

Comportamiento químico del herbicida profoxidim y su formulado AURA. Efecto en *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

Pilar Sandín-España¹, Mercedes Villarroya-Ferruz¹, Carmen López-Goti¹,
María José Patiño-Ropero¹, José Luis Alonso-Prados¹, María Inés Santín-Montanyá^{2,✉}

¹DTEVPF-Unidad de Productos Fitosanitarios
²Dpto. de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. de la Coruña, Km 7.5, Madrid 28040
✉ isantin@inia.es

Resumen: En este trabajo se ha estudiado el comportamiento químico del herbicida profoxidim y de su formulado Aura. Los resultados muestran que en ambas sustancias la degradación del herbicida es muy rápida con tiempos de vida media inferiores a un día, por lo que será poco probable encontrar este herbicida en el medio ambiente. El estudio de sus productos de degradación nos permitió identificar productos resultantes de su isomerización y su oxidación. También, se ha observado que el perfil y evolución de estos compuestos va a depender en gran medida de la formulación y las condiciones ambientales. Además, se realizaron bioensayos de germinación de semillas para determinar el efecto del profoxidim en el crecimiento de raíz y coleoptilo de la especie *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Se obtuvieron las curvas dosis-respuesta de este herbicida y se calcularon los valores de EC₅₀.

Palabras clave: profoxidim, formulado, degradación, productos de degradación, bioensayo.

1. INTRODUCCIÓN

El herbicida profoxidim pertenece a la familia de las ciclohexanodionas (herbicidas inhibidores de la ACCasa) para el control de malas hierbas en el cultivo del arroz. Su producto formulado y comercializado por la empresa BASF es Aura, y contiene 200 g L⁻¹ de sustancia activa.

Esta familia de herbicidas se caracteriza por una rápida degradación en el medio con el fin de disminuir sus residuos en suelo y agua (Sevilla-Morán et al., 2014, Bridges et al., 1991). Estudios previos de herbicidas de esta familia demuestran que su principal ruta de degradación en agua es la fotolítica, presentando vidas medias de fotodegradación de horas o minutos (Sandín-España et al., 2013; Sevilla-Morán et al., 2014).

Una vez aplicado en el cultivo de arroz, el profoxidim puede degradarse en el agua por factores abióticos, principalmente la luz y la temperatura, dando lugar a la formación de productos de transformación. En general, los productos de degradación son difíciles de detectar, ya que no se dispone de patrones analíticos de todos ellos para identificarlos y se encuentran en dosis bajas. Además, en muchos casos, su naturaleza dificulta su análisis (Sandín-España et al., 2015a).

Por otra parte, en muchas ocasiones, los estudios de laboratorio se llevan a cabo con la sustancia activa, por lo que se dispone de poca información sobre el comportamiento del compuesto formulado que es el que se aplica en el cultivo. Sin embargo, las sustancias co-formulantes podrían afectar al comportamiento de la sustancia activa y a los productos de degradación que se forman (Sevilla-Morán et al., 2017), por lo que es de gran interés la realización de estudios de comportamiento con el formulado.

En este contexto, uno de los objetivos del presente trabajo fue comparar el comportamiento químico del herbicida profoxidim y su formulado Aura en cámara de crecimiento en condiciones reproducibles con parámetros controlados, simulando condiciones ambientales de campo. Por

