

Técnicas utilizadas en la aplicación de un herbicida marcado con C^{14} (1)

POR

JUAN JOSÉ COSTA (*), RODOLFO ANTONIO GHELFI (**), EDGARDO OSCAR BREZNONI (***)

RESUMEN

Se emplearon técnicas aplicables al estudio de los aspectos que más corrientemente figuran en la literatura sobre trabajos con 2,4-D: aplicación del producto en la planta, autorradiografías para observar penetración y traslación y mediciones de actividad para evaluar la cantidad de radioisótopo absorbido en porcentaje de la cantidad total aplicada, teniendo como base el producto sintetizado y formulado en las condiciones de uso en nuestro país, ya que no se permite la importación de herbicidas elaborados a base de 2,4-D.

Las autorradiografías indicaron en general una limitada distribución de la actividad del producto para todas las dosis aplicadas; las mediciones de actividad evidenciaron una localización de productos marcados en la planta, 5 días después del tratamiento, cuya cantidad de radioisótopo fue aproximadamente la sexta parte de la dosis original.

(*) Ing. Agr., Profesor Asociado del Departamento de Patología Vegetal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires y Secretario del Centro de Radiobiología de la misma institución.

(**) Ing. Agr., Jefe de la División Aplicaciones Agrícolas. Gerencia de Energía. C. N. E. A.

(***) Técnico subprofesional de la citada División y estudiante de Agronomía de la F. A. V. de Buenos Aires.

(1) Trabajo realizado en el Centro de Radiobiología de acuerdo con el convenio suscripto con la Comisión Nacional de Energía Atómica.

SUMMARY

They were applied some techniques to study the most common subjets that are included on the bibliography about works using 2,4-D: application to the plants, autoradiographs to study penetration and translocation and measurements of activity to evaluate the amount of uptaken radioisotope as a percentage of the total amount applied, having like base the synthesized and formulated product under the conditions of applications in the Argentina where is forbidden the entry of 2,4-D elaborated herbicides.

The autoradiographs indicated a general limited distribution of the radioactivity for all the doses applied; the activity measurements showed also a localization of labeled compounds in the plant; the amount of the radioisotope present in those compounds, five days after the treatment, was approximately one sixth of the original dose.

MATERIAL UTILIZADO

El herbicida marcado se adquirió en forma de ácido al Radiochemical Centre Amersham (Inglaterra) recibíendose en solución bencénica contenido en un tubo cerrado bajo nitrógeno y reuniendo las siguientes características: 500 microcuries en 5,1 mg del producto, con una actividad específica de 21,7 mC/mM.

Salvo los períodos en que se trabajó con el material éste fué conservado en el congelador de una heladera común (-7 a -8°C) con el fin de evitar los efectos de la radiólisis (1) que ocurren en los compuestos de alta actividad específica al existir colisiones y emisión de radiaciones.

Respondiendo al deseo de utilizar el herbicida bajo la misma forma química que se emplea en las pulverizaciones a campo, el ácido diclorofenoxiacético fué pasado a su éster butílico en la División Moléculas Marcadas del Departamento de Química de la Dirección de Investigaciones Científicas (Jefe Dr. A. E. Mitta) C. N. E. A.

Para abrir el tubo, éste fué colocado en posición vertical y se utilizó una sierra para ampollas de vidrio; el contenido fué volcado dentro de un balón pequeño al que también se incorporaron los lavados hechos con benceno en la ampolla original; la evaporación del benceno se hizo de inmediato bajo campana, haciendo burbujear suavemente N sobre la superficie de la solución, que fué calentada a 50°C en baño de agua (2).

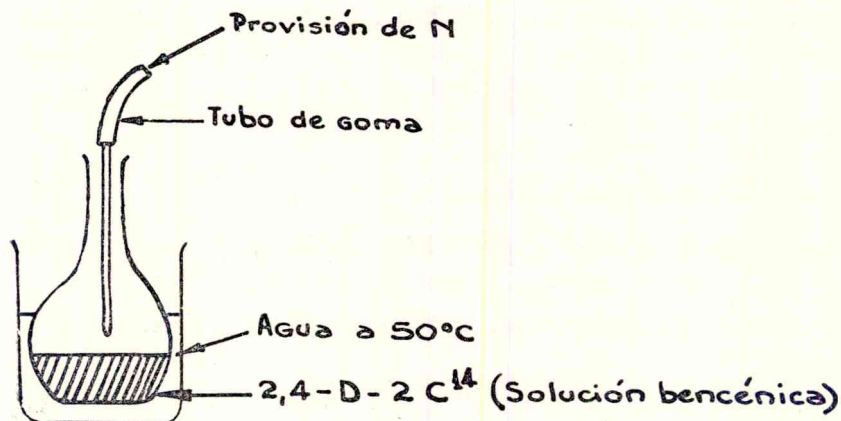
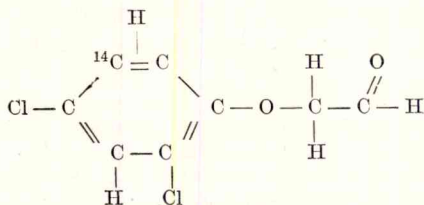
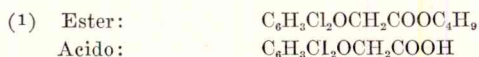


Fig. 1 — Esquema del sistema de evaporación empleado.

Seguidamente el ácido fué esterificado en la División Moléculas Marcadas, que desarrolló la técnica necesaria para ello.

El producto entregado respondió a las siguientes características: 132 mg de éster butílico de 2,4-D-2C¹⁴ ⁽¹⁾ correspondientes a 115,1 mg del ácido (cantidad completada con producto no marcado o portador) en 22 ml de butanol; en realidad para esa cantidad de ácido corresponden 144 mg de éster, pero el rendimiento fué aproximadamente del 92 %, razón por la cual es probable se haya perdido también un 8 % de actividad, quedando para el total del producto obtenido 460 microcuries de los 500 microcuries originales.

En el laboratorio de la División Aplicaciones Agrícolas esta solución fué concentrada a baño maría, en un cristalizador de 100 cm³, bajo campana hasta un volumen de 4 cm³, operación que duró 6 horas. El cristalizador conteniendo la solución concentrada se cubrió con tapón de goma y se conservó en el congelador de una heladera común; esta solución se denominará en adelante “*solución original*”.



Para la marcha de la experiencia se utilizaron dos emulsiones de distinta concentración ("concentrada" y "diluída") basándose la primera en el uso de la cantidad promedio de la aplicación a campo, en la menor dilución.

EMULSION CONCENTRADA:

Formulación a campo = 1,125 l/ha de solución de éster al 40 %
+ 80 l de agua, utilizando máquinas terrestres.

1,125 l solución de éster al 40 % = 450 g de éster.

