumentar la concentración del CMU en el interior del jugo celular hasta valores de  $10^4$  veces el existente en la solución nutritiva.

A partir de la dosis de 9  $\mu\text{g/ml}$  de CMU para las plantas de cebada y de 3  $\mu\text{g/ml}$  para las de judía, la concentración de CMU, en el jugo celular, no aumenta progresivamente con la concentración, e incluso las plantas que fueron sometidas a una dosis de 30  $\mu\text{g/ml}$ , absorbieron menos que las de 15  $\mu\text{g/ml}$ , hecho explicable por la muerte prematura de las primeras.

Parece ser que concentraciones de CMU en el jugo celular de la hoja superiores a  $10^{-5}$  M, provocan alteraciones en el metabolismo de la planta o incluso pueden llegar a causar su muerte. Es de notar que según el análisis microautorradiográfico como acabamos de decir, el CMU estaba mucho más concentrado en la epidermis y parénquima clorofílico que en el resto de la hoja, por tanto, la concentración real existente en los elementos fotosintéticos, será mayor que la calculada teóricamente, considerando la cantidad total de CMU y agua presentes en la hoja completa.

Según estas consideraciones, se pueden correlacionar en parte, los daños observados en la planta total causados por el CMU, con el efecto inhibitor de la reacción de Hill, en los cloroplastos aislados. Sin embargo, hay una aparente anomalía entre el comportamiento de la planta total y los cloroplastos aislados de cebada, pues mientras los cloroplastos

aislados resultaron ser los más sensibles al CMU, al nivel del  $PI_{50}$ , en la planta completa no sufrieron efecto aparente aún con concentraciones de CMU 10 veces superiores a la determinada para producir el  $PI_{50}$ . Esta aparente anomalía debe tener su explicación en el metabolismo del CMU por la célula completa de la cebada que tal vez haga disminuir la cantidad de CMU activo en los cloroplastos. En la actualidad, este tema está siendo objeto de un estudio detallado.

#### 4.3. ABSORCION FOLIAR

Como consecuencia de los resultados obtenidos en las experiencias de absorción foliar de monurón en plantas de judía y cebada, se observa que este herbicida se trasloca muy poco, lo cual está de acuerdo con los datos encontrados en la bibliografía (48). Por esta razón, el producto se aplica en el suelo, principalmente en preemergencia, para que la absorción se efectúe por vía radicular.

Tanto en cebada como en judía, se observa una absorción mucho mayor en las plantas mantenidas en iluminación continua que en las no iluminadas y dentro de cada una de las experiencias, se observa más absorción a medida que aumenta la temperatura, siendo a 5°C la traslocación muy escasa.

La cantidad total traslocada no aumenta en proporción directa al tiempo de absorción.

En cebada, en un principio la mayor acumulación se observa en el tallo ; pasando en las horas siguientes a las hojas. En judía, sin embargo, desde un principio se observa una mayor acumulación en las hojas. Para los diferentes tiempos de absorción en las tres temperaturas no se detecta actividad en las raíces de las dos plantas. Para las plantas de cebada mantenidas en iluminación continua, el monurón apenas llega a trasladarse el 13% del total depositado, en las condiciones óptimas de experiencia, (t<sup>a</sup>. 25°C; 72 horas de absorción).

En plantas de judía el porcentaje máximo de traslocación es ligeramente superior al de cebada y entre la temperatura más elevada y la más baja, la diferencia del porcentaje total trasladado es más acusada; siendo siempre la cantidad trasladada a la hoja no tratada muy superior a la del tallo.

Con respecto a las plantas no iluminadas, es de destacar, el pequeño porcentaje trasladado, pues no pasa del 3,13% en la judía y del 1,66% en la cebada, en las condiciones de temperatura óptima (25°C).

En las autorradiografías correspondientes a estas plantas, figuras número 29, 30, 31 y 32, se visualiza de una manera cualitativa los resultados descritos en las tablas.

#### 4.4. COMPORTAMIENTO DEL MONURON EN EL SUELO.

##### 4.4.1. Emigración vertical en función de la dosis de riego.

Debido al corto período de duración de la experiencia, el monurón no se degradó sensiblemente y no hubo necesidad de efectuar correcciones por este concepto en los valores obtenidos, siendo, por esta razón, la actividad del  $^{14}\text{C}$  detectada la correspondiente al monurón- $2\text{-}^{14}\text{C}$  y se puede tomar esta actividad para determinar el reparto del monurón en las columnas de suelo en función de la dosis de riego.

Para la dosis de riego de 15 mm, se observa que el 95% del monurón queda distribuido entre los 4 y 6 primeros centímetros para todos los suelos, excepto para el suelo III de textura "arena franca" donde la profundidad alcanzada por el monurón es aproximadamente el doble que la que alcanza en los restantes suelos.

Para la dosis de riego máxima (60 mm), se observa que el 95% del monurón se reparte entre los 14 primeros centímetros, aproximadamente, en los suelos I, II y IV, mientras que en el suelo III se distribuye casi homogéneamente entre los 20 primeros centímetros, e incluso, un 5% se perdió en el agua recogida a la salida de la columna.

En el movimiento vertical del herbicida en el

suelo juegan tres factores principalmente: la solubilidad del producto en el agua, la dosis de riego y el grado de absorción del producto por el suelo. Este último factor depende a su vez del contenido en arcilla y materia orgánica.

Si observamos en la tabla XXIX el análisis de los suelos estudiados, podemos apreciar que el suelo III es el de menor contenido en arcilla y materia orgánica, por este motivo el CMU es retenido con menor intensidad y alcanza mayor profundidad.

En el suelo II, que es el de mayor contenido en materia orgánica se observa un descenso del herbicida análogo al que se produce en los suelos I y IV, que si bien tienen menor contenido en materia orgánica, contienen más proporción de arcilla que el suelo II.

El reparto en profundidad del CMU en los suelos I, II y IV no contradice los datos encontrados en la bibliografía, (15), (16) y (17).

