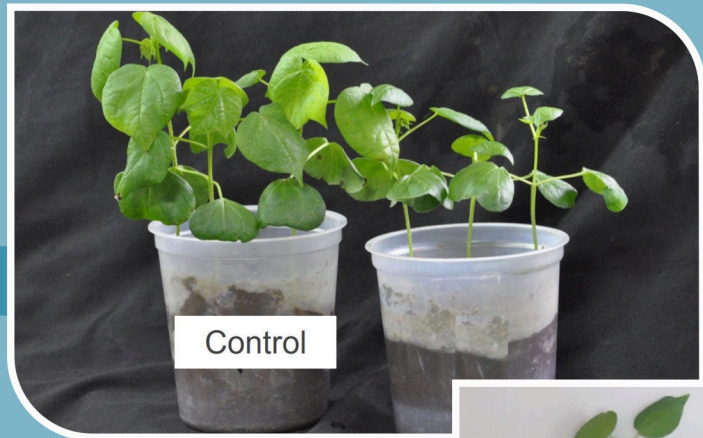


Protocolo para evaluar la volatilización relativa de productos formulados del herbicida 2,4-D

Montoya J.C., Platz J.P., Azcarate M.P., Porfiri C., Cristos D.S.



Protocolo para evaluar la volatilización relativa de productos formulados del herbicida 2,4-D

AUTORES:

Montoya J.C.¹, Platz J.P.², Azcarate M.P.¹, Porfiri C.¹, Cristos D.S.³

FOTOGRAFÍA

Fiorucci, R.E.¹

1 EEA INTA Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas", Ruta Nacional N°5 km 580. (6326) Anguil, La Pampa, Argentina. Correo electrónico: montoya.jorgelina@inta.gov.ar; azcarate.pamela@inta.gov.ar; porfiri.carolina@inta.gov.ar

2 Unidad Integrada Balcarce, FCA UNMDP-INTA, Ruta 226 km 73,5. (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: platz.pedro@inta.gov.ar

3 Laboratorio de Contaminantes Químicos del Instituto de Tecnología de Alimentos, CIA-INTA Castelar. Nicolas Repetto y de los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: cristos.diego@inta.gov.ar



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía
Argentina

Centro Regional La Pampa-San Luis

Estación Experimental Agropecuaria Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas"

**Este documento queda sujeto al cumplimiento
de la Ley Nro. 26.899**

**Colaboradora y Curadora de Datos del
Repositorio Institucional - INTA Digital**
Bibl. Flavia Epuñan

Diseño Gráfico
Dis. Gráf. Francisco Etchart

Octubre de 2023



EDICIONES INTA

Centro Regional La Pampa-San Luis
EEA INTA Anguil “Ing. Agr. Guillermo Covas”
RN N°5 Km 580, CP 6326, Anguil, La Pampa, Argentina

1. INTRODUCCIÓN

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida hormonal, fenoxi derivado, de acción sistémica y selectiva para el control de malezas de hoja ancha. El 2,4-D se clasifica por su modo de acción como un "herbicida hormonal" ya que actúa de forma similar a las hormonas naturales de las plantas del tipo de las auxinas. Estas fitohormonas regulan el normal desarrollo y crecimiento de las plantas. El 2,4-D es un herbicida generador de la hormona auxina en su forma sintética, la cual a concentraciones mayores a las normales puede provocar la muerte vegetal.

En el año 1945 se lanza comercialmente el herbicida 2,4-D (Troyer 2001). En la actualidad, continúa siendo uno de los herbicidas más usados en los sistemas de manejo de malezas latifoliadas a nivel mundial; existiendo más de 1500 productos formulados comerciales con 2,4-D como ingrediente activo (Tayeb et al., 2011). En el mercado nacional, se registran 260 productos formulados de 2,4-D (SENASA 2023) variando en las fórmulas químicas (ácido, sales y ésteres), su contenido de ingrediente activo (i.a.) y equivalente ácido (e.a.).

La síntesis de las diferentes fórmulas químicas del 2,4-D implica cambios en la estructura química de la molécula parental. Estas modificaciones conllevan a cambios en las propiedades físicas y químicas del compuesto. La volatilidad de los compuestos en estado puro se relaciona directamente con la presión de vapor (PV) inherente al compuesto químico. Es así como, la estructura molecular de un plaguicida determina sus propiedades físicas, como la PV y la solubilidad, y su reactividad química.

La volatilización es el proceso de emisión de sustancias químicas a la atmósfera y depende de la PV de cada compuesto y de todos aquellos factores y condiciones ambientales que la atenúen o modifiquen. Los vapores resultantes de la volatili-

zación pueden causar efectos adversos a los seres humanos a través de la exposición por inhalación en los sitios de aplicación, efectos negativos sobre cultivos sensibles y efectos biológicos en organismos no blanco a cierta distancia del lugar tratado. El herbicida 2,4-D dependiendo de las fórmulas químicas formuladas, el tipo de formulación, los diferentes adyuvantes, aditivos y sus concentraciones pueden afectar el proceso de volatilización de diferentes modos. Distintas tecnologías se van incorporando en las formulaciones comerciales de forma de minimizar las pérdidas de principio activo hacia la atmósfera. Estos factores resultan necesarios investigar en profundidad, ya que afectan en gran medida la volatilización de los plaguicidas (Houbraken et al. 2016). Los principales factores ambientales que afectan a la volatilización son la temperatura, la humedad, el tipo de suelo, la cobertura vegetal, etc.

La volatilización de los herbicidas se puede estimar a través de la metodología de bioensayos con plantas como especies indicadoras. Ciertas especies vegetales son sensibles a la presencia de contaminantes atmosféricos y proveen de respuestas fisiológicas características de algún tipo o grupo específico de contaminantes presentes en la atmósfera (Guderian 1985). Esta metodología ha sido utilizada para determinar el efecto de una sustancia química a través respuestas fisiológicas de plantas indicadoras (Schreiber et al. 2005, Tarragó et al. 2005, Bennet 1989, Penner y Michael 2014).

Dado el modo de acción del 2,4-D, la manifestación de síntomas característicos de fitotoxicidad y la sensibilidad que expresan ciertas especies vegetales a la exposición de vapores a muy bajas concentraciones, la metodología de bioensayo resulta una técnica sencilla, sensible y reproducible para determinar la volatilización. Permite evaluar el efecto de los cambios en los formulados comerciales de los herbicidas auxínicos respecto al

tipo de formulación, la adición de coadyuvantes y aditivos, y demás tecnologías incorporadas para la optimización del producto comercial sobre el potencial de volatilización.

2. OBJETIVO Y ALCANCE

Evaluar la volatilización relativa de productos formulados comerciales de 2,4-D mediante la metodología de bioensayo.

El método desarrollado es una herramienta sencilla, sensible y reproducible que sirve para determinar la volatilización de los productos comerciales del herbicida 2,4-D. La metodología plantea la utilización de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) como planta bioindicadora de la presencia de vapores del herbicida en la atmósfera de una cámara individual cerrada. El método utiliza como fuente de emisión de vapores un sustrato de suelo arenoso asperjado con el herbicida a las dosis de uso comercial en un sistema de cámara cerrada desechable. Esta metodología permite evaluar la volatilización relativa de las diferentes formulaciones comerciales del herbicida 2,4-D a dosis de uso comercial expresadas en gramos de equivalente ácido por hectárea (g e.a. ha⁻¹). La molécula del ácido de 2,4-D es la forma biológicamente activa en las plantas que provoca el efecto auxínico en las especies sensibles. Con el fin de valorar el nivel de daño producido por los vapores de 2,4-D, las plantas expuestas se comparan visualmente, de acuerdo con las escalas de referencia, con plantas "control" que no fueron expuestas a los vapores del herbicida.