*Fórmula de la emulsión radiactiva a partir
de 0,5 cm³ de solución original.*

0,5 cm³ solución original
0,2 cm³ Emulsan (emulgente) ⁽²⁾
0,2 cm³ Less (solvente) ⁽³⁾
1 gota de Agrimul N4R (emulgente)
2,2 cm³ agua de la canilla

Volumen aproximado de la emulsión radiactiva: 3,1 cm³.

4 cm³ sol. orig. tienen 500 microcuries
0,5 cm³ sol. orig. tienen 62,5 microcuries
3,1 cm³ emulsión tienen 62,5 microcuries
10 lambdas emulsión tienen 0,202 microcuries ⁽⁴⁾

10 lambdas corresponden a la menor dosis de aplicación.

4 cm³ sol. orig. tienen 0,132 g de éster
0,5 cm³ sol. orig. tienen 0,0165 g de éster
3,1 cm³ emulsión tienen 0,0165 g de éster

10 lambdas emulsión tienen 53 microgramos de éster.

*La emulsión concentrada contiene cada 10 lambdas 0,202
microcuries de actividad y 53 microgramos de éster.*

Comparación con respecto a la formulación a campo:

Aproximadamente 3,1 cm³ emulsión tienen 0,0165 g éster
Aproximadamente 80 litros emulsión tienen 426 g éster (si-
milar a la cantidad de la formulación a campo).

² Alquil Fenoxi polioxietanol aril alquil sulfanato.

⁽³⁾ Residuo de refinería de aceites minerales.

⁽⁴⁾ Considerando el rendimiento de la esterificación (92 %) correspondería para 10 lambdas de emulsión 0,186 μ C.

EMULSION DILUIDA:

Fué obtenida duplicando la cantidad de agua y manteniendo constantes las cantidades de los demás componentes.

Volumen aproximado de la emulsión radiactiva = $5,3 \text{ cm}^3$.

La emulsión diluída contiene cada 10 lambdas 0,118 microcuríes de actividad ⁽⁵⁾ y 31 microgramos de éster.

Las cantidades utilizadas en los cálculos precedentes y posteriormente en la experiencia, podrían aparecer en lo referente a la actividad, como tomadas sin ninguna precaución pero en realidad los cálculos estuvieron supeditados a los antecedentes que al respecto brindan los trabajos de Yamaguchi y Crafts (3) y de Slife, Key, Yamaguchi y Crafts (4) que emplearon dosis tales como 1 a 50 microgramos del producto con 0.0045 a 0.225 microcuríes y 44 microgramos con 0.248 microcuríes respectivamente, aunque hay que hacer la salvedad que los citados autores utilizaron el 2,4-D en su forma de ácido.

TRATAMIENTO DE PLANTAS

Las plantas utilizadas se mantuvieron en invernáculo, puestas en macetas a las cuales fueron trasplantadas tras su aparición en condiciones naturales a campo. Hace excepción de esta circunstancia el caso de *Datura ferox*, que fué sembrada directamente en maceta, previa eliminación del tegumento de la semilla, razón por la cual cumplió todo su desarrollo en invernáculo.

Se realizaron treinta aplicaciones de emulsiones en plantas, de esos tratamientos se seleccionan los seis casos más representativos para considerarlos en esta publicación, incluyéndose los detalles al pie de cada fotografía de las plantas y la de sus autorradiografías correspondientes.

La aplicación de las emulsiones radiactivas a las plantas, se efectuó utilizando una micropipeta de 10 lambdas para la medición de todos los volúmenes empleados. La micropipeta se usó conectada a una jeringa de $2,5 \text{ cm}^3$ por un trozo de tubo de goma.

(5) Considerando el rendimiento de la esterificación (92 %) corresponderían para 10 lambdas de emulsión diluída $0,109 \mu\text{C}$

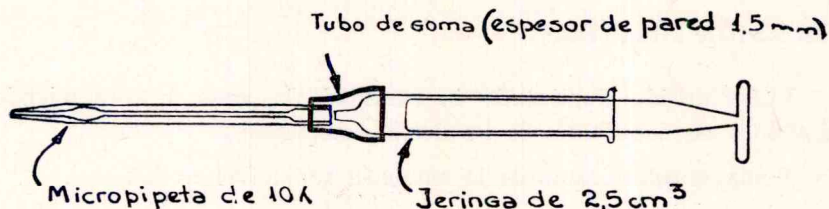


Fig. 2 Esquema de la adaptación de la jeringa a la micropipeta.

El volumen medido se depositó sobre un trozo circular de papel higiénico, de 1 cm de diámetro, adherido por su borde a la cara anterior de una hoja, con el mínimo indispensable de vaselina sólida y tomando la precaución de formar un aro uniforme y del menor ancho posible.

Transcurrido el período de tratamiento, las plantas se utilizaron para efectuar autorradiografías y, en algunos casos, mediciones de actividad.

AUTORRADIOGRAFÍAS

Para la obtención de las autorradiografías se procedió de la siguiente manera: pasado el tiempo asignado al tratamiento, se cosecharon las plantas enteras, se lavaron las raíces hasta dejarlas libres de tierra, se separaron los discos de papel y las hojas tratadas fueron lavadas con etanol al 80 % con el objeto de eliminar los residuos no absorbidos del herbicida. En casos de pulverización total de la planta (efectuada con un pequeño "atomizador de uso médico") aquélla fue sumergida varias veces en una bandeja con etanol 80 % y posteriormente lavada con agua.

Las plantas se secaron al aire durante 24 horas y luego, por un período igual, en estufa a 60-70°C, colocadas en una prensa de madera entre hojas de papel secante. Este tipo de secado puede efectuarse cuando el período de tratamiento es mayor que un día y la traslación y distribución de la radiactividad no es necesario apreciarla en forma tan precisa como cuando se estudia solamente penetración (3).

Los detalles de especie, dosis, período de tratamiento, película utilizada, tiempo de exposición, revelador y fijador empleados, se incluyen al pie de las fotografías correspondientes. La película radiográfica se colocó en contacto directo con el material tratado, sin interponer polietileno; entre la película y la prensa de madera se colocó papel secante.