Tomando como base el riego de 60 mm y considerando la profundidad media alcanzada por el monurón como la correspondiente a la línea teórica que delimita la acumulación del 50% del herbicida, en la zona superior e inferior, es decir, la mediana de la distribución de la actividad en función de la profundidad, se obtienen los valores que se detallan en la tabla XXXVI para dicha pro-

fundidad media y para la elución del herbicida en función de la dosis de riego expresada en mm de profundidad por mm altura de riego.

TABLA XXXVI. Valores de la relación entre la profundidad media alcanzada por el monurón y la altura de riego en los distintos suelos, calculados para el riego de 60 mm.

Suelo	Profundidad media <sup>⊠</sup>	Descenso relativo <sup>⊠⊠</sup>
I	52,6	0,87
II	66,7	1,11
III	106,6	1,77
IV	51,5	0,85

<sup>⊠</sup> expresado en mm.

<sup>⊠⊠</sup> expresado en mm de profundidad/mm de altura de riego.

#### 4.4.2. Degradación del monurón en el suelo.

La evaluación de la degradación del monurón en el suelo, por la actividad remanente del monurón-2-<sup>14</sup>C incorporado en el momento del tratamiento, puede considerarse representativa, debido a que la pérdida de actividad en el tiempo, equivale a una pérdida del <sup>14</sup>C de la

molécula de monurón-2-<sup>14</sup>C, (única fuente inicial de <sup>14</sup>C), bien sea por intercambio con el CO<sub>2</sub> atmosférico, (que resulta insignificante en este caso) o por efecto de respiración de los microorganismos que son capaces de utilizar al monurón como fuente de carbono.

En la actividad detectada, puede corresponder, una parte, a los productos de degradación del monurón que conservan el <sup>14</sup>C, por este motivo se efectuó el análisis radiocromatográfico, por medio del cual, se determinó el % de actividad correspondiente a estos productos y como consecuencia se pudo conocer con precisión la cantidad de monurón remanente.

En los resultados obtenidos, se observa a lo largo de los 330 días que duró la experiencia, una escasa degradación, que viene a confirmar los datos bibliográficos revisados (18), (19), (20) y (21). Estos datos, contrastan con los encontrados para otros herbicidas por ejemplo el 2, 4-D (117), que al mes de aplicación, se ha degradado aproximadamente un 50% en suelos de tipo medio. Por esta razón, el monurón es un herbicida de aplicación en preemergencia y es necesario tener en cuenta el efecto residual para los cultivos sucesivos.

A los 150 días de comenzada la experiencia, la actividad detectada en las extracciones alcohólicas correspondiente al monurón-2-<sup>14</sup>C de los suelos I, II, III

y IV fué del 72,25; 74,10; 69,08 y 89,03 % con respecto al total aplicado. Al final del período, es decir, a los 330 días, la actividad detectada fué del 55,64; 61,82; 45,85 y 68,68 % de la aplicada inicialmente para los suelos I, II, III y IV respectivamente mantenidos en condiciones normales de humedad.

En las condiciones más favorables de degradación, es decir, para el suelo II que tiene alto contenido en materia orgánica y estuvo mantenido en condiciones constantes de humedad (capacidad de campo), el % romanente al cabo de los 330 días fué del 29,78 %.

El camino de degradación del monurón según los autores ya citados con anterioridad (23), (24), (25) y (26), consiste inicialmente en la formación del compuesto monometilado, para pasar sucesivamente al compuesto demetilado, a la fenilurea respectiva y a la p-cloroanilina. Como el [3-(p-clorofenil)-1,1-dimetilurea], (CMU), se ha sintetizado marcado en el carbono 2, de los compuestos mencionados en la bibliografía, solo portarían <sup>14</sup>C el compuesto monometilado, el demetilado y la fenilurea, ya que la p-cloroanilina no contiene el grupo marcado. En el análisis radiocromatográfico de los extractos alcohólicos correspondientes a los 330 días desde que se aplicó el producto, se observa para el suelo II, mantenido en condiciones de humedad, 6 manchas que corresponden a otros tantos productos que portan <sup>14</sup>C. Los

Rf de estas substancias fueron 0; 0,15; 0,33; 0,46; 0,76; y 0,88, siendo 0,46 el Rf correspondiente al monurón.

Estos productos no fueron identificados, pues no era preetensión de este trabajo el efectuarlo, ya que únicamente interesaba el % de actividad que correspondía al monurón- $-2-^{14}C$ .

Es de destacar el hecho de que el monurón no afecta esencialmente al crecimiento de la flora microbiana total existente en el suelo como puede observarse en la tabla XXXV y que el número de microorganismos totales era semejante para los cuatro suelos al principio de la experiencia, lo cual ha determinado que el % de degradación para estos suelos haya sido aproximadamente el mismo.

En condiciones óptimas para el crecimiento de microorganismos como han sido las facilitadas al suelo II, rico en materia orgánica y mantenido en condiciones de humedad constante, el monurón se ha degradado en un porcentaje mayor, aunque aún en estas condiciones, la degradación del herbicida al cabo de los 330 días, no pasó del 75% de la cantidad aplicada inicialmente.

En el apartado 1.2.4.3. se expone la ecuación propuesta por Hill (22) y (23) para medir la degradación del herbicida en función del tiempo, teniendo en cuenta los factores que influyen en la degradación:

$$\frac{dx}{dt} = -Kx$$

donde  $x$  es la cantidad de herbicida presente en el suelo en el tiempo  $t$ .

Al integrar esta ecuación, queda de la forma:

$$x = x_0 e^{-Kt}$$

que coincide con la obtenida experimentalmente en este trabajo:

$$M = M_0 e^{-Kt}$$

Siendo  $K$  una constante que depende de la textura del suelo, contenido en materia orgánica, microorganismos, humedad, etc.

5. APLICACION PRACTICA DE LOS RESULTADOS  
OBTENIDOS A LAS CONDICIONES DE CAMPO

## 5. APLICACION PRACTICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A LAS CON- DICIONES DE CAMPO.

Con respecto a la actuación del monurón en suelos y plantas, podemos extrapolar los resultados experimentales obtenidos, con las naturales reservas, a las condiciones de campo.