3. GLOSARIO Y ABREVIATURAS

Volatilidad: Desde el punto de vista químico, físico y de la termodinámica es una medida de la tendencia de una sustancia pura a pasar a la fase de vapor.

Volatilización: Es el proceso de convertir una sustancia química de un estado líquido o sólido a un estado gaseoso o de vapor. La tasa actual de volatilización dependerá de las condiciones ambientales y de todos aquellos factores que atenúen o modifiquen la presión de vapor del compuesto.

Bioensayo: Son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Ronco et al. 2004). Los bioensayos aplicados para las investigaciones de herbicidas son métodos de respuesta biológica por organismos vivientes (bioindicadores) para determinar la presencia y/o concentración de un químico en un sustrato (Santelmann 1977).

Especie bioindicadora: Son organismos o comunidades de ellos que pueden responder a la contaminación ambiental mediante alteraciones en su fisiología o a través de su capacidad para acumular contaminantes (Pignata 2003).

Perlitas: Material inerte y muy liviano. Utilizado para mejorar el drenaje y aliviar la mezcla con suelo. Su granulometría permite aumentar la porosidad de aire facilitando el desarrollo radicular de las plantas.

Epinastia: Síntoma que expresa un vegetal en el que las hojas, pecíolos y/o tallos experimentan una curvatura hacia abajo. Las plantas muestran un crecimiento anormal, frecuentemente retorcidos.

Hiponastia: Síntoma que expresa un vegetal en el que las hojas, pecíolos y/o tallos experimentan una curvatura hacia arriba.

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

DDE: Días desde la exposición.

PSA: Peso seco aéreo.

PFA: Peso fresco aéreo.

4. MÉTODO

4.1. Principio

El presente método consiste en la elaboración de bioensayos utilizando el algodón (*Gossypium hirsutum* L.) como especie bioindicadora (**ANEXO A**). El método muestra los efectos producidos sobre las plántulas de algodón expuestas a la presencia de vapores de 2,4-D. Los síntomas de fitotoxicidad típicos del daño producido por los vapores de 2,4-D se evalúan de forma visual de acuer-

do con la severidad que manifiestan en función de dos escalas de daño con respecto a un tratamiento control sin exposición, y a través de sus efectos sobre la biomasa aérea de las plantas.

La selección del método de bioensayo para caracterizar la volatilización de los formulados comerciales de 2,4-D se funda en que es una técnica sensible, simple y reproducible. La elección de algodón como especie indicadora se basa en que es una especie de cultivo extensivo de alta sensibilidad a la presencia de vapores de 2,4-D en la atmósfera circundante.

De forma general, el bioensayo consiste en cultivar plántulas de algodón en macetas bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, a las cuales se las expone a los vapores emitidos por los productos formulados de 2,4-D a evaluar. La fuente de emisión de vapores es una bandeja con suelo arenoso asperjado con los diferentes formulados comerciales y dosis de 2,4-D (g e.a. ha⁻¹). Cada tratamiento se realiza por cuadruplicado. Asimismo, se cultivan plántulas de algodón sin exposición como tratamiento "control". Inmediatamente después de asperjar el tratamiento definido se coloca la maceta con las plántulas de algodón sobre la bandeja y se envuelven herméticamente con doble bolsa de polietileno de alta densidad, conformando una cámara individual cerrada. Cada una de las cámaras individuales se colocan en una cámara de crecimiento programada para emular temperaturas estivales, diurnas y nocturnas, durante 24 hs.

Cumplidas las 24 hs, se retiran las cámaras individuales (macetas y bandejas envueltas en bolsas de polietileno) de la cámara de crecimiento. Se desechan las bandejas y bolsas de polietileno, quedando solo las macetas. A continuación, se procede a realizar la primera evaluación visual de daño de las plántulas expuestas de acuerdo con la tabla de referencia correspondiente (1 día desde exposición, DDE). La segunda y tercera evaluación visual se realiza a los 10 y a los 20 DDE, respectivamente, en base a la tabla de referencia correspondiente (ANEXO B y D). A los 20 DDE, luego de la tercera evaluación visual, se desarman las macetas y se registra el peso fresco aéreo (PFA) y el peso seco aéreo (PSA) de las plántulas.

4.2. Reactivos

Utilizar agua destilada o desionizada para la preparación de las soluciones y, salvo que se indique de otra manera, preparar las mismas en vasos de precipitado, trasvasando cuantitativamente a un matraz aforado y llevar a volumen.

4.2.1. Formulados comerciales del herbicida 2,4-D a evaluar en el presente protocolo. Preparar las concentraciones (dosis) expresadas en gramos de equivalente ácido por hectárea (g e.a. ha⁻¹) según lo indicado en el diseño experimental del ensayo específico (Nota N 7). Cada formulado comercial a evaluar debe presentarse en envase precintado, acompañado del informe del análisis de la cuantificación analítica del ingrediente activo de una muestra representativa del mismo lote del que proviene. Se debe detallar la siguiente información que lo caracteriza:

- a. Nombre comercial de producto formulado a evaluar.
- b. Fabricante.
- c. Nombre químico del ingrediente activo de 2,4-D formulado.
- d. Concentración de ingrediente activo expresada en p/p o p/v.
- e. Concentración de equivalente ácido de 2,4-D expresada en p/v.
- f. Fecha de vencimiento.
- g. N° lote.
- h. N° bidón.

4.2.2. Agua de riego. Utilizar agua apta para riego que cumplan con los parámetros de calidad según normas de Riverside (U.S. Soil Salinity Laboratory).

5. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

Para la realización del ensayo se requiere de los equipos y el material de vidrio de uso habitual en el laboratorio, y en particular según lo especificado a continuación.

5.1. Equipamiento

- 5.1.1. Tamiz 5/16 (8 mm) (ASTM E 11/95).
- 5.1.2. Cámara de crecimiento con regulación de temperatura y luz.
- 5.1.3. Estufa de secado.
- 5.1.4. Balanza de precisión 0,0001 g.
- 5.1.5. Probetas de 50, 100 y 2000 ml.

5.2. Materiales

- 5.2.1. Semillas de Algodón (*Gossypium hirsutum* L.) variedad NUOPAL RR (INTA) (**ANEXO A**).
- 5.2.2. Macetas o potes de plástico. Medidas de 11 cm de diámetro x 11 cm de altura con capacidad aproximada de 750 cm³. Deben estar perforadas en la base para favorecer el drenaje.
- 5.2.3. Suelo seco al aire y tamizado por tamiz 5/16 (8 mm).
- 5.2.4. Perlita tipo Terrafertil (Humedad: 5 - 10%; pH: neutro a ligeramente alcalino. Químicamente inerte). Favorece el drenaje y facilita el desarmado de las macetas.
- 5.2.5. Bandejas plásticas descartables. Medidas: 24,5 x 17.5 cm (superficie 428,75 cm²). (Tipo Art. 107 PP).
- 5.2.6. Arena comercial seca tipo Finoteix. Arena 98%, Arcilla, 2%, Limo 0%. Textura arenosa. MO: 0.024%. pH1:2,5: 7,21.
- 5.2.7. Bolsas de polietileno de alta densidad de 50x70 cm.
- 5.2.8. Cajas de acetato transparente en las caras laterales y superior de 200 micrones de espesor; y corrugado plástico en la base. Medidas: 15x15xH32 cm.
- 5.2.9. Equipamiento de aspersión.
Atomizador/rociador manual envase 250 ml con Gatillo. Válvula mini trigger rosca 24/410.
- 5.2.10. Jeringas descartables de 1, 3 y 5 ml.
- 5.2.11. Armazón de alambre de fardo, calibre 16 (2,11 mm). Medidas del armazón de 15 cm de diámetro x 30 cm de altura.