La formulación de los reveladores y fijadores usados es la siguiente:

<i>Revelador "Kodak" D-19b (5)</i>		<i>Fijador "Kodak" F-5 (5)</i>	
Agua a 45°C	1.500 cm ³	Agua a 50°C	650 cm ³
Elon o metol	6.6 g	Hiposulfito de sodio anh. ..	240 g
Sulfito de sodio	216.0 g	Sulfito de sodio anh.	15 g
(cristal 432 g)		Acido acético al 28 %	48 cm ³
Hidroquinona	26.0 g	Acido bórico	7.5 g
Carbonato de sodio	144.0 g	Alumbre de potasio	15 g
(cristal 390 g)		Agua hasta	1.000 cm ³
Bromuro de potasio	12.0 g		
Agua hasta	3.000 cm ³		
<i>Revelador "Argen" R-14 (6)</i>		<i>Fijador "Argen" F-11 (6)</i>	
Agua a 45-50°C	600 cm ³	Agua a 45-50°C	600 cm ³
Metol	3.0 g	Hiposulfito de sodio anh. ..	255 g
Sulfito de sodio anh.	50.0 g	Si es cristalino: 400 g.	
Hidroquinona	9.0 g	Sulfito de sodio anh.	36 g
Carbonato de sodio anh.	50.0 g	Acido acético glacial	14 cm ³
Bromuro de potasio	3.0 g	Acido bórico cristalizado ...	10 g
Agua hasta	1.000 cm ³	Alumbre de potasio	20 g
		Agua hasta	1.000 cm ³

Seis fotografías de plantas tratadas y las de sus correspondientes autorradiografías, que representan a los casos más típicos entre los tratamientos realizados, se incluyen en las páginas siguientes.

MEDICIONES DE ACTIVIDAD

Esta parte del trabajo, se desarrolla más que con el objeto de expresar una cuantificación exacta de la magnitud de distribución de la radiactividad del producto en la planta (4) (11), para señalar las dificultades con que tropezaron los autores en su intento de estudiar la posibilidad de efectuarla (6).

Tratándose de medir la actividad de un emisor beta débil (C^{14} : 0,155 Mev) fué necesario primeramente considerar la preparación de una curva de autoabsorción; ésta permite corregir la influencia del espesor (mg/cm²) de las muestras en las mediciones de actividad.

(6) En el presente trabajo se menciona frecuentemente la distribución de la radiactividad del producto y no del producto en sí, esto debido a los antecedentes bibliográficos que señalan la metabolización del herbicida hacia otros compuestos que quedan "marcados" (4) (11).

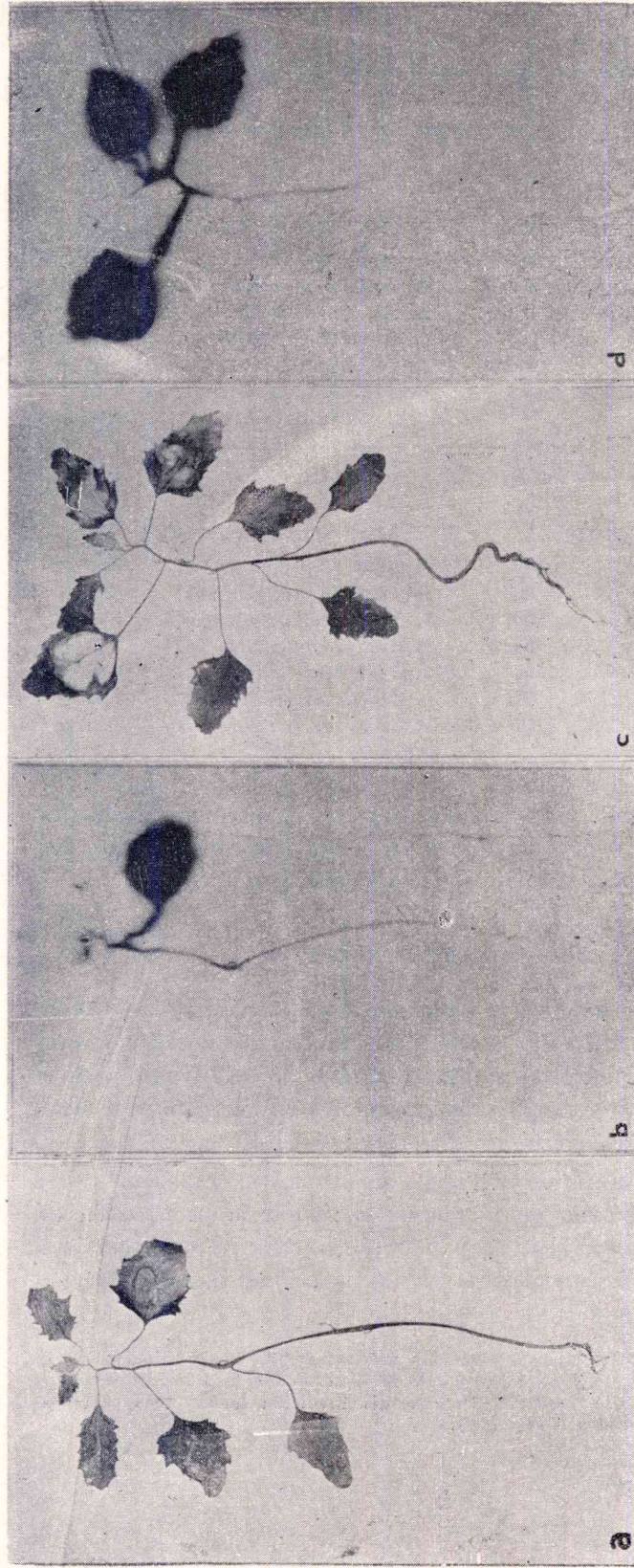


Fig. 3. *a* Planta de quinoa de 10 cm. de altura, tratada con 19 lambdas de emulsión concentrada, aplicadas en una hoja. Tratamiento: 3 días. Autorradiografía (*). Película: Ferrania 'I', Gamma. Exposición: 25 días. Revelador: R-14. Fijador: F-11. *b* Planta de quinoa de 10 cm. de altura, tratada con 100 lambdas de emulsión concentrada aplicadas en tres hojas. Tratamiento: 3 días. Autorradiografía. Película: Ferrania 'I', Gamma. Exposición: 25 días. Revelador: R-14. Fijador: F-11.

(*) Copia de la fotografía que se obtuvo de la película procesada, se colocó debajo de vidrio y sobre papel blanco. Las zonas oscuras, al igual que en el original, indican la presencia de radioactividad.