Distinguiremos en un principio según se trate de una aplicación de este herbicida a cultivos de secano o de regadío.

En los cultivos de secano para la zona mediterranea y central de nuestra península, se puede considerar una pluviometría media anual de 400 mm, los cuales estan concentrados entre los meses de Noviembre a Abril aproximadamente.

En los cultivos de regadío, se puede considerar que el año se efectuan unos 14 riegos con dosis medias de  $500 \text{ m}^3/\text{Ha}$  equivalentes a 50 mm, lo cual, unido a la pluviometría natural, nos da una altura anual de riego de unos 1100 mm.

Con respecto a las características edafológicas, es muy difícil dar unos datos medios generales, debido a la poca uniformidad de los suelos de nuestra península. En el caso de querer realizar un estudio detallado de una zona, habría que efectuar los análisis necesarios para caracterizarla edafológicamente con precisión.

Para concretar en este estudio teórico, vamos a supo-

ner que los suelos destinados a secano, son de tipo medio y pobres en materia orgánica, abundando las tierras francas, de textura variable según la proporción de arcilla. Los suelos I y IV de nuestro trabajo, pueden tomarse como representativos de los de textura franco-arenosa y franco-arcillosa del secano peninsular.

La característica común que podemos atribuir a los suelos dedicados a cultivos de regadío, es un mayor contenido en materia orgánica, pudiéndose homologar en términos generales con el suelo II de nuestro trabajo.

El suelo III no es representativo de las zonas cultivadas, ya que es muy arenoso y tiene un contenido muy bajo en materia orgánica. Podría equipararse a un suelo de algunas zonas áridas y semidesérticas.

En los cultivos de secano, para una lluvia anual de unos 400 mm, considerando un desplazamiento medio de la mediana de la distribución del monurón en función de la profundidad de 0,86 mm por mm de riego, vemos que el 50% queda distribuido entre los 34,5 primeros centímetros aproximadamente y estimando que la degradación anual del monurón en el suelo es de un 50% según los resultados y consideraciones anteriores, podemos inferir que la actividad residual de un año para otro en los cultivos de secano y dentro de la profundidad de la capa arable, se puede evaluar de un 20 a un 30% de la cantidad añadida inicialmente.

En los cultivos de regadío, suponiendo una altura de riego total de 1100 mm al año y un desplazamiento medio de la mediana de la distribución del monurón en profundidad de 1,11 mm por mm de riego, se puede inferir que al cabo de este periodo dicha mediana se encontraría situada a 122 cm de profundidad. Considerando que estos suelos frecuentemente son ricos en materia orgánica y con abundante humedad, la degradación del herbicida puede alcanzar valores del 70% según vimos en nuestros resultados experimentales. De estos datos podemos afirmar que la cantidad residual de herbicida de un año para otro, en la zona de actuación radicular, sería tan escasa que prácticamente no tendría importancia cuando el herbicida se hubiera aplicado en dosis selectivas y habría que estudiar en cada caso concreto, el residuo que quedaría si la aplicación del herbicida hubiera sido efectuada con dosis esterilizantes.

Para una zona árida con una pluviometría escasa (unos 200 mm) y un suelo arenoso y de bajo contenido en materia orgánica como el suelo III de nuestro estudio, la degradación anual se puede calcular en un 50% aproximadamente y el descenso de la mediana de la distribución del monurón en función de la profundidad, alcanza un valor medio de 1,77 mm por mm de riego, siendo el reparto muy homogéneo a lo largo de toda la zona ocupada. Como la pluviometría es tan escasa, el desplazamiento total es pequeño (35,4 cm) a pesar de la gran movilidad del herbicida en este tipo de suelos y será necesario tener en cuenta la actividad residual cuando el producto se aplique a

este tipo de suelos. No obstante, dada la aridez de las zonas con esta pluviometría, es dudosa la posibilidad de aplicación del producto en estas condiciones.

Como el efecto principal del monurón sobre las plantas radica en la inhibición del proceso fotosintético, este herbicida, puede repercutir directamente sobre la productividad de los cultivos y por esta razón, es necesario tener en cuenta la cantidad de herbicida presente en el suelo en cada momento. Esta cantidad, viene determinada por los residuos procedentes de los tratamientos anteriores y la cantidad añadida al cultivo considerado en el caso de que éste haya sido tratado.

El contenido en humedad y la cantidad de herbicida existentes en el suelo, determinan la concentración del producto en la solución acuosa y según el valor que alcance ésta en la zona de absorción radicular, se verá influenciada la absorción del herbicida por la planta.

Dada la constante variación del contenido en humedad del suelo, es difícil dar datos generales sobre el valor de absorción, ya que serán diferentes para cada estado.

Para efectuar un estudio concreto, se podrían utilizar las técnicas que hemos aplicado en nuestro trabajo, y a partir del contenido en humedad y de la cantidad de monurón presente en el suelo, que podría estimarse teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se podría determinar la cantidad

de herbicida en la zona de absorción radicular. Haciendo uso de las técnicas de trazadores radiactivos que se han descrito en este trabajo para cebada y judía, se puede calcular en un cultivo determinado, el grado de absorción en función de la concentración de la solución del suelo y la acumulación del producto en los órganos aéreos. Con este dato, se puede estimar el grado de inhibición del proceso fotosintético, teniendo en cuenta los coeficientes que se han determinado en el presente trabajo para las cinco especies de plantas estudiadas, o determinando de manera análoga, el correspondiente a cualquier otro cultivo.