6. REQUISITOS PREVIOS

6.1. Poder germinativo de las semillas de algodón. Realizar el poder germinativo de las semillas de algodón. Según temperatura 20-30 °C alternas, o bien 25 °C constante. Recuentos a los 4 y 12 días



Figura 1.
Atomizador/rociador
con gatillo manual de
250 ml.

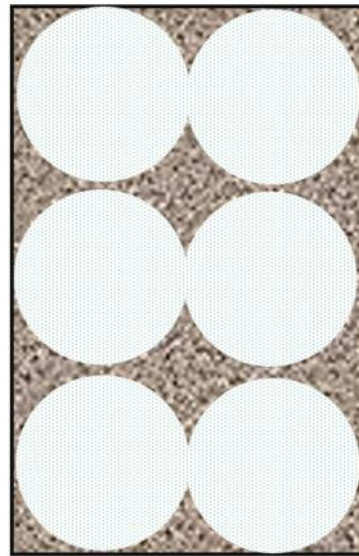


Figura 2. Esquema
de la distribución
de las aspersiones
con atomizador/
rociador con gati-
llo manual.

(final). Entre papel o en arena (sustrato). No se indican tratamientos para remover dormición.

6.2. Calibración de equipamiento de aspersión. Atomizador/rociador con gatillo manual envase 250 ml. Se muestra imagen de referencia (Figura 1). Se miden 250 ml de agua destilada y se agregan al atomizador/rociador. Se gatilla seis veces sobre la superficie de la bandeja, propiciando una distribución uniforme del líquido asperjado en la superficie evitando pulverizar por fuera de la bandeja. Se sugiere realizar las aspersiones distribuidas de a 2 a lo largo de la bandeja (Figura 2). Se gatilla seis veces dentro de una probeta y se mide el volumen recuperado. En función de la cantidad erogada por el atomizador se calcula la cantidad

de formulado comercial requerido para preparar 1 litro de caldo con la dosis del formulado comercial a evaluar. Por ejemplo, el atomizador en seis recorridos completos del gatillo eroga 5 ml sobre la superficie de la bandeja de 428,75 cm².

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Preparación de las macetas y plántulas de algodón

Se rellena cada maceta (5.2.2) con una mezcla de suelo para siembra.

Nota N° 1: La mezcla de suelo para siembra se prepara mezclando 600 g de suelo seco al aire y tamizado (5.2.3) y 20 g de perlita (5.2.4) por maceta.

Se siembran seis semillas (5.2.1) en cada maceta, a una profundidad uniforme de 2 cm. Se riega con un volumen de agua de riego (4.2.2) que alcance una humedad cercana a capacidad de campo. Se llevan las macetas a cámara de crecimiento en condiciones controladas: temperatura (25 °C), 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se riegan con 50 ml de agua de riego (4.2.2), día por medio con el fin de mantener la humedad constante. Una vez que las plántulas de algodón están establecidas ralear a un número de tres por maceta.

Nota N° 2: El raleo se realiza cuando se alcanza el estado de cotiledones expandidos y pueden observarse la primera y segunda hoja verdadera (protófilos) en formación. Esto ocurre aproximadamente a los 10 días que la plántula emerge (Figura 3).

Nota N° 3: Durante el raleo se busca la mayor uniformidad de plantas dentro y entre las macetas (Figura 4).

Las macetas con las plántulas están listas para ser expuestas a los tratamientos a evaluar. Rotular cada maceta con el tratamiento a evaluar y el número de repetición.

7.2. Exposición a las formulaciones comerciales a evaluar

Rellenar las bandejas plásticas descartables

(5.2.5) con 1 kg de arena comercial (5.2.6) con una humedad gravimétrica del 5%.

Nota N° 4: La humedad gravimétrica se logra pesando 1 kg de arena seca comercial (5.2.6) en una bolsa de polietileno de alta densidad (5.2.7) a la cual se le agrega 50 ml de agua destilada. Se mezcla y homogeniza bien; se rellena cada una de las bandejas.



Figura 3. Plántula en condiciones de exponerlas a los vapores de 2,4-D



Figura 4. Tres plántulas por maceta.

Las bandejas son asperjadas (5.2.9). De acuerdo con el volumen erogado, se aplica el formulado comercial a la dosis a evaluar teniendo en cuenta el diseño del ensayo.

Nota N° 5: Se preparan tantas soluciones o caldos como muestras a asperjar, de este modo los datos obtenidos son independientes.

Nota N° 6: El ensayo constará de un tratamiento "Control" (sin 2,4-D) y los tratamientos correspondientes según lo expresado en el procedimiento técnico para evaluar la volatilización de formulados de 2,4-D en postemergencia de soja. Los diferentes formulados comerciales de 2,4-D se evaluarán en igualdad de dosis expresadas en gramos de equivalente ácido por hectárea. Se asperjará una masa de 2,4-D equivalente a la dosis por hectárea, expresado en mg de equivalente ácido sobre las bandejas de 24,5 x 17,5 cm (superficie 428,75 cm²).

Nota N° 7: De acuerdo con los tratamientos realizados y la capacidad de las cámaras de crecimiento, el diseño experimental puede ser en bloques completos aleatorizados o completamente aleatorizado con cuatro repeticiones como mínimo.

Inmediatamente luego de ser asperjada cada bandeja, colocar una maceta con las tres plántulas con el tratamiento definido e identificado; luego el armazón de alambre (5.2.11) sobre cada maceta y envolver herméticamente con doble bolsas de polietileno de alta densidad (5.2.7) conformando una cámara individual cerrada herméticamente (Figura 5).

Nota N° 8: El armado de la cámara individual cerrada debe hacerse inmediatamente luego de asperjar el tratamiento definido para evitar pérdidas por volatilización del formulado en estudio.

Nota N° 9: El armazón de alambre se utiliza para evitar que las bolsas de polietileno de alta densidad tomen contacto con las plántulas de algodón, conformando un espacio interior entre las plantas y las bolsas.

PRECAUCION: Esta operación debe realizarse con los cuidados correspondientes (campana de extracción de vapores, máscara facial con filtros, etc.) para evitar la exposición a los posibles vapores de 2,4-D.



Figura 5. Cámara individual preparada previo a su cierre con las bolsas de polietileno de alta densidad para exponer las plántulas a los formulados comerciales de 2,4-D a evaluar.



Figura 6. Cámara de crecimiento con las cámaras individuales cerradas con bolsas de polietileno de alta densidad durante la exposición a los vapores de 2,4-D.



Figura 7. Maceta en la caja individual de acetato.

Colocar las cámaras individuales desechables en la cámara de crecimiento durante 24 hs emulando temperaturas estivales con 12 hs de luz a 35 °C y 12 hs de oscuridad a 25 °C (Figura 6).