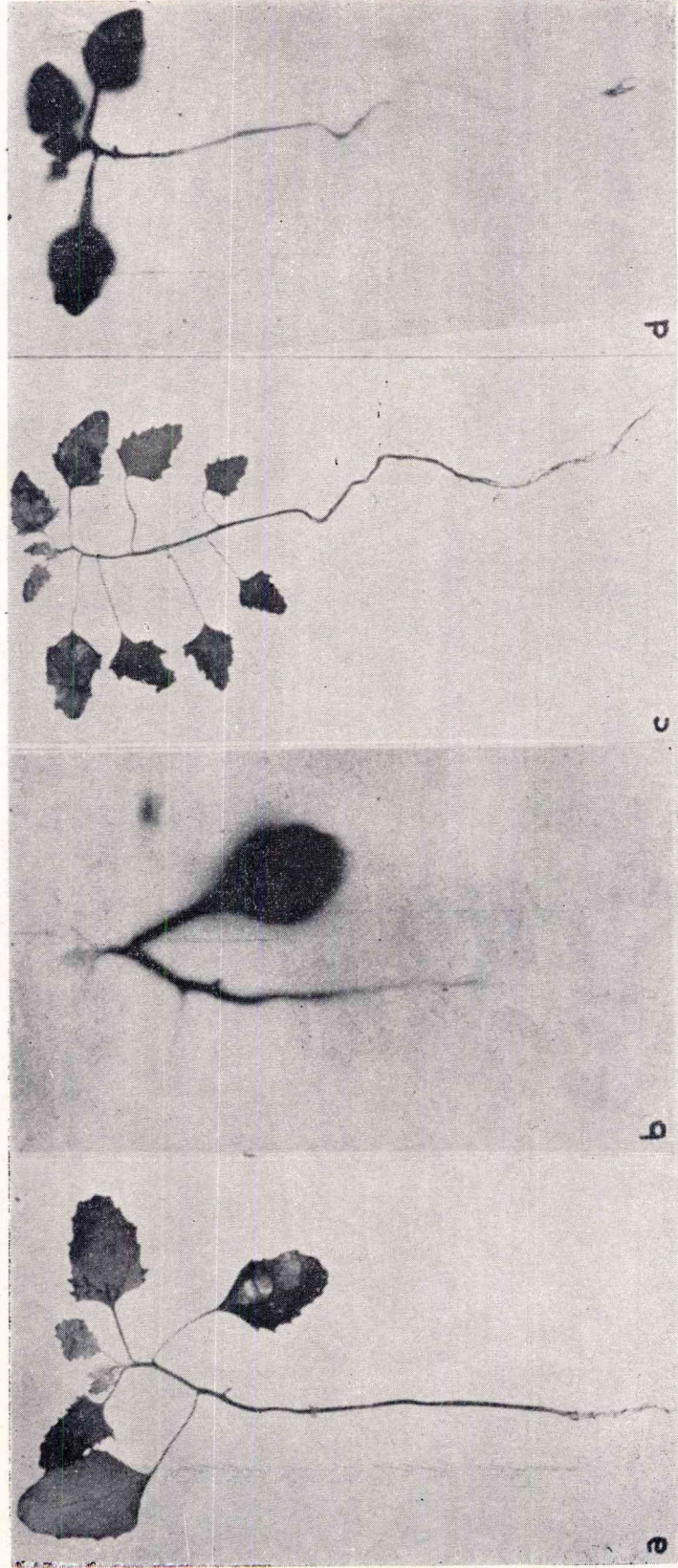


Fig. 4 *a* Planta de quinoa de 7 cm. de altura, tratada con 10 lambdas de emulsión diluída aplicadas en una hoja. Tratamiento: 3 días.

b Autorradiografía. Película: Ferrania "I" Gamma. Exposición: 28 días. Revelador: R-14. Fijador: F-11.

c Planta de quinoa de 10 cm. de altura, tratada con 100 lambdas de emulsión diluída aplicadas en tres hojas. Tratamiento: 3 días.

d Autorradiografía. Película: Ferrania "I" Gamma. Exposición: 28 días. Revelador: R-14. Fijador: F-11.

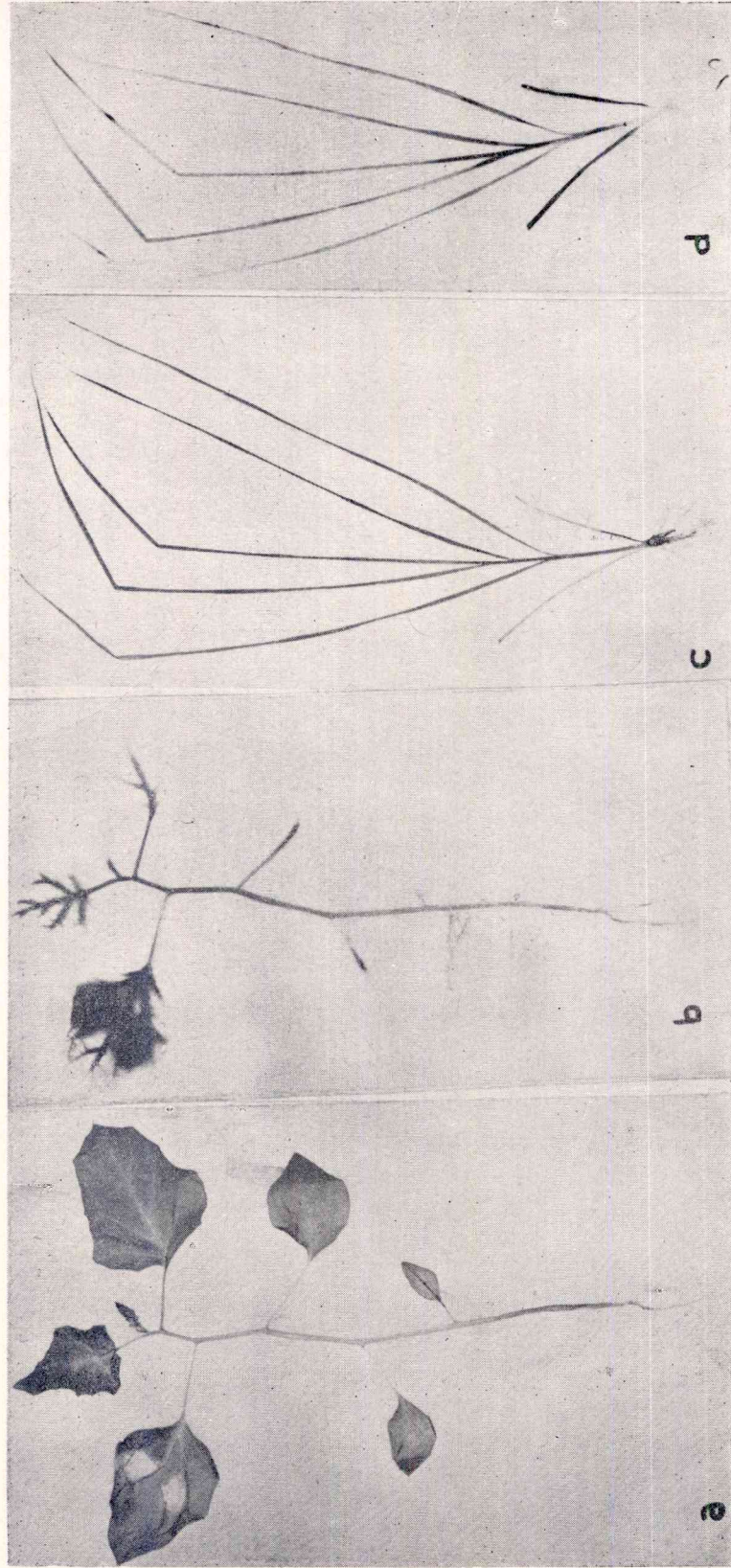


Fig. 5 *a* Planta de *Datura ferox* de 21 cm. de altura, tratada con 60 lambdas de emulsión concentrada, aplicadas en una hoja pero sobre dos discos de papel. Tratamiento: 3 días.

b Autorradiografía. Película: Kodak Crystallex X-Ray. Exposición: 25 días. Revelador: D-19b. Fijador: F-5.

c Planta de *Cyperus* de 40 cm. de altura, pulverizada toda la mata con la siguiente emulsión: 1 cm³ emulsión concentrada + 4 cm³ agua de la carilla. Tratamiento: 12 días.

d Autorradiografía. Película: Kodak Crystallex X-Ray. Exposición: 29 días. Revelador: D-19b. Fijador: F-5.