otra parte, se ha realizado un estudio comparativo de la evolución de los productos de degradación formados que se han detectado con ambas sustancias. Otro objetivo de este estudio fue determinar la curva dosis-respuesta del profoxidim en la especie de mala hierba *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., de gran importancia en el cultivo del arroz.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Comportamiento químico del profoxidim y su formulado Aura. Para estudiar el comportamiento químico de las sustancias profoxidim y Aura se pusieron disoluciones acuosas de ambas sustancias en placas Petri con una concentración de 17 mg L^{-1} , que corresponde a la dosis de campo (1 L Ha^{-1}), y se colocaron en cámara de crecimiento con unas condiciones óptimas para el crecimiento de la mala hierba *Echinochloa* spp. Dichas condiciones consisten en un fotoperiodo y termoperiodo de 16 horas de luz (Luminosidad: $210\text{-}230 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y 8 horas de oscuridad a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, y una humedad relativa de 70-80%. A diferentes días, se tomaron alícuotas de $100 \mu\text{L}$ de las placas Petri y se analizaron mediante cromatografía líquida con detector de diodo-array (Agilent Technologies, series 1200) para determinar la concentración existente en cada momento del herbicida así como los productos de degradación que se van formando a medida que desaparece la sustancia activa. Se tomaron muestras durante siete días. Para realizar estos estudios nuestro grupo de investigación desarrolló dos métodos analíticos. El primer método, empleado únicamente para el estudio cinético de degradación del profoxidim, fue un método isocrático empleando acetónitrilo/agua 90/10 (0,1% ácido fórmico). El segundo método cromatográfico, desarrollado para la detección de los productos que se forman, fue un método en gradiente desde el 23% al 90% de acetónitrilo y una duración de 35 minutos.

En ambos métodos la columna empleada para la separación de los compuestos fue una columna en fase reversa C18 Water Atlantis T3 de $4,6 \times 150 \text{ mm}$, y el volumen de inyección de $50 \mu\text{L}$. La longitud de onda óptima para el profoxidim fue de 254 nm .

2.2. Curva dosis-respuesta con profoxidim en *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Además, se estudió la respuesta de la especie de mala hierba *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. a diferentes concentraciones de la sustancia activa profoxidim, mediante un bioensayo de germinación en placa Petri, en cámara de crecimiento. El bioensayo se llevó a cabo con una solución madre de 5 mg L^{-1} de profoxidim a partir de la cual se elaboraron las siguientes diluciones: 0 - 0,005 - 0,01 - 0,02 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 mg L^{-1} de la sustancia activa, basadas en un «screening» preliminar en laboratorio para mostrar el parámetro biológico más sensible a la acción del herbicida. En cada placa se colocaron 50 semillas de una población de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. sobre dos discos de papel de filtro. Las placas con las semillas se mantuvieron cerradas durante 3 días, transcurridos los cuales se abrieron y se pasaron a una bandeja con papel de filtro humedecido que se cubrió con plástico transparente para mantener la humedad y para que el coleoptilo tuviera espacio para su crecimiento, y se cuantificaron los efectos en el crecimiento de la radícula y el coleoptilo de las plantas a los 8 días. El bioensayo se llevó a cabo en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones de iluminación, temperatura y humedad relativa descritas anteriormente.

Los datos de crecimiento de raíz y longitud de coleoptilo de la especie de mala hierba objeto del estudio se ajustaron a un modelo log-logístico (Seefeldt et al., 1995). Se obtuvo la ecuación

de Seefeldt, comúnmente utilizada en los bioensayos para describir las relaciones dosis-respuesta entre planta y herbicida. La expresión matemática utilizada que relaciona la respuesta Y con la dosis de herbicida X es:

$$\text{LOG-LOGISTIC: } Y=C+ ((D-C)/ (1+\exp (b * \text{LOG} (X)-\text{LOG} (EC_{50}+1))))$$

Donde C es la asíntota menor, D la asíntota mayor, b la pendiente de la curva alrededor de la EC_{50} , y EC_{50} es la dosis a la que obtenemos un 50% de la respuesta.

Todos los análisis fueron realizados utilizando Statgraphics Plus v.5.0 software (Copyright © 1994-2000 Statistical Graphics Corp. STATPOINT Technologies, Inc. USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Comportamiento químico del profoxidim y su formulado Aura. La figura 1 muestra la cinética de degradación de la sustancia activa profoxidim y su formulado Aura durante 7 días. En ambos casos, las cinéticas se ajustan muy bien a una cinética de primer orden ($r^2 \geq 0,99$). En primer lugar, se puede observar que la degradación del herbicida en ambos casos es relativamente rápida. La vida media para la sustancia activa pura fue de 0,90 días. Sin embargo, la vida media de la sustancia activa en el formulado es inferior, 0,23 días, acelerándose su disipación. Este efecto podría atribuirse a la presencia de adyuvantes con grupos aromáticos que podrían actuar como fotosensibilizadores (Sevilla-Morán et al., 2017). En paralelo, se realizó un estudio en oscuridad, mostrando una mínima disipación del herbicida por lo que la ruta principal de degradación es la fotolítica. Esta ruta de degradación también se ha observado que es la principal para otros herbicidas de la familia de las ciclohexanodionas (Sandín-España et al., 2015a; Sevilla-Morán et al., 2014).