## 6. CONCLUSIONES



Avena	0,7	milimoles de clorofila por cada milimol de						CMU.
Espinaca	81,4	"	"	"	"	"	"	
Cebada	363,6	"	"	"	"	"	"	

- En la absorción del CMU por las células vegetales, debe haber algún mecanismo de transporte activo capaz de elevar la concentración en el interior de las células hasta  $10^4$  veces la del exterior.
- Los cloroplastos de cebada son mucho más sensibles al CMU cuando están aislados que cuando están "in situ".
- Durante las cuatro primeras horas, la velocidad de absorción radicular de CMU, en plantas de cebada y judía, alcanza los valores más elevados.
- Las velocidades medias de absorción, en la fase inicial, para concentraciones de herbicida comprendidas entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , se pueden estimar en 1  $\mu\text{g}$  de herbicida por gramo de raíz y por hora. Comparando la velocidad de absorción de la judía y cebada, se observa que el valor alcanzado por la judía es superior al de cebada.
- Transcurrida la fase inicial de absorción, la velocidad se atenúa y el herbicida va pasando progresivamente al tallo y a la hoja, tendiendo a la estabilización a partir de un periodo inicial que oscila entre las 24 y 48 horas.

- El valor del "espacio libre aparente" en la judía, es aproximadamente el doble que en la cebada para este herbicida.
- Según los análisis microautorradiográficos, la concentración principal de CMU se localiza en la epidermis y parénquimas clorofílicos de las hojas y tallos.
- La absorción foliar del monurón tiene un valor muy bajo y está influenciada por la luz y la temperatura. En las condiciones óptimas de traslocación (25°C e iluminación continua), a las 72 horas el % traslocado de la cantidad inicialmente depositada fué del 13% en la cebada y del 15% en judía.
- El descenso relativo del monurón en función de la dosis de riego, expresada en mm de profundidad/mm de altura de riego para los suelos I, II, III y IV es de 0,87; 1,11; 1,77 y 0,85 respectivamente.
- La degradación del monurón en el suelo es escasa en comparación con la de otros herbicidas y depende principalmente del contenido en humedad. Los suelos empleados que estuvieron protegidos de la lluvia directa y mantenidos con la humedad ambiente, al cabo de 330 días se degradaron en un  $50 \pm 10\%$ . En el suelo con abundante contenido en materia orgánica y que estuvo mantenido constantemente con la humedad correspondiente a su capacidad de campo, se observó una degradación del monurón del 70% apro-

ximadamente.

- Para cultivos de secano, la cantidad de monurón remanente de un año para otro en el suelo, puede estimarse en un 20 a un 30% en la capa arable y para cultivos de regadío, la pérdida por arrastre y degradación es tan considerable que únicamente es digna de tener en cuenta la actividad remanente, para el caso de que las aplicaciones anteriores del herbicida se hubieran efectuado con dosis esterilizantes.

## 7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

1. H.C. Bucha and C.W. Todd. Science 114, 493, 1951.
2. A.R. Cooke. Weeds 4 : 397-398, 1956.
3. J.A.C. Wessels and Van der Veen, Biochim. Biophys. Acta, 19, 548, 1956.
4. P.W. Zimmerman and A.E. Hitchcock. Contribs. Boyce Thompson Inst. 12, 321, 1942.
5. H.E. Thompson, C.P. Swanson and A.G. Norman-Botan. Gaz., 107, 476, 1946.
6. H.E. Cupery, N.E. Searle and C.W. Todd. Fr. Pat. 1,034, 658 (to E.I. duPont de Nemours and Co). 1950.
7. G.L. McCall. Agric. Chem. 715, 42, 129, 1952.
8. H. Gaffron. Plant Physiology., 16. Academic Press, N.Y., 3-277, 1959.
9. H.C. Hodge, et al. AMA, Arch. In. Health 17 : 45-47, 1958.
10. S.S. Sharp, M.C. Swingle, G.L. McCall, M.B. Weed and L.E. Cowart. Agr. Chem., 8 (9), 56, 1953.
11. A.S. Loustalot, T.J. Muzik, and H.J. Cruzado, Agr. Chem., 8 (11), 52, 1953.

12. S. Dallyn, Proc. Northeast. Weed Control Conf., 8, 13, 1954.
13. R.P. Upchurch, W.C. Pierce. Weeds, 6, 24, 1958.
14. A.L. Abel, Chem. Ind. (London), 1106, 1957.
15. S.M. Lambert, J. Agric. Food Chem, 15, 572, 1967.
16. G.G. Briggs, Nature, 223, 1288, 1969.
17. L.W. Weldon and F.L. Timmins Weed, 9, 195, 1961.
18. T.J. Sheets, J. Agr. Food Chem, 12, 30, 1964.
19. L.L. Danielson and L.W. Easley. Proc. Seventh Annual Northeasten Weed Control Conf., 11-15, 1953.
20. T.J. Muzik, H.J. Cruzado, and A.J. Loustalot, Botan. Gaz., 116, 65, 1954.
21. R.E. Ogle and G.F. Warren, Weeds, 3, 257, 1954.
22. G.D. Hill, J.W. McGahen, H.M. Baker, D.W. Finnerty, and C.W. Bingeman, Agron. J., 47, 93, 1955.
23. J.W. Smith and T.J. Sheets, J. Agr. Food Chem., 16, 426, 1968.
24. R.L. Dalton, A.W. Evans and R.C. Rhodes, Weed. Control Conf., 8, 234, 1955.
25. R. Bartha and D. Pramer, Science, 156, 1617, 1967.

26. H. Geissbühler, C. Haselbach, H. Aebi and L. Ebner, Weed Res., 3, 277, 1963.
27. D.G. Crosby and Ming-Yu-Li "Herbicide Photodescomposition" Marcel de Kerk Ine. N.Y., 321-363, 1969.
28. L.S. Jordan, B.E. Day and W.A. Clerx, Proc. Western Weed Control Conf., 78, 1962.
29. D.G. Crosby, American Chemical Society, 152 nd Meeting, New York, 1966.
30. T.J. Sheets, Weed, 6, 413, 1958.
31. H.R. Sherburne and V.H. Freed, J. Agr. Food Chem., 2, 937, 1954.
32. A.S. Crafts and H.R. Drever, Weed, 8, 12, 1960.
33. L.S. Audus, in The Physiology and Biochemistry of herbicides (L.S. Audus, ed.), Academic Press, New York, 163-206, 1964.
34. J.H. Quastel and P.G. Sholefield. Appl. Microbiol., 1, 282-7, 1953.
35. M.G. Hale, F.H. Hulcher and W.E. Chappell, Weeds, 5, 331-41, 1957.
36. G. Raud, C. Tyssett and B. Vacher. Ann. Inst. Pasteur., 96, 242-4, 1959.