Luego de las 24 hs de exposición, retirar las cámaras individuales desechables de la cámara de crecimiento.

Desechar como residuos peligrosos las bandejas con arena y las bolsas de polietileno.

Dejar las macetas durante 2 horas en un ambiente ventilado para que se dispersen posibles remanentes de vapor de 2,4-D en la atmósfera circundante de las plántulas.

Luego, cada maceta es colocada individualmente dentro de una caja de acetato transparente (5.2.8). De esta manera cada maceta queda aislada de las demás y se evita posible contaminación cruzada por vapores remanentes (Figura 7 y 8). Las macetas se riegan periódicamente para mantener la humedad del suelo cercana a capacidad de campo.



Figura 8. Macetas en cajas individuales de acetato para evitar contaminación cruzada dentro de la cámara de crecimiento.

7.3. Seguimiento y evaluación visual en las plántulas de algodón

Realizar la primera evaluación visual de las plántulas de acuerdo con la tabla de referencia, luego de estar expuestas a los vapores de 2,4-D durante 24 horas (1 DDE). **ANEXO B**

Nota N° 10: En cada evaluación visual deberá realizarse un registro fotográfico.

Realizar la segunda evaluación visual de las plántulas a los 10 DDE a los vapores de 2,4-D. **ANEXO B**

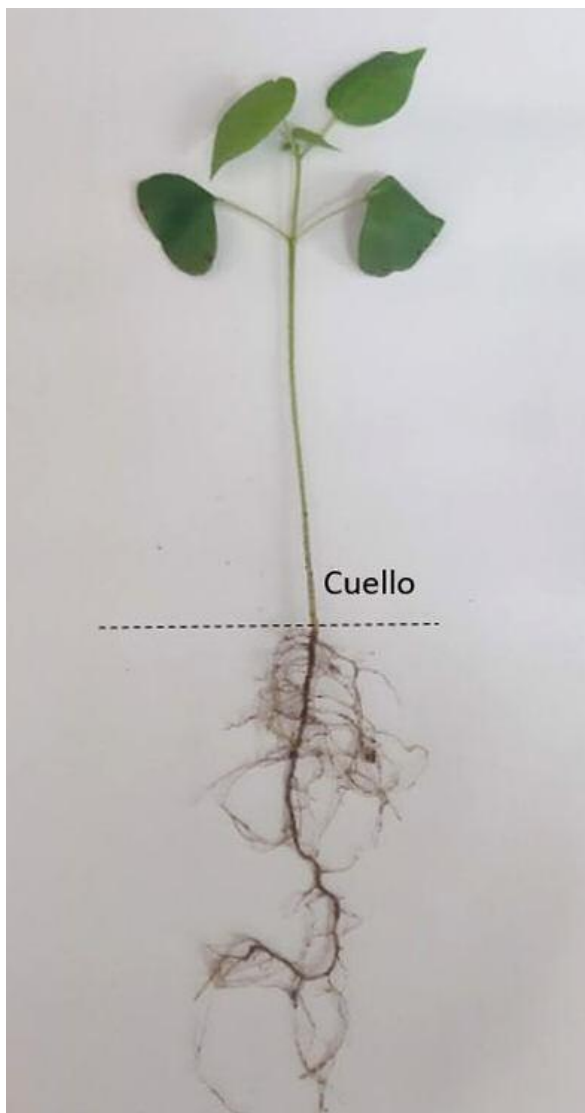


Figura 9. Detalle de una plántula al finalizar el ensayo.

Realizar la tercera evaluación visual (y última) de las plántulas a los 20 DDE a los vapores de 2,4-D. **ANEXO B**

Nota N° 11: La finalización del ensayo (tercera evaluación visual) se alcanza cuando el crecimiento de las plantas ha llegado hasta segunda hoja expandida alcanzando ese estado aproximadamente a los 20 DDE.

Desarmar las macetas, teniendo mucho cuidado de no perder material vegetal.

Cortar la plántula a la altura del cuello como lo indica la figura 9. Registrar el PFA de las tres plántulas juntas. Colocar en estufa a 65 °C hasta peso

constante; y tomar el PSA. Luego dividir el PFA y el PSA por 3 (plántulas) para obtener un peso promedio por planta por cada maceta (tratamiento y repetición).

8. REGISTRO DE DATOS

Registrar la siguiente información de los resultados obtenidos de las plántulas expuestas a las formulaciones de 2,4-D estudiadas: Información de los tratamientos a ensayar, repetición, nivel de daño de acuerdo con la fecha de evaluación visual (1 DDE, 10 DDE y 20 DDE) y daños en cuello y raíces a los 20 DDE. Los PFA y PSA se dividen por el número de plántulas y se expresan en g pl⁻¹.

Nota N° 12: Los registros se realizan por cada maceta (tratamiento y repetición) inclusive el PFA y PSA de las plantas.

Fotografiar cada maceta rotulada con el tratamiento y la repetición correspondiente a la par de la maceta "Control" rotulada con el número de repetición correspondiente. Puede realizarse el registro de la información de acuerdo al **ANEXO C**.

9. INFORME

Se recomienda que el informe incluya como mínimo los siguientes detalles:

Objetivo. Evaluar la volatilización relativa del producto formulado comercial "xxxxxxx" de 2,4-D.

Materiales y métodos. Los mismos deberán ajustarse al protocolo desarrollado para tal fin, debiendo explicitarse algunos datos tales como:

- a. Nombre comercial de producto formulado evaluado.
- b. Fabricante.
- c. Nombre químico del ingrediente activo de 2,4-D formulado.
- d. Concentración de ingrediente activo expresada en p/p o p/v.
- e. Concentración de equivalente ácido de 2,4-D expresado en p/v.
- f. Dosis equivalente ácido (g ha⁻¹)

- g. Fecha de vencimiento.
- h. N lote.
- i. N bidón.
- j. Porcentaje (%) de poder germinativo
- k. Método de aplicación utilizado: atomizador manual.
- l. Volumen de caldo erogado por el dispositivo de aplicación.
- m. Cálculos realizados para la preparación de los caldos de acuerdo con las concentraciones utilizadas (g e.a. ha⁻¹) de 2,4-D.

Registro de datos. El mismo debe contener la información especificada según punto 8 y **ANEXO C** de este protocolo.

Análisis estadístico: Los datos registrados en cada una de las evaluaciones visuales (1 DDE, 10 DDE y 20 DDE), los PFA y PSA se analizan con un paquete estadístico. Se comprueba la distribución normal de los datos. Si se comprueba que los datos no están distribuidos normalmente es necesario transformar los datos. Posteriormente, se realiza el análisis de varianza (ANVA) y se usa el test de diferencias de medias DUNNET ($p < 0,05$) ya que permite comparar las medias de los tratamientos ensayados con respecto a un tratamiento control sin herbicida.

Nota N° 13: De acuerdo con los tratamientos realizados y la capacidad de las cámaras de crecimiento el diseño experimental puede ser en bloques completos aleatorizados o completamente aleatorizado con tres repeticiones como mínimo.

Resultados: Los resultados obtenidos se describen y explican textualmente y se los muestra como gráficos de barra con los correspondientes títulos, leyendas y unidades. Los datos se presentan incorporando las significancias estadísticas halladas durante el proceso de análisis.

Conclusión: La conclusión debe responder al objetivo y estar sustentada por los resultados obtenidos.