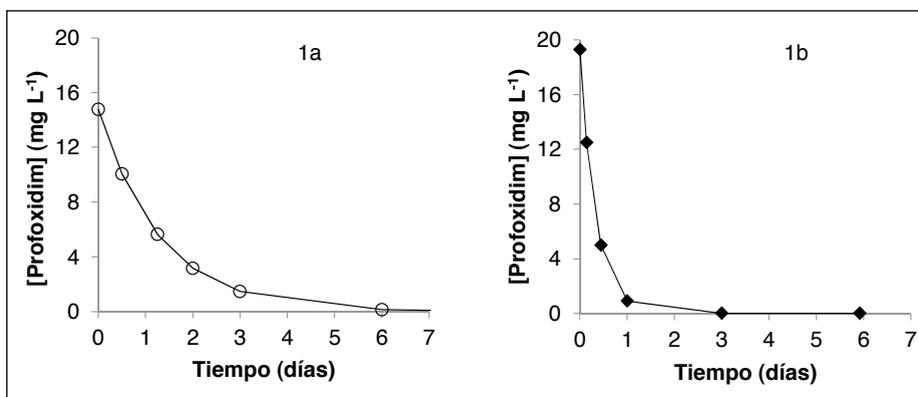


Figura 1. Degradación del profoxidim (1a) y su formulado Aura (1b) en cámara de crecimiento.

Con respecto a los productos de degradación formados, en estudios previos en laboratorio en aguas naturales (datos no publicados) se identificaron hasta 7 metabolitos mediante HPLC-Qtof-MS. Los compuestos detectados en el presente estudio se compararon con los compuestos identificados anteriormente. En las condiciones de degradación en cámara solamente se han

detectado 3 productos a concentraciones significativas de los identificados previamente, siendo los 4 restantes encontrados a niveles traza tanto en la sustancia pura como en el formulado. Estos 3 compuestos son el resultado de reacciones de isomerización de la forma *E* al isómero *Z* (P3), y la oxidación del átomo de azufre tanto en el isómero *E* como en el *Z*, formándose los correspondientes sulfóxidos (P1 y P2). En la figura 2a se muestra el cromatograma de la degradación de profoxidim a las 48 horas en cámara y en la figura 2b la estructura química de las moléculas detectadas. Todos estos compuestos son más polares que el profoxidim, aumentando su solubilidad en agua. La proporción en la que se encuentran estos compuestos en las muestras analizadas de profoxidim puro y formulado son diferentes disminuyendo la proporción de sulfóxidos en el formulado. Esto puede ser debido a que los compuestos presentes en el formulado influyen en la degradación de los metabolitos y/o en los mecanismos de reacción.