37. A.S. Crafts, "Translocation in Plants, Holt, Rinehart and Winston," New York, N.Y. 1961
38. A.S. Crafts and T.C. Brayer. Amer. J. Bot., 25, 529-535, 1938.
39. E. Epstein. Plant Physiology, 30, 529-536, 1955.
40. M. Fried and R.E. Shapiro. Annual Review of Plant Physiology, 12, 91-109, 1961.
41. J.E. Leggett and E. Epstein. Plant Physiology, 31, 222-226, 1956.
42. E. Epstein. Nature 212, 1324-1327, 1966.
43. P.M. Ray "La planta Viviente", 79-82, 1964.
44. H. Geissbühler. "Degradation of herbicides". MAI, 79-111, 1969.
45. H. Börner, Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. Sonderheft II, 41, 1964.
46. D.E. Bayer and S. Yamaguchi, Weeds, 13, 232, 1965.
47. G. Voss and H. Geissbühler, Proc. Brit. Weed Control Conf. 8 th, 1, 266, 1966.
48. A.S. Crafts "The Chemistry and mode of Action of Herbicides". Interscience Publishers, New York, N.Y. 1961.

49. H.I. Petersen "Isotopes in Weed Research", 27-29.  
IAEA. Viena STI/PVB/113, 1966.
50. E. Primo, P. Cuñat. "Herbicidas y Fitorreguladores".  
Ed. Aguilar. 1968.
51. G.D. Hill, I.J. Belasco and H.L. Ploog, Weeds, 13, 103,  
1965.
52. D.E. Bayer and H.R. Drever, Weed, 13, 222, 1965.
53. H. Chandler, Proc. Calif. Weed Conf., 15, 99, 1963.
54. C. Gomez Campo. Comunicación personal.
55. D.E. Moreland "Progress in Photosynthesis Research",  
Vol. III, 1693-1711, 1969.
56. A. Barth, H.J. Michel. Pharmazie, 24 (1), 11-23, 1969.
57. D.E. Moreland and K.L. Hill, Weeds, 11, 55, 284, 1963.
58. N.E. Good and S. Izawa. Record Chem. Progress, 25,  
225, 1964.
59. S. Izawa and N.E. Good. Biochim. Biophys. Acta, 20,  
102, 1965.
60. N.I. Bishop Biochim. Biophys. Acta, 27, 205, 1958.
61. A.T. Jagendorf. Brookhaven Symp. Biol., 11, 236-257, 1958.
62. F.M. Ashton, G.Zweig and G.M. Mason. Weeds 8, 448-54,  
1960.

63. M. Calvin. Science 135, 879, 1962.
64. W. Arnold and J. Thompson, J. Gen. Physiol., 39, 311, 1956.
65. W.E. Arthur and B.L. Strehler, Arch. Biochem. Biophys., 70, 507, 1957.
66. G. Tollin, E. Fujimori and M. Calvin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 1035, 1958.
67. R.P. Levine. "The Mechanism of Photosynthesis". Scientific American p.p., 58-70, Dec. 1969.
68. P.B. Sweetser, C.W. Todd and R.T. Hearsch. Biochim. Biophys. Acta, 51, 509-518, 1961.
69. D.W. Krogmann, Biochim. Biophys. Acta, 30, 655, 1958.
70. T. Asahi and A.T. Jagendorf. Arch. Biochim. Biophys. 100, 438, 1963.
71. L.N.M. Duysens, J. Amesz and B.M. Kamp. Nature, 190, p.p. 510-511, May 6, 1961.
72. L.N.M. Duysens, "La Photosynthese", Collog. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. Paris, 119, 75, 1963.
73. J. Lavorel, Biochim. Biophys. Acta, 88, 20, 1964.
74. G. Gingras, C. Lemasson and D.C. Fork, Biochim. Biophys. Acta, 79, 438, 1963.

75. G. Gingras and C. Lemasson. *Biochim. Biophys. Acta*, 67-68, 1965.
76. P.B. Sweetser, *Biochim. Biophys. Acta*, 66, 78, 1963.
77. P. Hormann and H. Gaffron, *Science*, 141, 905, 1963.
78. E.M. Solyanova, *Khim. Sel. Khoz.*, 7, (6), 451-2, 1969 (Russ.).
79. R.L. Cristoph and E.L. Fisk. *Bot. Gaz*, 116, 1-15, 1954.
80. W.H. Minshall. *Canad. J. Bot.* 38, 201-216, 1960.
81. L. Detroux y J. Gostinchar. "Los herbicidas y su empleo". edic. Oikos-Tau, S.A. Barcelona. 1966.
82. R.C. Brian. "The Physiology and Biochemistry of Herbicides". Ed. Audus. Acad. Press. London. N.Y. 1964.
83. S.C. Fang, V.H. Freed, R.H. Johnson, and D.R. Coffee. *J. Agr. Food Chem.*, 3, 400, 1955.
84. V.H. Freed, M. Montgomery and M. Kief, *Proc. Northeast, Weed Control Conf.*, 15, 6 1961.
85. J.W. Smith and T.J. Sheets, *J. Agr. Food. Chem.*, 15, 577, 1967.
86. I. Frear, J. Donald, *Science*, 162, (3854), 674-5, 1968.
87. V.H. Freed, *J. Agric. Food. Chem.* 1, 47-51, 1953.