10. MANEJO Y GESTIÓN DE RESIDUOS

Se debe cumplir con la legislación vigente. Para mayor información, se recomienda consultar la Ley de Residuos Peligrosos (Ley N°24051) la cual describe la clasificación de los tipos de residuos (corrientes de desechos; Y), los métodos de pretratamiento, recuperación y la disposición de los mismos. Además, se recomienda utilizar la información brindada por los fabricantes de insumos en los que se detallan varios de estos aspectos.

11. MEDIDAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD

Es conveniente seguir las medidas generales de seguridad e higiene: vestir ropa protectora (guardapolvo, mangas protectoras), guantes y protectores oculares (anteojos de seguridad). Se recomienda que la preparación y la manipulación de las formulaciones de herbicidas se realice bajo campana de extracción y con protección respiratoria de máscara facial completa o media máscara facial con cartuchos para exposiciones a vapores orgánicos (Ej. Marca 3M, 6006).

12. ADVERTENCIA

El usuario del presente protocolo debe estar familiarizado con las prácticas comunes de laboratorio y la implementación de las Buenas Prácticas de Laboratorio, así como buenas prácticas agrícolas involucradas en el manejo de fitosanitarios. Este protocolo no tiene el propósito de remarcar todos los riesgos de seguridad que puedan estar relacionados con su uso. Es responsabilidad del usuario establecer las prácticas de seguridad e higiene del trabajo que aseguren el cumplimiento de las reglamentaciones nacionales e internacionales existentes.

ANEXO A

Características del Algodón

El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) es una planta anual. El tallo principal es erguido, terminal y continuo. La raíz principal pivotante, las secundarias siguen una dirección más o menos horizontal (SINAVIMO, SIOVM).

Una plántula (Figura 1) es el embrión ya desarrollado como consecuencia de la germinación, o sea, es una plantita recién nacida donde aún se distinguen algunas partes de la semilla como los cotiledones y donde ya se forman la o las primeras hojas denominadas protófilos u hojas primordiales o primarias, y que casi siempre, son diferentes a las hojas normales (nomófilos) de la planta adulta, existiendo una transición entre ambas (Troiani et al. 2017).

Lo primero que se observa son sus dos hojas cotiledonales que emergen del suelo dejando tras el tegumento, por la elongación del hipocótilo antes de su despliegue y expansión. Los cotiledones son peciolados y tienen forma arriñonada, nacen en forma opuesta, a la misma altura, en los nudos más bajos de su tallo (Figura 2). Las hojas verdaderas son pecioladas y tienen una disposición alterna. En el nudo sucesivo por encima de los cotiledones se produce la 1ª hoja verdadera. Normalmente, la 1ª y 2ª hoja insertadas sobre el tallo son protófilos siendo pequeñas y acorazonadas (Figuras 3 y 4). Recién a partir de la 3ª o 4ª presenta hojas normales, nomófilos, tipo lobuladas con tres a cinco lóbulos (Figura 5). El proceso de expansión foliar dura entre 18 y 22 días. Esto significa que durante ese período las hojas presentan un tipo de enrollamiento y arrugamiento propio y característico de la especie durante ese proceso (Figura 6).

La temperatura del suelo regula básicamente los procesos de germinación y emergencia, siendo la óptima cercana a los 34 °C y la mínima de 15,5 °C. Dependiendo de la temperatura, esta fase

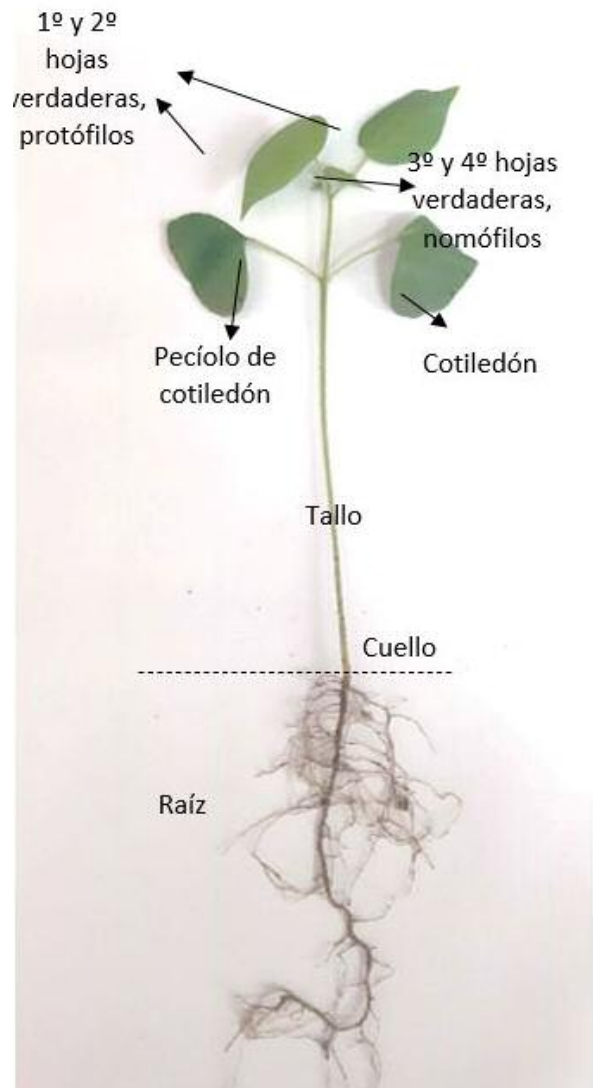


Figura 1. Órganos de una plántula de algodón.

puede tardar entre 4 a 10 días. En esta etapa el algodón es muy sensible a las bajas temperaturas y a la disponibilidad de oxígeno. Durante la fase de emergencia y crecimiento vegetativo la temperatura óptima está entre 25 a 30 °C.



Figura 2. Siembra a emergencia. En esta fase se nota la salida de plántulas y el despliegue de los cotiledones (arriñonados enfrentados).



Figura 3. 1º hoja verdadera, protófilo, acorazonada



Figura 4. 2º hoja verdadera, protófilo, expandida acorazonada



Figura 5. 3º hoja verdadera expandida lobulada con 3 lóbulos, nomófilo



Figura 6. Detalle de hojas en proceso de expansión

ANEXO B

ESCALA DE EVALUACIÓN VISUAL DE DAÑO

Para la evaluación visual del daño producido por la volatilización del 2,4-D sobre las plántulas de algodón expuestas, se describen los síntomas típicos que pueden hallarse de acuerdo con el estado de desarrollo u órganos presentes en las plántulas en los distintos momentos de evaluación. Dichos síntomas están clasificados en una escala de daño de acuerdo con la severidad que manifiestan. Se definen dos escalas, una para las plántulas después de estar expuestas durante 1 día a los vapores de 2,4-D (1 DDE) y una segunda escala para las evaluaciones correspondientes a los 10 y 20 días desde exposición (10 y 20 DDE).

Los órganos presentes para evaluar luego de 1 DDE son: Tallos, pecíolos de cotiledones, cotiledones y primeras hojas verdaderas (protófilos formados y/o en formación) (Tabla 1). Correspondientes a los 10 y 20 DDE son: Tallos, primera y segunda hojas verdaderas (protófilos); tercera y cuarta hojas verdaderas lobuladas (nomófilo), meristema apical (Tabla 2).