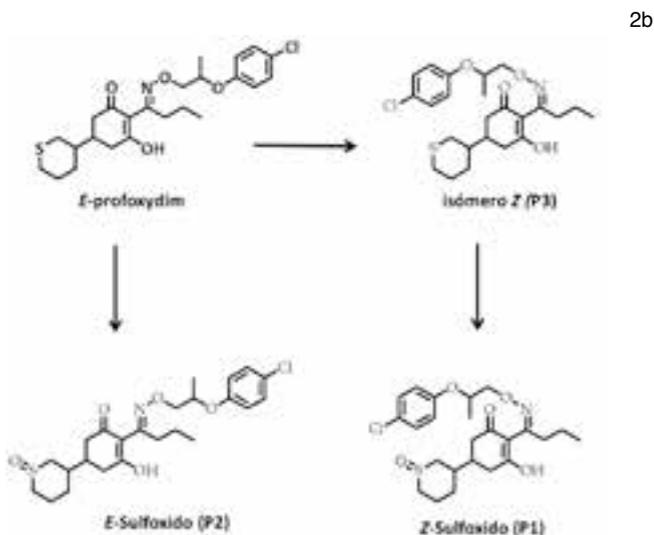
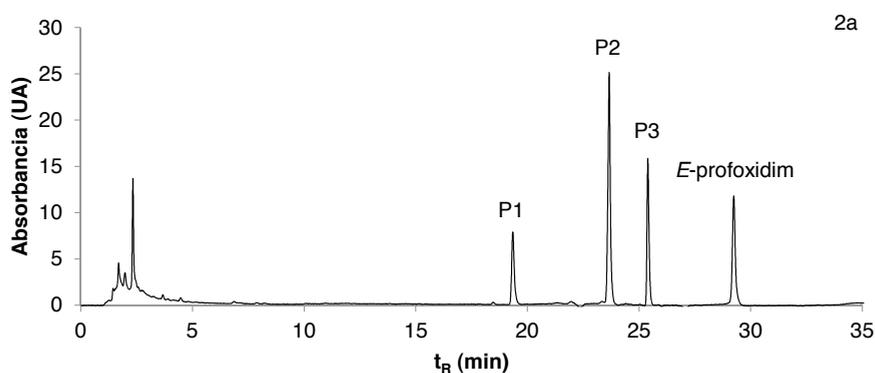


Figura 2. 2a) Cromatograma HPLC-DAD ($\lambda=254$ nm) de la muestra degradada de profoxidim a las 48 horas; 2b) Estructura química de los productos de degradación detectados en la degradación de profoxidim puro y profoxidim formulado.

3.2. Curva dosis-respuesta con profoxidim en *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Respecto a los bioensayos de germinación, podemos observar como hubo efecto fitotóxico significativo por la aplicación de distintas concentraciones de profoxidim, tanto en los parámetros de la raíz como en el coleoptilo de la especie ensayada, siendo dicho efecto mayor en la raíz que en el coleoptilo (Fig. 3). El efecto fue significativamente mayor a partir de 0,01 mg L⁻¹ de profoxidim en la elongación de la raíz (la EC₅₀ obtenida fue de 0,017 y 0,019 mg L⁻¹ en cada bioensayo). En el crecimiento del coleoptilo, dicho efecto se estimó a partir de 0,3 mg L⁻¹ del compuesto herbicida (con un valor de EC₅₀ de 0,32 y 0,42 mg L⁻¹).

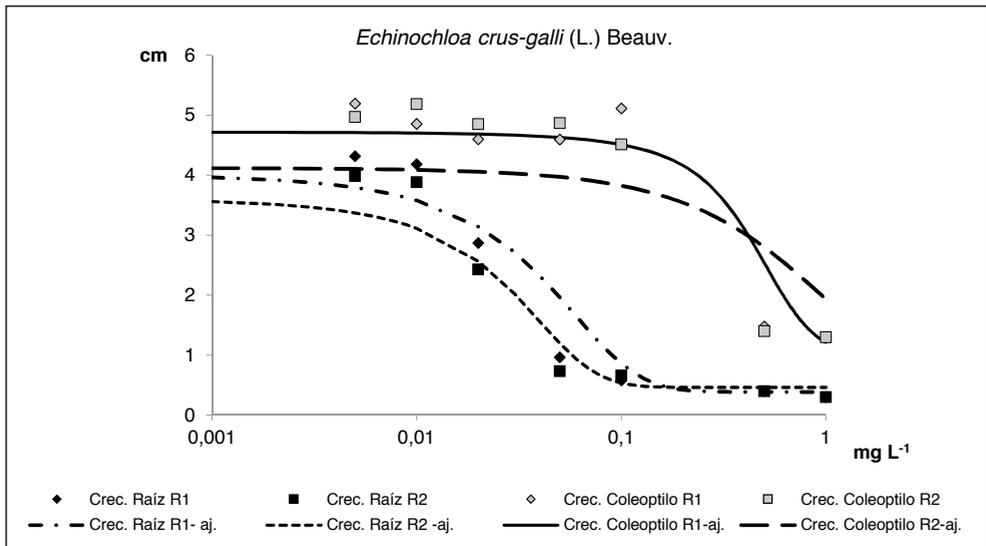


Figura 3. Curvas dosis-respuesta al profoxidim del crecimiento de raíz y coleoptilo de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. obtenidas en los bioensayos de germinación.