88. J.W. Smith and T.J. Sheets, J. Agr. Food. Chem., 15, 577, 1967.
89. C.R. Swanson and H.R. Swanson, Weed, Sci., 16, 137, 1968.
90. Nuclear Chicago, "Preparation of samples for liquid scintillation counting", 1967. (Manual).
91. C. Palais. Intertechnique. "Une introduction au comptage par scintillation liquide". SLF. Ref: 12. 67. 001, 1967.
92. J. H. Baxter, L.E. Fanning and H.A. Swartz. International Journal of Applied Radiation and Isotopes, Vol., 15, p.p. 415-418, 1964.
93. D.G. Ott, C.R. Richmond, T.T. Trujillo and H. Foreman. Nucleonics. Vol., 17, No. 9, p.p., 106-108, 1959.
94. H.S. Cluley. Analyst. Vol., 87, p.p., 170-177, 1962.
95. A.S. Crafts and Shogo Yamaguchi. "The autorradiography of plant". University of California. 1963.
96. W. Van der Zweep. Weed Res., 1, 258-66.
97. G.A. Boyd, "Autorradiography in Biology and Medicine", Academic Press, New York, 1955.
98. A.W. Rogers, "Techniques of autoradiography", Elsevier Publishing Company. Amsterdam, 1967.

99. W.A. Jensen and M. Ashaton, *Plant Physiol.*, 35, 313-323, 1960.
100. D.L. Jofte and S. Warren, *J. Biol. Phot. Assoc.*, 23, 145, 1955.
101. M. Martinez, L. Ayerbe, J. Fernandez. *Técnica de histología vegetal*. E.T.S.I.A., Madrid, 1970.
102. D.A. Johansen. "Plant Microtechniques". McGraw-Hill. Book Company. N.Y. and London.
103. D.C. Abbott, K. W. Blake, K.R. Tarrant and J. Thomson, *J. Chromatog.*, 30, 136, 1967.
104. H.G. Henkel, *Chimia*, 18, 252, 1964.
105. Y. Kouchkousky. *Physiologic Vege.* 1, 4, 325-357. 1963.
106. F.R. Whatley and D.I. Arnon. Photosynthetic phosphorylation in plant. In *methods in enzymology*. S.P. Colowich and N.O. Kaplan, (Eds.). Vbl 6, p.p. 308-313. Academic Press, N.Y. 1963.
107. F.R. Whatley and D.I. Arnon. "Photosynthetic phosphorylation in plant". In *methods in enzymology*. S. P. Colowich and N.O. Kaplan. (Eds.), 6, p.p. 308-313. Academic Press, N.Y.
108. M. Calvin et. al. *Isotopic Carbon*, p. 178, J. Wiley and Sons., N.Y. 1954.

109. A. Murray, "Organic Syntheses with Isotopes," p.67, Interscience Publishers, N.Y. 1958.
110. M.S. Kharasch and O. Reinmuth. "Grignard reactions of nonmetallic substances". Prentice-Hall, Inc. N.Y. 1954.
111. C. Kao, H. Fang and P.P. t Sah, J. Chinese Chem. Soc., 3, 137, 1935.
112. Chem. Abstracts, 29, 6172, 1935.
113. A.V. Logan and N.R. Odell, Weeds, 2, 135, 1953.
114. H.C. Bucha and C.W. Porter, Science, 114, 493, 1951.
115. Imp. Bureau Soil Sci., Tech. Comm., 26, 1933.
116. W.B. Johnston, Airtorradiography of soil sections and its Application, Spil Sci., 78, 247-255, 1954.
117. J. Fernandez González. Tesis Doctoral Madrid. E.T.S.I.A. Madrid, 1969.
118. A. Moyse. La Photosynthese. III. 6, Fac. des Scien. D'Orsay. (Paris) 1967.
119. M. J. Geoghegan. New Phytol. 71-80. 56, 1957.
120. W.A. Gentner and J.L. Hilton. Weeds 8, 413-17, 1960.
121. R. Heller. Biologie Vegetale II, 353-357. Edit. Masson Paris, 1970.

ANEXO I

Abreviaturas y símbolos

ADP	adenosin-5'-difosfato.
ATP	adenosin-5'-trifosfato.
As	actividad específica.
<sup>14</sup> C	carbono-14.
°C	grado centígrado.
c	concentración.
Ci	curio.
cm	centímetro.
CMU	monurón (β-(p-clorofenil)1,1-dimetilurea)
c.p.m.	cuentas por minuto.
χ	chi de Pearson.
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
DL <sub>50</sub>	dosis letal cincuenta.
D.N.O.C.	2-metil-4-6 dinitrofenol.
D.O.	densidad óptica.
DPIP	2-6, diclorofenol indofenol.
d.p.m.	desintegraciones por minuto.
E	eficacia.
E <sub>o</sub>	potencial normal.
FMN	flavin mononucleótido.
g	gramo.
G <sup>o</sup>	energía libre.
Ha	hectarea.
H.V.	alto voltaje.
Kcal	kilocalorías.
Kg	kilogramo.

$\lambda$	lambda = $10^{-6}$ c.c.
M	molar.
mCi	milicurio.
ml	mililitro.
mm	milímetros.
msog	milisegundos.
$\mu$ Ci	microcurio.
$\mu$ M	micromol.
N	normal.
NADP	nicotin-adenin-dinucleótido fosfato.
nm	nanometro.
p-	para.
p.f.	punto de fusión.
pH	logaritmo decimal de la concentración de hidrogeniones cambiado de signo.
Pi	ortofosfato (inorgánico).
PI	poder inhibidor.
PI <sub>50</sub>	poder inhibidor cincuenta.
POPOP	2-p-fenilenbis-(5-feniloxazol).
PPNR	piridin nucleótido reductasa (fotosintética).
p.p.m.	parte por millón.
PPO	2,5-difeniloxazol.
Rf	cociente entre el desplazamiento cromatográfico de un compuesto y el desplazamiento del frente del disolvente.
(sp)	especie.

$T_{\frac{1}{2}}$  intervalo de tiempo que se tarda en alcanzar  
el 50% de la reducción máxima del DPIP.

$V_r$  velocidad de reacción.

(v:v) relación de volúmenes.