CURVA DE AUTOABSORCIÓN

La autoabsorción impide la obtención de los datos reales de actividad disminuyéndolos y para lograr aquellos se precisa disponer de los factores de corrección que deben basarse en datos cuantitativos y que se obtienen mediante la realización de una curva de autoabsorción (7). En el caso del presente trabajo, ésta se efectuó de la siguiente manera: 0,5 cm³ "solución original" se llevaron a 3,1 cm³ con butanol, respetando la concentración de la emulsión concentrada, pero no empleando ésta por no poder lograrse una geometría satisfactoria, ya que al secar la emulsión el residuo no es uniforme (quedando varias zonas aisladas) y además, salvo condiciones muy extremas de secado, conserva restos de humedad.

De la solución, se utilizó para todos los puntos de la curva el mismo volumen (10 lambdas = 0,202 microcuries) y empleando masas portadoras crecientes desde 0 hasta 64 mg/cm² (7).

La curva de autoabsorción se realizó en base a seis determinaciones de actividad, según Cuadro 1.

CUADRO 1

Masa y espesor de las muestras correspondientes a la curva de autoabsorción.

MUESTRA	MASA (*) mg	mg/cm ² (**)
0 (***)	—	—
1	22.8	6
2	60.8	16
3	121.6	32
4	182.4	48
5	243.2	64

(*) La masa estuvo constituida por material molido de planta de quinoa previamente secada.

(**) El material se colocó en cazoletas de acero inoxidable de 2 cm. de diámetro interno (superficie de la base: 3.8 cm²) y una altura de 9 mm.

(***) La muestra 0, considerada prácticamente sin masa, se obtuvo evaporando en la cazoleta de acero inoxidable 10 lambdas de la solución butílica. La micropipeta con la que se midió el volumen, fue lavada sobre la cazoleta, con 0.5 cm³ de butanol.

(7) Considerando el rendimiento del 92 % corresponden 0,186 μ C.

Las 10 lambdas de la solución butílica del herbicida, se incorporaron al material contenido en las cazoletas utilizando una micropipeta, la cual finalmente se lavó sobre aquellas con 0,5 cm³ de butanol. La suspensión (material molido + solución activa + butanol) se homogeneizó agitando circularmente las cazoletas, a mano, secándose finalmente en estufa a 46 - 47°C durante 4½ horas.

El conteaje de las cazoletas se realizó con un tubo Geiger-Müller T. G. C. - 2 (Tracerlab) con ventana de mica de 1,8 mg/cm² de espesor y escalímetro C. N. E. A. Antes de colocarlas bajo el tubo, las cazoletas fueron cubiertas con un fino papel de aluminio, debido al problema a que se hará referencia más adelante. Esta característica y el mismo equipo fueron utilizados en todas las mediciones de actividad que figuran en el presente trabajo.

CUADRO 2

Datos de actividad obtenidos para preparar la curva de autoabsorción.

MUESTRA	CUENTAS POR MINUTO (*)	RELACION N/No (**)
0	11.057	1
1	6.658	0.6
2	5.086	0.46
3	3.714	0.34
4	3.019	0.27
5	2.444	0.22

(*) No se efectuó corrección motivada por pérdida por coincidencia, por tratarse de un relativamente bajo número de cuentas por minuto, que sólo en el caso de masa cero excede de 10.000.

(**) N = Actividad observada con la masa correspondiente para cada cazoleta (ver cuadro 1) y No = Actividad observada para la muestra sin masa.

Las relaciones N/N₀ son elevadas con respecto a las obtenidas por J. R. Corbett y Ch. S. Miller (8) con otro material (semilla de algodón) y también con respecto a las que se pueden esperar teóricamente: en C¹⁴ alrededor de 6 mg/cm² de muestra causan una reducción del 50 % de la actividad (7).

Los datos obtenidos en esta experiencia se vieron afectados por el secado de las muestras, que ocasionó una pérdida de actividad que resultó mayor en los casos de menor masa y por lo tanto influyó principalmente sobre la muestra sin masa. Esta circunstancia fué comprobada aplicando 1 hora suplementaria de secado (en estufa a 46-47°C) a muestras de la curva de autoabsorción que ya habían sido secadas las

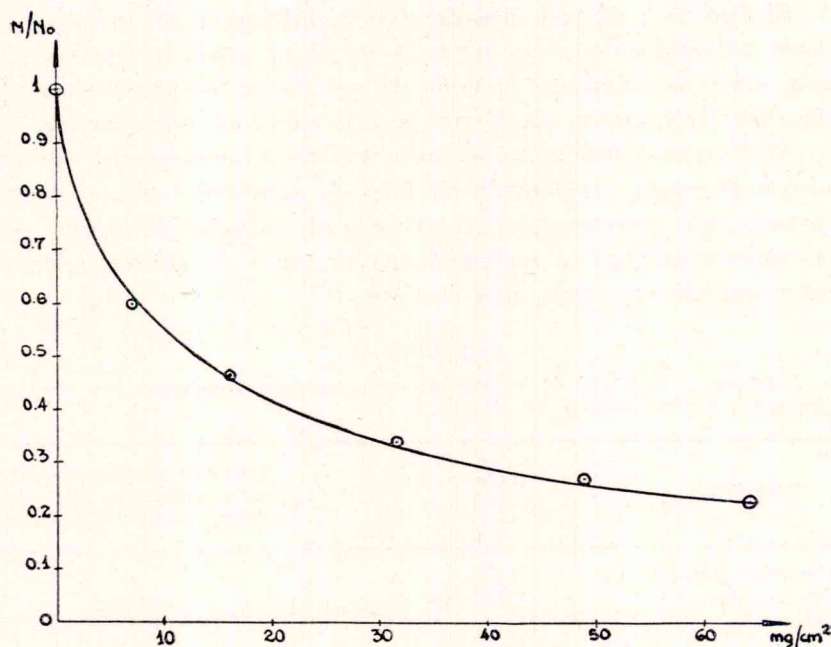


Fig. 6 Curva de autoabsorción.