A la luz de lo expuesto, es necesario hacer estudios y desarrollar metodologías sencillas que permitan la evaluación del impacto medioambiental de estos productos basándose en datos científicamente contrastados. En este sentido, los ensayos biológicos ofrecen una información práctica, al basarse en la observación de la respuesta de la planta al herbicida y ampliar nuestro conocimiento sobre la presencia y el destino de los herbicidas en las plantas (Sandín-España et al., 2015b; Reineke et al., 2002).

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la presencia de los co-formulantes en el destino de una sustancia activa una vez aplicada en el campo. Además, se ha observado que las concentraciones a las que se encuentran los productos de degradación varían cuando la sustancia se encuentra pura o en el formulado así como cuando se realizan los experimentos en diferentes condiciones ambientales. Por otra parte, debido a la rápida degradación de este herbicida, sería poco probable encontrar residuos de profoxidim en las diferentes matrices medioambientales. Por último, la curva dosis-respuesta en *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. muestra que el parámetro biológico más sensible a la acción del herbicida es el crecimiento de raíz.

4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2014-00044-00-00.

5. REFERENCIAS

- Bridges DC, Smith AE and Falb LN (1991). Effect of adjuvant on foliar absorption and activity of clethodim and polar degradation products of clethodim. *Weed Science*, 39, 543-547.
- Reineke N, Bester K, Huhnerfuss H, Jastorff B and Weigel S (2002). Bioassay-directed chemical analysis of river Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*, 47, 717-723.
- Sandín-España P, Sevilla-Morán B, Calvo L, Mateo-Miranda M and Alonso-Prados JL (2013). Photochemical behavior of alloxidim herbicide in environmental waters. Structural elucidation and toxicity of degradation products. *Microchemical Journal*, 106, 212-219.
- Sandín-España P, Sevilla-Morán B, López-Goti C, Mateo-Miranda MM and Alonso-Prados JL (2015a). Identification of sethoxydim degradation products in natural waters under different light sources by HPLC-QTOF-MS. *Microchemical Journal*, 119, 6-10.
- Sandín-España P, Sevilla-Morán B, Villaroya-Ferruz M, Alonso-Prados JL and Santín-Montanyá MI (2015b). Comparative phytotoxicity assays of the herbicide alloxidim and its main identified photo-product in cereal and broadleaves crops. *Weed Science*, 63, 377-387.
- Seefeldt SS, Jensen JE, Patrick Fuerst E (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 9, 218-225.
- Sevilla-Morán B, Calvo L, López-Goti C, Alonso-Prados JL and Sandín-España P (2017). Photodegradation behaviour of sethoxydim and its commercial formulation Poast® under environmentally-relevant conditions in aqueous media. Study of photoproducts and their toxicity. *Chemosphere*, 168, 501-507.
- Sevilla-Morán B, López-Goti C, Alonso-Prados JL and Sandín-España P (2014). Aqueous photodegradation of sethoxydim herbicide: Qtof elucidation of its by-products, mechanism and degradation pathway. *Science of the Total Environment*, 472, 842-850.

Chemical behaviour of the herbicide profoxydim and its formulated Aura. Effect on *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

Summary: In this work, we have studied the chemical behavior of the herbicide profoxydim and its formulated Aura. The results showed that in both samples the degradation of the herbicide is quick with half-lives less than one day, so it will be difficult to find this compound in the environment. Regarding degradation products, we could identify three major compounds that are the result of reactions of isomerization and oxidation of the sulfur atom. Besides, the concentration and evolution of degradation products depends to a great extent on the formulation and the environmental conditions. In addition, seed germination bioassays were conducted to determine the effect of profoxydim on root and coleoptile elongation of the species *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. We obtained the doses-response curves of this herbicide and calculated the EC₅₀ values.

Keywords: profoxydim, formulated, degradation, degradation products, bioassay.