ANEXO II

Indice de tablas

		Pag
I	Compuestos derivados de la urea usados como herbicidas. Propiedades fisico-químicas. . .	6
II	Solubilidad del CMU en diferentes disolventes	7
III	Proporción relativa de metabolitos detectados en diferentes especies vegetales procedentes de la degradación del monurón- <sup>14</sup> C .	34
IV	Composición de las soluciones centelleadoras.	36
V	Valores experimentales y teóricos del rendimiento de contaje R (expresado en %), en función del "quenching" (expresado por medio del cociente Q. . . . .)	40
VI	Componentes añadidos a cada cubeta según tratamiento . . . . .	60
VII	Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de judía en función de la concentración de CMU. (Los valores expresan los $\mu\text{M}$ de DPIP que son reducidos por $\mu\text{M}$ de clorofila. Contenido en clorofila: 1,28 $\cdot 10^{-2}$ $\mu\text{M}/\text{ml}$ . . . . .)	63
VIII	Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de alfalfa en función de la concentración de CMU. (Los valores expresan los $\mu\text{M}$ de DPIP que son reducidos por $\mu\text{M}$	

	Pag
de clorofila). Contenido en clorofila: 1,28 · 10 <sup>-2</sup> uM/ml . . . . .	64
IX Cinética de la reducción del DPIP por clo- roplastos aislados de avena en función de la concentración de CMU. (Los valores ex- presan los uM de DPIP que son reducidos por uM de clorofila). Contenido en clorofi- la: 1,28 · 10 <sup>-2</sup> uM/ml. . . . .	65
X Cinética de la reducción del DPIP por clo- roplastos aislados de espinaca en función de la concentración de CMU. (Los valores ex- presan los uM de DPIP que son reducidos por uM de clorofila). Contenido en clorofila: 5,77 · 10 <sup>-3</sup> uM/ml. . . . .	66
XI Cinética de la reducción del DPIP por clo- roplastos aislados de cebada en función de la concentración de CMU. (Los valores ex- presan los uM de DPIP que son reducidos por uM de clorofila). Contenido en clorofila: 1,08 · 10 <sup>-2</sup> uM/ml. . . . .	67
XIII Velocidad inicial de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de las diferentes especies vegetales. Los valores se expresan en micromoles de DPIP reducido por minuto y por micromol de clorofila , . . . . .	69

XIII	Valores de $Y_M$ (cantidad máxima de DPIP reducido, expresado en $\mu\text{M}/\mu\text{Mol}$ de clorofila) y $T_{\frac{1}{2}}$ (intervalo de tiempo que se tarda en alcanzar el 50% de la reducción máxima del DPIP), para cada planta en función de la concentración de CMU . . . . .	71
XIV	Valores teóricos y experimentales de $V_r$ , expresados en micromoles de DPIP por minuto y por micromol de clorofila . . . . .	75
XV	% de inhibición de la fotosíntesis en función de la concentración de CMU para las diferentes plantas estudiadas . . . . .	76
XVI	Relación molecular CMU/clorofila para un $PI_{50}$ (valor teórico), en las distintas especies estudiadas . . . . .	77
XVII	Solución nutritiva de Hoagland . . . . .	92
XVIII	Concentración del herbicida en la solución nutritiva . . . . .	93
XIX	Cantidad de CMU fijado por los distintos órganos de plantas de cabada, en función del tiempo de absorción y según la concentración del herbicida en la solución nutritiva. Los valores se expresan en $\mu\text{g}$ de CMU por gramo de materia fresca . . . . .	95

XX	Cantidad de CMU fijado por los distintos órganos de plantas de judía en función del tiempo de absorción y según la concentra- ción del herbicida en la solución nutritiva. Los valores se expresan en ug de CMU por gramo de materia fresca. . . . .	96
XXI	Valores de la absorción activa y total de CMU por raíces aisladas de cebada . . . . .	99
XXII	Valores de la absorción activa y total de CMU por raíces aisladas de judía . . . . .	100
XXIII	Estimación del valor del "espacio libre aparente" para el CMU absorbido por plantas de judía y cebada. . . . .	101
XXIV	Característica de las soluciones nutri- tivas empleadas según las dosis de CMU-2- <sup>14</sup> C .	103
XXV	Concentración de CMU en hojas de cebada después de 7 días de absorción radicular. Concentración de clorofila referida al volumen acuoso $9,5 \times 10^{-5}$ mM/ml . . . . .	106
XXVI	Concentración de CMU en hojas de judía después de 7 días de absorción radicular. Concentración de clorofila referida al volumen acuoso $4,7 \times 10^{-4}$ mM/ml . . . . .	107

XXVII	Absorción foliar en hojas de cebada y judía tratadas con 6 $\mu\text{g}$ de CMU-2- $^{14}\text{C}$ . Actividad depositada 0,13 uCi. Plantas mantenidas en iluminación continua. Los valores expresan el % de CMU traslocado con respecto al total depositado . . . . .	109
XXVIII	Absorción foliar en hojas de cebada y judía tratadas con 6 $\mu\text{g}$ de CMU-2- $^{14}\text{C}$ . Actividad depositada 0,13 uCi. Plantas mantenidas en obscuridad completa a lo largo de la experiencia. Los valores expresan el % de CMU traslocado con respecto al total depositado. . . . .	110
XXIX	Análisis de suelos . . . . .	113
XXX	Capacidad de campo para los diferentes suelos . . . . .	115
XXXI	Distribución de la actividad para un riego de 15 mm. . . . .	117
XXXII	Distribución de la actividad para un riego de 30 mm. . . . .	118
XXXIII	Distribución de la actividad para un riego de 60 mm. . . . .	119

	Pag	
XXXIV	Descenso de la actividad del monurón- -2- <sup>14</sup> C (CMU), en función del tiempo, en diferentes suelos . . . . .	122
XXXV	Conteo de microorganismos totales . . . . .	123
XXXVI	Valores de la relación entre la profun- didad media alcanzada por el monurón y la altura de riego en los distintos sue- los calculados para el riego de 60 mm . . .	135