4½ horas a 46-47°C que se adoptaron como norma para todas las muestras de la experiencia.

Hay que señalar, que entre la medición de actividad de las muestras tras el secado de 4½ horas y el secado suplementario de 1 hora, transcurrieron 17 horas durante las cuales las cazoletas se dejaron en el laboratorio cubiertas con vidrio. Como en estas condiciones las pérdidas de actividad que se registraron fueron muy pequeñas, la disminución de que se deja constancia en el Cuadro 3 es atribuible prácticamente en su totalidad al nuevo período que pasaron las muestras en la estufa.

CUADRO 3

Pérdidas de actividad de las muestras por secado suplementario de una hora en estufa a 46-47°C.

Espesor muestra mg/cm²	Primer contaje cpm	Segundo contaje cpm	Disminución %
0	11.057	9.567	13.5
6	6.658	6.384	4.1
16	5.086	4.932	3.0

El Cuadro 3 da una idea clara de la influencia del secado, aún a baja temperatura y al ser afectada en mayor grado la muestra sin masa, quedaría explicado el hecho de que hayan resultado altas las relaciones N/N_0 que se obtuvieron para la curva de autoabsorción.

El Cuadro 4 demuestra la influencia de la temperatura elevada durante el secado, ocasionando pérdidas de actividad verdaderamente drásticas, que determinaron la exclusión de métodos de secado con esa característica en la realización de la curva de autoabsorción y posteriormente para toda otra medición.

CUADRO 4

Pérdidas de actividad de las muestras por secado suplementario con lámpara infrarroja (200°C durante 30 minutos).

MUESTRA	Secada a estufa: 46-47°C (4½ h)	Posterior secado con lámpara infrarroja. Aproxim. 200°C durante 30 minutos
Emulsión concent. 20 lambdas. Sin agregados	8.926 cpm (*)	40 cpm
Emulsión concent. 20 lambdas + 0,5 ml butanol	11.942 cpm	148 cpm

(*) Nótese que la actividad de 20 lambdas de emulsión en este cuadro, es menor que la de 10 lambdas de solución del cuadro 3; la emulsión queda mal distribuida y no seca totalmente a 46-47°C.

Concretando, en las muestras en que hubo incorporación de compuesto activo y solvente se produjo pérdida de actividad durante el calentamiento, la que fué provocada por la volatilidad del éster y magnificada por la elevación de la temperatura.

De acuerdo con lo ocurrido en la presente experiencia y habiendo procedido tanto para la curva de autoabsorción como para las muestras de las plantas con un mismo tiempo y temperatura de secado, pero existiendo influencia de la masa de la muestra en la magnitud de la pérdida de actividad, hay que considerar a la curva de autoabsorción incluida como una referencia básica aproximada a la realidad, pero no totalmente exacta. Queda todavía por agregar a lo citado que al secar las muestras se apreció cierto ascenso de líquido por las paredes de la cazoleta que se manifestó finalmente en un residuo seco (visiblemente clorofila).

CURVA DE CALIBRACIÓN

En estudios biológicos, generalmente resulta de suma conveniencia la valoración de la cantidad de radiactividad de las muestras, expresada en porcentaje de la cantidad incorporada originalmente en el sistema biológico. (7) Esto se puede hacer recurriendo a la construcción de una curva de calibración, en la cual se considera un rango de conteaje que cubra el que se logra en las mediciones efectuadas.

Los puntos que permiten el trazado de esta curva se obtienen con preparaciones de igual masa, a las cuales se incorporan una serie de diluciones de la muestra original (en nuestro caso ésta, o sea la emulsión concentrada, está sustituida por una solución butílica de equivalente concentración del producto) teniéndose así distintos porcentajes conocidos de la misma.

Los puntos de la curva se preparan de manera que se obtenga igual geometría que en las muestras biológicas de la experiencia, siendo también iguales a las de la curva de autoabsorción que hay que utilizar como corrección, si las muestras de la curva de calibración y las de la experiencia tienen una masa apreciable como es en nuestro caso.

Para la curva de calibración la masa del material vegetal (quinoa molida) fue constante: 60,8 mg colocados en las cazoletas de acero inoxidable ya citadas, dando un espesor de 16 mg/cm². La serie de diluciones (tres puntos) se obtuvo de la siguiente manera:

Se preparó una solución madre con 20 lambdas de la solución butílica de concentración igual a la emulsión concentrada y se llevó a 2 cm³ con butanol tomándose:

Para punto N° 1 : 0,1 cm³ (1 lambda)

Para punto N° 2 : 0,25 cm³ (2,5 lambdas)

Para punto N° 3 : 0,5 cm³ (5 lambdas)

En la preparación de las muestras estos volúmenes se agregaron a las cazoletas completados a 1 cm³ con butanol, procediéndose luego al secado de la muestra a 46-47°C en estufa durante 4½ horas. Los resultados de medición de actividad obtenidos y la curva que de ellos deriva se incluyen en el Cuadro 5.

CUADRO 5

Datos de actividad corregidos por autoabsorción correspondientes a la curva de calibración.

Dosis (*)	cpm	cpm corregidas por autoab- sorción	Cálculo de los datos de la columna anterior. (**)
1 lambda (3,3 %)	480	1043	$480 \cdot \frac{1}{0,46}$
2,5 lambdas (8,25 %)	1200	2609	$1200 \cdot \frac{1}{0,46}$
5 lambdas (16,5 %)	2582	5613	$2582 \cdot \frac{1}{0,46}$

(*) Para expresar los porcentajes se consideró una aplicación a una planta, de una dosis de 30 lambdas de emulsión concentrada.

(**) Corresponde para 16 mg/cm² de espesor de la muestra, una relación N/No de 0,46 según datos de cuadros 1 y 2. Todas las muestras se prepararon con una masa de 60,8 mg de quinoa molida, peso que se mantuvo prácticamente invariable luego de los tratamientos posteriores.