Un síntoma típico del efecto de los herbicidas auxínicos es la epinastia. Se refiere a un síntoma que expresa un vegetal en el que las hojas experimentan una curvatura hacia abajo. Las plantas muestran un crecimiento anormal de las hojas o tallos, frecuentemente retorcidos. También pueden observarse síntomas relacionados con hiponastias, por el cual las hojas, pecíolos y/o tallos experimentan un crecimiento con mayor empuje en la cara inferior o dorsal que en la superior, por lo que el órgano afectado aparece cóncavo superiormente.

En cada evaluación visual deberá realizarse un registro fotográfico del tratamiento y repetición. Deben presentarse entre 1 a 3 fotos, las cuales deben mostrar la maceta rotulada con tratamiento y repetición apareada con una maceta "Control" rotulada según su repetición. Las imágenes deben ser tomadas en forma horizontal y ser presentadas con un tamaño mínimo de 15 cm de ancho x 10 cm de alto (Figura 1).

Se adjuntan las escalas de evaluación de daño con imágenes de referencia en el ANEXO D.

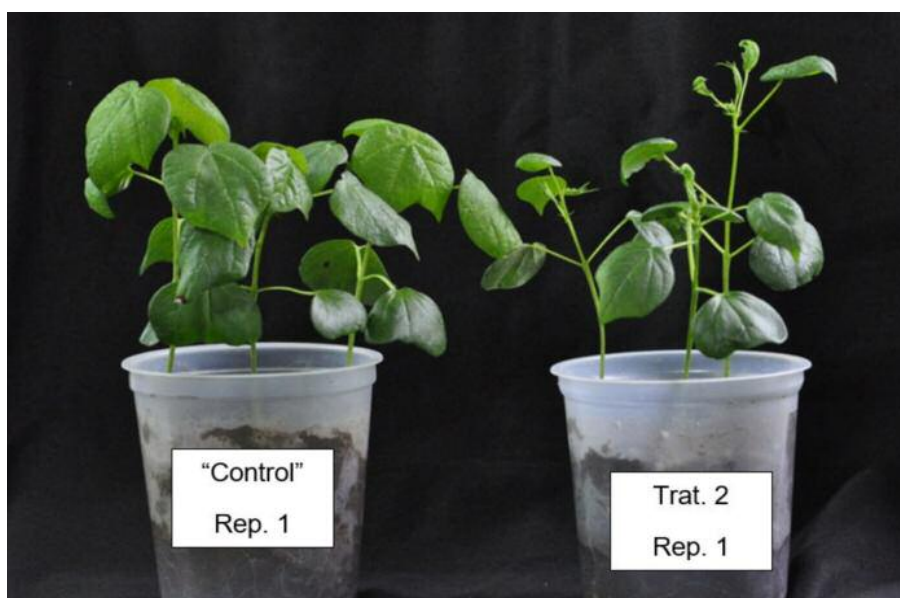


Figura 1. Foto de referencia o foto tipo para adjunta en el informe final.

Tabla 1. Escala de evaluación visual de daño de las plántulas de algodón a las 24 hs de exposición a las fuentes de 2,4-D (1 DDE).

Escala (%)	Descripción de los daños observados
0	Sin efectos, plantas normales
10	Alguna planta manifiesta muy leve epinastia de algún pecíolo de los cotiledones, tallos erectos a muy levemente retorcidos
20	Alguna planta manifiesta leve epinastia de pecíolo de los cotiledones, tallos erectos a levemente retorcidos.
30	Algunas plantas manifiestan moderada epinastia de los pecíolos de los cotiledones, algunos cotiledones están "caídos", algunos tallos presentan moderado retorcimiento.
40	Todas las plantas manifiestan una marcada epinastia con enrulamiento de los pecíolos, todos los cotiledones caídos, aspecto de "planta triste" y los tallos presentan moderado retorcimiento.
50	Todas las plantas manifiestan severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos, cotiledones caídos pegados al tallo , todos los tallos manifiestan retorcimiento.
60	Todas las plantas muestran muy severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos de los cotiledones, cotiledones caídos pegados al tallo , todos los tallos manifiestan severo retorcimiento, plantas casi postradas .
70	Todas las plantas muestran muy severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos de los cotiledones, cotiledones caídos pegados al tallo, todos los tallos manifiestan muy severo retorcimiento, plantas postradas .
80	Todas las plantas muestran muy severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos de los cotiledones, cotiledones caídos pegados al tallo, todos los tallos manifiestan muy severo retorcimiento, plantas postradas, los primordios foliares (nomófilos) están necróticos.
90	Todas las plantas manifiestan muy severa epinastia en sus pecíolos y tallos, plantas postradas, plasmolizadas y necróticas .
100	Todas las plantas muertas

Tabla 2. Escala de evaluación visual de daño de las plántulas de algodón a los 10 y 20 días de exposición a las fuentes de 2,4-D (10 y 20 DDE).

Escala (%)	Descripción de los daños observados
0	Sin efectos, plantas normales
10	Alguna planta muestra el tallo muy levemente torcido y/o muy leves síntomas de arrugamiento en hojas nuevas verdaderas. Muy leve epinastia y/o hiponastia. Puede observarse menor crecimiento de las plantas.
20	Alguna planta manifiesta el tallo levemente torcido y/o leves síntomas de arrugamiento en hojas nuevas verdaderas. Leve epinastia y/o hiponastia. Puede observarse menor crecimiento de las plantas.
30	Alguna planta manifiesta el tallo moderadamente torcido , las hojas nuevas manifiestan síntomas de arrugamiento y retraso en la expansión foliar . Moderadas epinastia y/o hiponastia. Puede observarse menor crecimiento de las plantas.
40	Algunas plantas manifiestan los tallos moderadamente torcidos , todas las plantas manifiestan retraso en la expansión foliar y hojas con síntomas de fitotoxicidad (arrugamiento). Moderadas epinastia y/o hiponastia. Se observa menor crecimiento de las plantas.
50	Todas las plantas manifiestan los tallos severamente torcidos, no se ve inhibida la expansión de nuevas hojas, pero se manifiestan un severo retraso en la expansión foliar y síntomas de fitotoxicidad en las hojas (arrugamiento). Severa epinastia y/o hiponastia. Se observa menor crecimiento de las plantas.
60	Todas las plantas manifiestan muy severa epinastia y/o hiponastia: tallos muy retorcidos, los pecíolos de las hojas verdaderas muy enrulados, muy severo retraso en la expansión de nuevas hojas y muy severos síntomas de fitotoxicidad en las hojas (arrugamiento). Se observa menor crecimiento de las plantas.
70	Todas las plantas manifiestan muy severa epinastia y/o hiponastia: tallos muy retorcidos, hojas nuevas con muy severa fitotoxicidad y/o expansión foliar inhibida . Se observa menor crecimiento de las plantas.
80	Todas las plantas muestran muy severa epinastia y/o hiponastia: tallos muy retorcidos, plantas postradas, los primordios foliares (nomófilos y protófilos) necróticos. Se observa menor crecimiento de las plantas.
90	Todas las plantas muriendo, hojas en su mayoría necróticas, meristema apical inhibido o necrosado . Se observa menor crecimiento de las plantas.
100	Todas las plantas muertas

ANEXO C

REGISTRO DE DATOS

Tabla 1. Tratamientos a ensayar en dosis de 2,4-D (g e.a. ha⁻¹).