ANEXO III

Indice de figuras

1. Esquema del proceso de absorción pasiva y activa en la célula vegetal. El espacio libre y la barrera de difusión tienen una existencia aparente más que real.
2. Esquema de los posibles caminos de penetración de las sustancias nutritivas a través de la raíz. (Esquema según P. Martin Ray).
3. Esquema de la reducción del NADP por los electrones procedentes del  $H_2O$  en la fase luminosa de la fotosíntesis.
4. Espectros de la emisión del  $^{14}C$  (línea continua) y de los electrones Compton liberados por la fuente de  $^{137}Cs$  (línea de trazos), para muestras con diferente extinción. (El quenching crece de la muestra 1 a la 4).
5. Curva de calibrado del espectrómetro Intertechnique SL 30 que relaciona el rendimiento de contaje con el cociente  $Q$  para estandarización externa con una fuente de  $^{137}Cs$ ; siendo  $Q$  la relación de c.p.m. corregidas entre C-D y D-E.
6. Curva de calibrado del espectrómetro Packard 314 E para determinar el voltaje de trabajo con una anchura de ventana de (10-50) y una ganancia máxima.
7. Relación c.p.m./actividad para el espectrómetro Packard 314 E en las condiciones de operación y utilizando la solución A como centelleadora.

8. Sistema para obtener plantas deshidratadas por el procedimiento de congelación-deseccación.
9. Esquema del montaje para utilizar la técnica de congelación-deseccación-inclusión.
10. Conjunto de baño y sistema de iluminación-refrigeración para el estudio de la fotosíntesis en cloroplastos aislados.
11. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de judía.
12. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de alfalfa.
13. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de cobada.
14. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de avoca. . .
15. Cinética de la reducción del DPIP por cloroplastos aislados de ospinaoa.
16. Relación entre la velocidad inicial de reducción del DPIP por micromol de clorofila y la concentración de CMU, para las distintas plantas.
17. Esquema del aparato de carbonatación de Grignard.

18. Autorradiografías de los radiocromatogramas de CMU-2-<sup>14</sup>C y ácido p-clorobenzoico-<sup>14</sup>C efectuadas en capa fina de gel de sílice.
19. Cantidad de CMU fijado por la raiz y partes aéreas de cebada en función del tiempo de absorción y la concentración del herbicida.
20. Cantidad de CMU fijado por la raiz, tallo y hojas de judía en función del tiempo de absorción y la concentración del herbicida.
21. Cinética de la absorción activa y total de CMU, por raíces aisladas de cebada.
22. Cinética de la absorción activa y total de CMU, por raíces aisladas de judía.
23. Autorradiografías que muestran la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C, en plantas de judía, a las 0,5; 1; 4; 24; 48 y 72 horas de absorción radicular. Dosis de herbicida 1,5 Kg/Ha. t<sup>o</sup> 25°C.
24. Autorradiografías que muestran la distribución de monurón-2-<sup>14</sup>C, en plantas de cebada, a las 0,5; 1; 4; 24; 48 y 72 horas de absorción radicular. Dosis de herbicida 1,5 Kg/Ha. t<sup>o</sup> 25°C.
25. Detalle de la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C en raiz de judía. Microautorradiografía de sección transversal.

26. Microautorradiografía que muestra la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C en hojas de judía.
27. Microautorradiografía que muestra la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C en sección transversal de hojas de cebada.
28. Microautorradiografía que muestra la localización del monurón-2-<sup>14</sup>C en la zona epidérmica del tallo de judía. Sección longitudinal.
29. Autorradiografía que muestra la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Temperatura durante la experiencia 5°C. Plantas iluminadas con 6500 lux.
30. Autorradiografía que muestra la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Temperatura durante la experiencia 15°C. Plantas iluminadas con 6500 lux.
31. Autorradiografía que muestra la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Temperatura durante la experiencia 25°C. Plantas iluminadas con 6500 lux.

32. Autorradiografía que muestra la distribución del monurón-2-<sup>14</sup>C en plantas de judía y cebada, a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento foliar. Actividad depositada 0,13  $\mu$ Ci. Temperatura durante la experiencia 25°C. Plantas mantenidas en la obscuridad.
33. Emigración vertical del CMU en el suelo I para las distintas dosis de riego.
34. Emigración vertical del CMU en el suelo II para las distintas dosis de riego.
35. Emigración vertical del CMU en el suelo III para las distintas dosis de riego.
36. Emigración vertical del CMU en el suelo IV para las distintas dosis de riego.
37. Degradación del CMU-2-<sup>14</sup>C en el suelo I en función del tiempo.
38. Degradación del CMU-2-<sup>14</sup>C en el suelo II en función del tiempo.
39. Degradación del CMU-2-<sup>14</sup>C en el suelo IV en función del tiempo.
40. Degradación del CMU-2-<sup>14</sup>C en el suelo III en función del tiempo.

41. Degradación del CMU-2-<sup>14</sup>C en el suelo II, mantenido en condiciones de humedad correspondiente a su capacidad de campo.
42. Registro gráfico de la radiocromatografía correspondiente a un patrón de CMU-2-<sup>14</sup>C disuelto en etanol.
43. Registro gráfico de la radiocromatografía correspondiente al extracto alcohólico del suelo I a los 300 días de tratamiento con CMU-2-<sup>14</sup>C.
44. Registro gráfico de la radiocromatografía correspondiente al extracto alcohólico del suelo II a los 300 días de tratamiento con CMU-2-<sup>14</sup>C.
45. Registro gráfico de la radiocromatografía correspondiente al extracto alcohólico del suelo III a los 300 días de tratamiento con CMU-2-<sup>14</sup>C.
46. Registro gráfico de la radiocromatografía correspondiente al extracto alcohólico del suelo IV a los 300 días de tratamiento con CMU-2-<sup>14</sup>C.
47. Registro gráfico de la radiocromatografía correspondiente al extracto alcohólico del suelo II, mantenido en condiciones de humedad correspondiente a su capacidad de campo a los 300 días de tratamiento.
48. Radiocromatogramas de los extractos de los ~~cuatro~~ suelos a los 30, 60, 210 y 330 días de tratamiento. (P: Patrón de CMU-2-<sup>14</sup>C; 2H: extracto del suelo II mantenido en condiciones de humedad constante correspondiente a su capacidad de campo.)