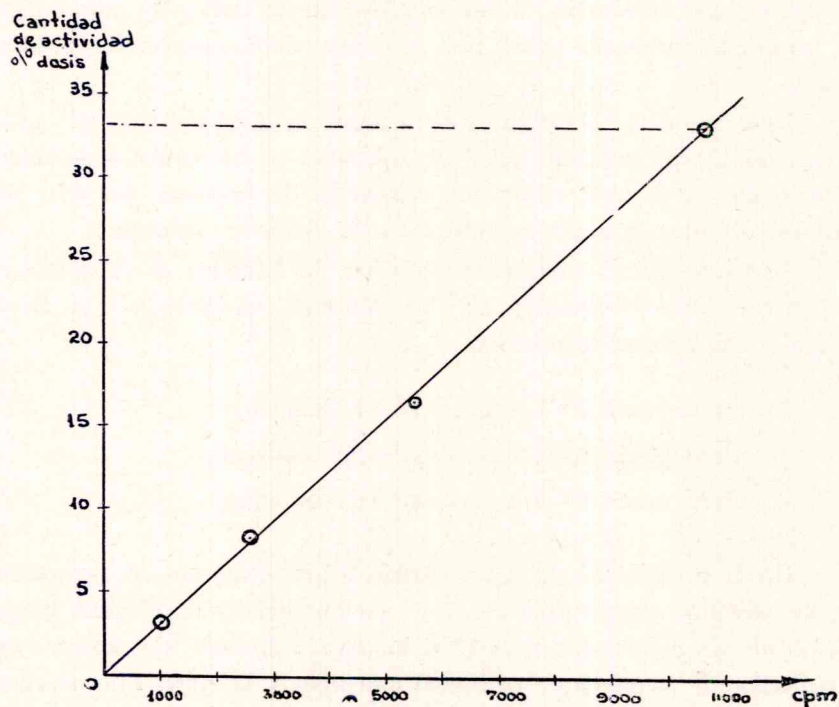


Fig. 7 Curva de calibración.

Con respecto a la exactitud en la obtención de la curva de calibración, caben citar los mismos reparos que para la curva de autoabsorción exceptuando, desde el punto de vista del valor comparativo entre sus puntos, la influencia de la masa de la muestra ya que fué igual en todos los casos. Pero por otra parte existió el problema de las distintas cantidades de actividad, por lo que podría quedar en pie la posibilidad de pérdidas en forma no proporcional.

Pero dejando de lado estas consideraciones, el gráfico de la curva de calibración está indicando prácticamente una función lineal y resulta muy aceptable para aplicar a la interpretación de datos de actividad de una prueba biológica donde otros factores pueden ser origen de errores más serios.

INTERPRETACION DE LAS MEDICIONES DE ACTIVIDAD

La limitada cantidad del herbicida marcado no permitió la realización de un crecido número de tratamientos con el objeto de efectuar

CUADRO 6

Datos de actividad registrados en la planta de quinoa. Tratamiento: 3 hojas (tercio superior, medio e inferior) tratadas con 10 lambdas de emulsión concentrada cada una.

Características de la muestra	cp 30' (*)	cpm	cpm netas (descontando el fondo)
1) Tercio superior de la planta. 60,8 mg mat. seco molido, 710 mg. totales + 0,25 cm ³ butanol; secado 46-47°C 4½ horas	2280	76	35
2) Tercio medio 60,8 mg de 1180 mg; butanol y secado ídem.	2100	70	29
3) Tercio inferior (con raíz). 60,8 mg, de 1060 mg, butanol y secado ídem.	2340	78	37
4) Tres hojas tratadas. 60,8 mg de 75 mg; butanol y secado ídem.	24810	827	786
Fondo	1230 (**,	41	—

(*) Como en todas las mediciones de actividad, se usaron como continentes de las muestras, cazoletas de acero inoxidable de las medidas citadas en cuadro 1 interponiendo papel de aluminio como se expresara anteriormente.

(**) El fondo se elevó de 20 a 41 cpm como consecuencia de mediciones anteriores efectuadas sin interposición del papel de aluminio, lo que indicaría contaminación del tubo producida por volatilización de la muestra. Esta circunstancia debe tomarse como seria advertencia para preservar el correcto funcionamiento del tubo; desde la aplicación del papel de aluminio el fondo permaneció estable.

contajes en el material vegetal; de manera que a sólo efecto ilustrativo se incluyen los datos correspondientes a un tratamiento efectuado en una planta de quinoa de 30 cm de altura, con 30 lambdas de emulsión concentrada, que se aplicaron en tres hojas (del tercio superior, medio e inferior). El tratamiento duró 5 días y puede considerarse representativo desde el punto de vista de una limitada distribución de la actividad en la planta, y el bajo número de cuentas registrado que fué característica de todas las mediciones efectuadas sobre otros tratamientos.

Tratándose de un caso en el cual el contaje del fondo y de las muestras no difieren grandemente, se hace necesario tener la certeza de que las muestras tienen realmente actividad. Esto puede determinarse hallando primeramente la desviación standard según la fórmula que corresponde para el caso en que nos hallamos:

$$S_{Rs} = \pm \sqrt{\frac{R_{(s+bg)}}{t_{(s+bg)}} + \frac{R_{bg}}{t_{bg}}} \quad (9)$$

S_{Rs} = Desviación standard del contaje neto de la muestra por unidad de tiempo.

$R_{(s+bg)}$ = Contaje grosero de la muestra (incluido fondo) por unidad de tiempo.

$t_{(s+bg)}$ = Tiempo de contaje de la muestra más fondo.

R_{bg} = Fondo por unidad de tiempo.

t_{bg} = Tiempo de contaje del fondo.

Teniendo en cuenta la siguiente regla práctica general, puede considerarse con seguridad que las muestras N° 1), 2) y 3) tienen realmente actividad: "Si las cuentas netas de la muestra son mayores " que dos veces la desviación standard, se puede creer, con cierta reserva, que un efecto ha sido observado. Si el efecto es tal que el " contaje neto de la muestra es mayor que tres veces la desviación " standard puede darse por establecido que la muestra tiene actividad, " ya que la probabilidad del efecto debido a las fluctuaciones del fondo " es de 0,3 %" (9).

CUADRO 7
Comprobación estadística de actividad en las muestras.

Muestra N°	Comparación de cpm netas con S_{Rs}
1	35 mayor que 5,91 ($3 \times 1,97$)
2	29 mayor que 5,76 ($3 \times 1,92$)
3	37 mayor que 5,97 ($3 \times 1,99$)

CUADRO 8

Cálculo de los porcentajes de C^{14} en 2, 4-D- $2C^{14}$ y en compuestos desconocidos, localizados en la planta, en función de la curva de calibración y de autoabsorción obtenidas.

Parte de la planta	cpm en 60,8 mg (16 mg/cm ²) de mat. seco	cpm corregidas por autoabsorción (*)	cpm referidas a peso total	% de la dosis (**)	concentración de la actividad (***)
Tercio superior	35	76	888	2,5	1,19
Tercio medio	29	63	1233	3,6	
Tercio inferior	37	80	1395	4,0	
Hojas tratadas	786	1709	2108	6,2	28,11
Total localizado en la planta					16,3

(*) Relación $N/N_0 = 0,46$, dato cuadro 2.

(**) Datos obtenidos de la curva de calibración (Fig. 7).

(***) Expresada en cpm/mg material seco.