Tratamiento	Nombre químico del ingrediente activo formulado	Repetición	Nombre comercial	Concentración de ingrediente activo (g L ⁻¹)	Concentración equivalente ácido (g L ⁻¹)	Dosis equivalente ácido (g ha ⁻¹)
1	2,4-D ...	1	A			x
1	2,4-D ...	2	A			x
1	2,4-D ...	3	A			x
2	2,4-D ...	1	B			x
2	2,4-D ...	2	B			x
2	2,4-D ...	3	B			x
3	2,4-D ...	1	C			x
3	2,4-D ...	2	C			x
3	2,4-D ...	3	C			x
4	"Control"	1	-			0
4	"Control"	2	-			0
4	"Control"	3	-			0

Tabla 2. Resultados obtenidos de las plántulas expuestas a las formulaciones de 2,4-D estudiadas.

Tratamiento	Repetición	Evaluación nivel de daño (0 a 100)			PFA g/plántula	PSA g/plántula	Observaciones
		1DDE	10DDE	20DDE			
1	1						
1	2						
1	3						
2	1						
2	2						
2	3						
3	1						
3	2						
3	3						
4	1						
4	2						
4	3						

ANEXO D

Escala para la evaluación visual de daño de las plantas de algodón luego de 24 hs de exposición (1 DDE) a la fuente de 2,4-D expresada en % respecto a plantas "Control" sin exposición

0% Sin efectos, plantas normales



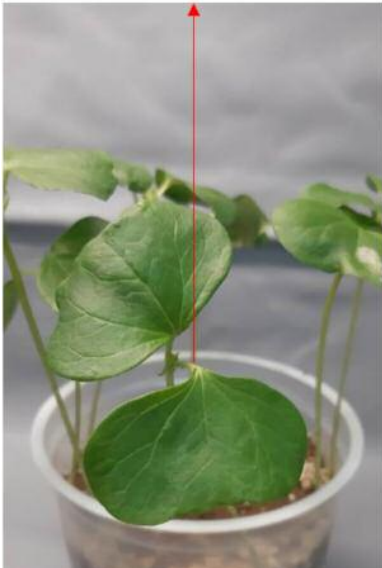
Tallos y pecíolos rectos. Cotiledones erguidos





10% Alguna planta manifiesta muy leve epinastia de algún pecíolo de los cotiledones, tallos erectos a muy levemente retorcidos

Muy leve epinastia del pecíolo



Tallo erecto a muy levemente retorcido



Cotiledones muy levemente caídos

Muy leve retorcimiento



20% Alguna planta manifiesta leve epinastia de pecíolo de los cotiledones, tallos erectos a levemente retorcidos



**Leve
epinastia de
pecíolo de los
cotiledones**



30% Algunas plantas manifiestan moderada epinastia de los pecíolos de los cotiledones, algunos cotiledones están "caídos", algunos tallos presentan moderado retorcimiento

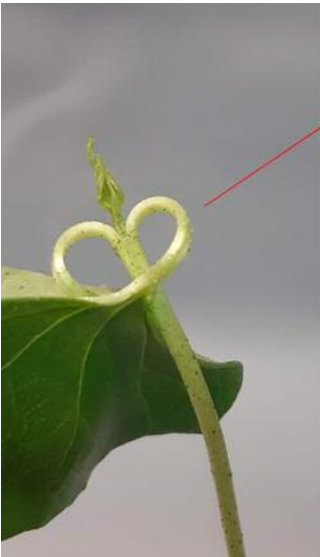




40% Todas las plantas manifiestan una marcada epinastia con enrulamiento de los pecíolos, todos los cotiledones caídos, aspecto de "planta triste" y los tallos presentan moderado retorcimiento



50% Todas las plantas manifiestan severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos, cotiledones caídos pegados al tallo, todos los tallos manifiestan retorcimiento



Pecíolos enrulados



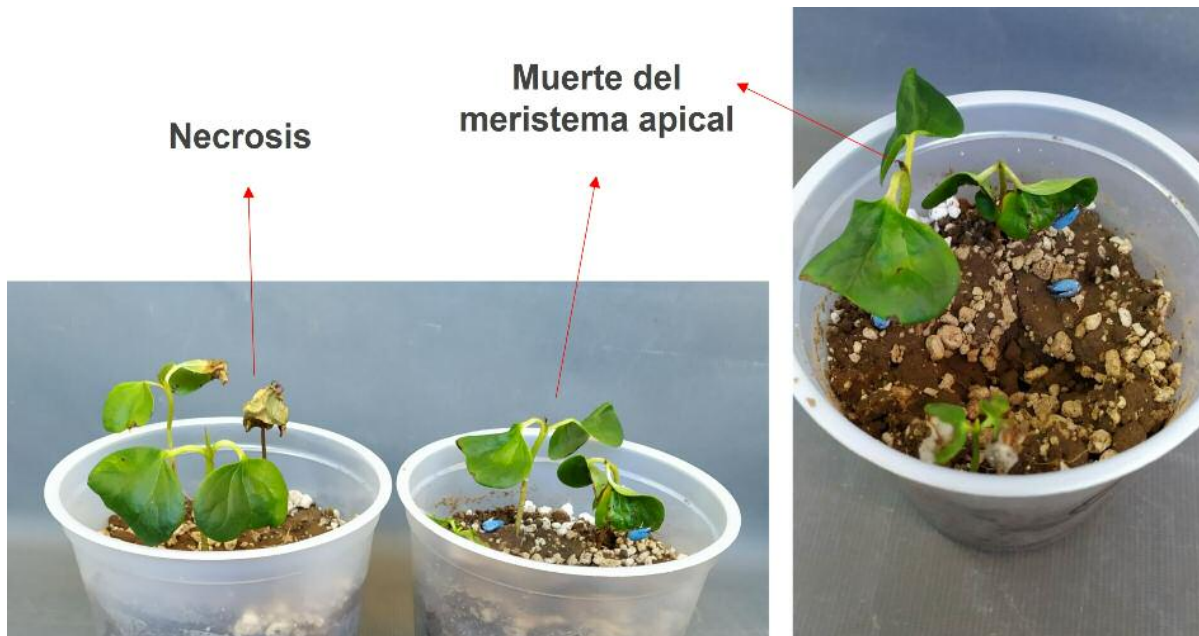
60% Todas las plantas muestran muy severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos de los cotiledones, cotiledones caídos pegados al tallo, todos los tallos manifiestan severo retorcimiento, plantas casi postradas



70% Todas las plantas muestran muy severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos de los cotiledones, cotiledones caídos pegados al tallo, todos los tallos manifiestan muy severo retorcimiento, plantas postradas



80% Todas las plantas muestran muy severa epinastia con enrulamiento de los pecíolos de los cotiledones, cotiledones caídos pegados al tallo, todos los tallos manifiestan muy severo retorcimiento, plantas postradas, los primordios foliares (nomófilos) están necróticos



Escala para la evaluación visual de daño de las plantas de algodón luego de 10 y 20 DDE a la fuente de 2,4-D expresada en % respecto a plantas "Control" sin exposición