El 83,7 % restante de la dosis aplicada está representado por lo que ha quedado absorbido en los papeles, lo que no fué absorbido por las hojas (se eliminó por lavado con etanol 80 %), metabolizado a $C^{14}O_2$ (4) y toda pérdida que eventualmente pudo haberse producido.

Se tiene la comprobación de que en los papeles quedó producto activo absorbido en forma apreciable pues se determinó un total de 1668 cpm (suma de las determinaciones de los tres papeles, cada papel se colocó directamente en el fondo de una cazoleta) que no son comparables para determinar porcentaje de la dosis, por tratarse de diferente geometría que las muestras.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las autorradiografías muestran en general y sin distinguos entre las dosis, distribución de la actividad limitada a los tejidos de conducción y es muy poca o inexistente en las raíces. La movilidad es asimismo bastante reducida adentro de la hoja tratada, pues cuando ésta fué de cierto tamaño contrasta visiblemente el tono oscuro de los círculos de aplicación con el de las zonas algo alejadas (autorradiografía b, Fig. 5).

En la distribución de la actividad hay influencia de la especie tratada ya que en la planta de *Datura ferox* (autorradiografía b, Fig. 5), pese a que también es limitada, es mayor que en las plantas de quinoa.

Todas las dosis empleadas, 10-100 lambdas de emulsión concentrada o diluída, han sido eficaces para promover la obtención de autorradiografías pero son discutibles desde el punto de vista de las mediciones de actividad y prácticamente inocuas para la observación de efectos en las plantas, ya que sólo con las dosis mayores pudieron observarse encorvamientos del tallo en las zonas próximas a las de aplicación del producto. Desde luego, no hubo casos de muerte de plantas salvo al pulverizar totalmente en *Cyperus* spp. (autorradiografía b, Fig. 5) donde la parte aérea se secó totalmente.

La preparación de las muestras para mediciones de actividad y los contajes en sí ofrecieron dificultades, observándose deficiencias que ya han sido señaladas, pero aún así, la aproximación que se ha realizado en la determinación del porcentaje total de la dosis localizado en la planta, concuerda aceptablemente con algunos antecedentes bibliográficos, aunque éstos no se refieren a mediciones directas del material vegetal. (10).

Se habla de aproximación y con reservas porque hubo inconvenientes en la obtención de las curvas de autoabsorción y calibración. Sin embargo hay un punto, el que corresponde al nivel de 10 lambdas en ambas curvas, para el cual la diferencia es prácticamente inexistente (3 %).

Son favorables dos confirmaciones entre lo que muestran las autorradiografías y lo que indican los contajes obtenidos: distribución de una reducida cantidad de radioisótopo, representada por bajo número de cuentas y la concentración de la actividad en la hoja tratada con respecto al resto de la planta, que explica porqué la zona de la aplicación es muy nítida en las autorradiografías.

CONCLUSIONES

1 — Aún las dosis mínimas utilizadas (0,118 microcuries de actividad y 31 microgramos de éster para la emulsión diluída y 0,202 microcuries y 53 microgramos para la emulsión concentrada⁽⁸⁾) resultaron apropiadas para la obtención de autorradiografías.

(8) Considerando un rendimiento de 92% en la esterificación las dosis mínimas que se utilizaron corresponderían a 0,109 microcuries y 0,186 microcuries.

2 — La técnica de aplicación de las emulsiones sobre papel higiénico no es conveniente, pues hay una sensible absorción por el mismo.

3 — Las emulsiones continúan manteniendo su eficacia como trazadoras tiempo después de preparadas (con seguridad 10 días).

4 — La cantidad de radioisótopo que se distribuyó en la planta luego de la aplicación con micropipeta fué siempre pequeña aunque dentro de estos rangos varió con la especie.

5 — El caso de pulverización total sobre planta de *Cyperus* spp (la autorradiografía dá una imagen de toda la planta) indica que en ese caso la penetración ocurrió en todo lugar donde llegó el herbicida. La muerte que sobrevino de la parte aérea de la planta, podría ser atribuída a una total afectación de aquélla, lo que no ocurre en casos de tratamientos locales.

6 — Para las mediciones de actividad, la comodidad y precisión en el trabajo quedan supeditadas a un aumento conveniente de la actividad específica del producto y/o a la utilización de equipos más apropiados para la medición de C^{14} .

7 — En la curva de calibración, curva de autoabsorción y en las muestras de plantas, el método de secado previo al conteaje utilizando lámpara infrarroja, resultó muy inapropiado. La técnica más conveniente entre las ensayadas fué la de secado en estufa a 46-47°C durante 4½ horas y se considera así no por resultar inobjetable sino por ser la que, secando el material, produjo la menor reducción de actividad.

8 — Utilizando tubo Geiger Müller para las mediciones debe tenerse en cuenta la posibilidad de contaminación del tubo si se han empleado solventes y tomar alguna precaución para preservarlo (en nuestro caso se cubrió la cazoleta con un delgado papel de aluminio).

9 — La determinación del porcentaje de la dosis (cantidad de radioactividad) localizado en la planta da cifras bajas (16,3 %) en relación a la dosis total aplicada.

BIBLIOGRAFIA

1 FRIEDLANDER, G. - KENNEDY, J. W.: "Nuclear and radiochemistry". Pág. 215. 216. John Wiley and Sons, Inc. 1955.

2 DATA SHEET (DS-3778). *The Radiochemical Centre Amersham*, Buckinghamshire (England).

3 YAMAGUCHI, S. - CRAFTS, A. S.: "Autoradiographic methods for studying absorption and translocation of herbicides using C^{14} labeled compounds". *Hilgardia*, 28 (6): 161-191. December 1958.

4 SLIFE, F. W. - KEY, J. L. - YAMAGUCHI, S. - CRAFTS, A. S.: "Penetration, translocation and metabolism of 2,4-D and 2, 4, 5-T in wild and cultivated cucumber plants WEEDS, 10 (1): 29-35. January 1962.

- 5 Kodak Data Book of Applied Photography FY-2:3. FY-4:2.
- 6 Catálogo General Ferrania Argentina N° 16.
- 7 CGMAR, C. L.: *Radioisotopes in biology and agriculture. Principles and practice*". Mc Grair Hill Brolees, 481 págs. 1955.
- 8 CORBETT, J. R. - MILLER, C. S.: "*Determination of carbon-14 in plant material by wafer counting*". NATURE, 199 (4898): 1106-1107. Sep. 14, 1963.
- 9 First International Training Course on Radioisotope Techniques in Agricultural Research. Apuntes mimeografiados, Laboratory Period 2-Counting Statistics: Page 4. F. A. O./I. A. E. A./Cornell University-July 20-Sept. 10, 1959.
- 10 LINSOTT, D. L. - McCARTY, M. K.: "*Absorption, translocation and degradation of 2-4-D in ironweed (Vernonia baldwinii)*". WEEDS, 10 (1): 65-68. January 1962.