0% Sin efectos, plantas normales

Encrespamiento normal de las hojas durante la expansión foliar



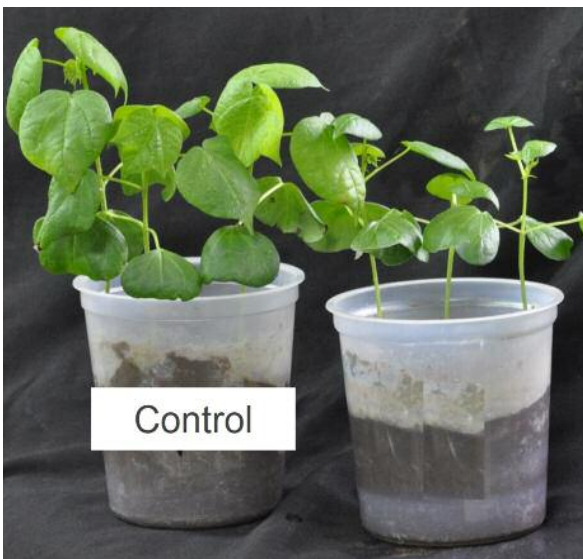
10% Algunas planta muestra el tallo muy levemente torcido y/o muy leves síntomas de arrugamiento en hojas nuevas verdaderas. Muy leves epinastia y/o hiponastia. Puede observarse menor crecimiento de las plantas

Tallos erectos en su **mayoría** a **muy levemente** retorcidos

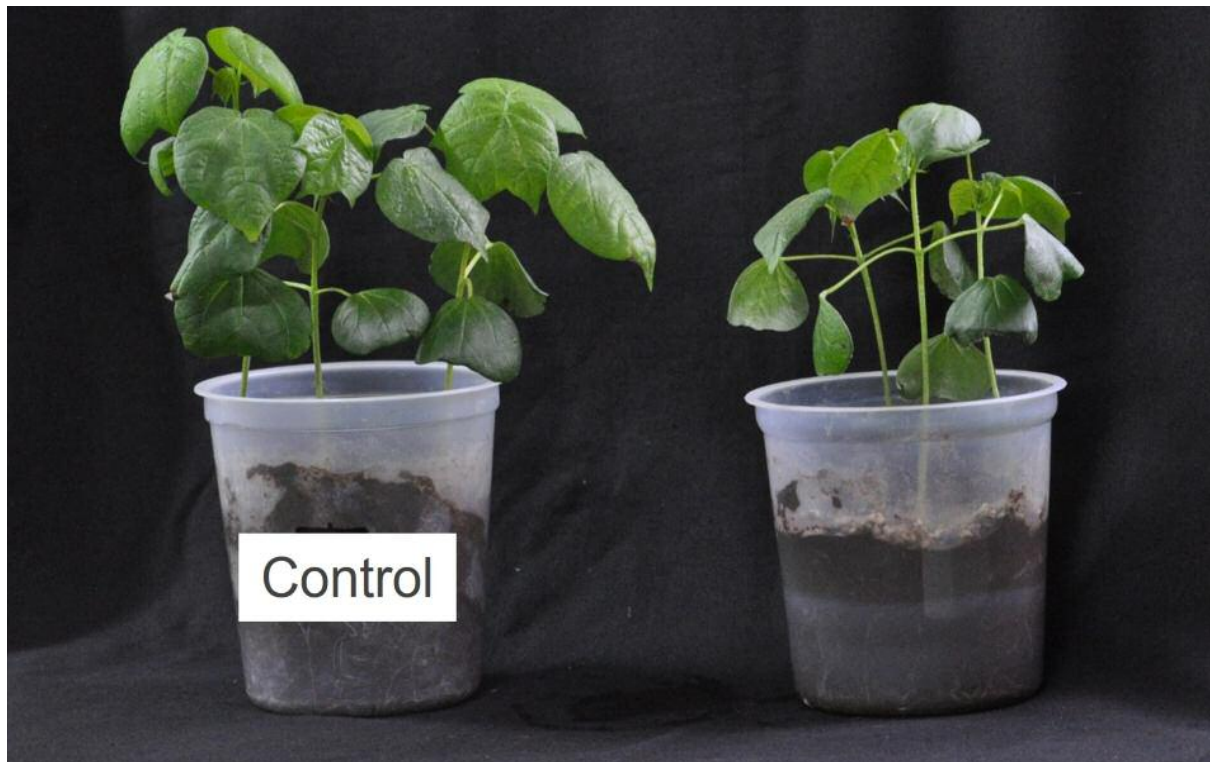


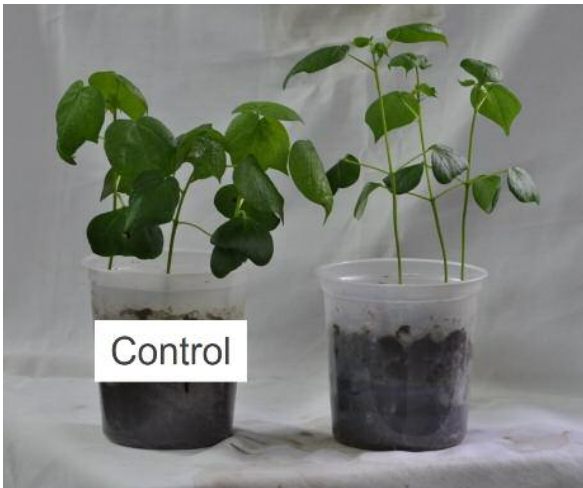
Tallos en su mayoría erectos a muy levemente retorcidos





20% Alguna planta manifiesta el tallo levemente torcido y/o leves síntomas de arrugamiento en hojas nuevas verdaderas. Leves epinastia y/o hiponastia. Puede observarse menor crecimiento de las plantas





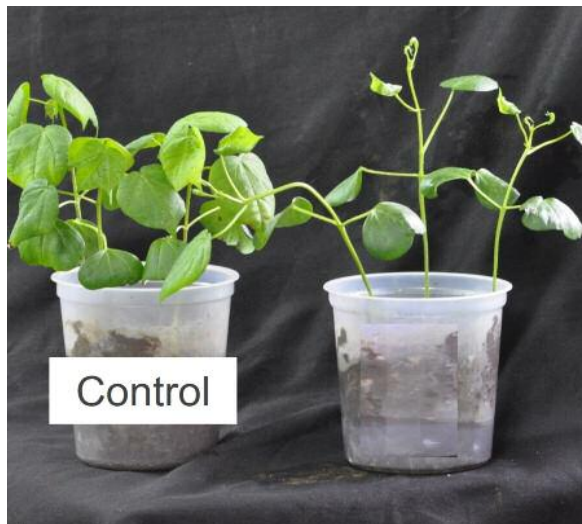
30% Alguna planta manifiesta el tallo moderadamente torcido, las hojas nuevas manifiestan síntomas de arrugamiento y retraso en la expansión foliar. Moderadas epinastia y/o hiponastia. Puede observarse menor crecimiento de las plantas



40% Algunas plantas manifiestan los tallos moderadamente torcidos, todas las plantas manifiestan retraso en la expansión foliar y hojas con síntomas de fitotoxicidad (arrugamiento). Moderadas epinastia y/o hiponastia. Se observa menor crecimiento de las plantas



50% Todas las plantas manifiestan los tallos severamente torcidos, no se ve inhibida la expansión de nuevas hojas pero se manifiesta un severo retraso en la expansión foliar y síntomas de fitotoxicidad en las hojas (arrugamiento). Severas epinastia y/o hiponastia. Se observa menor crecimiento de las plantas



60% Todas las plantas manifiestan muy severa epinastia y/o hiponastia: tallos muy retorcidos, los pecíolos de las hojas verdaderas muy enrulados, muy severo retraso en la expansión de nuevas hojas y muy severos síntomas de fitotoxicidad en las hojas (arrugamiento). Se observa menor crecimiento de las plantas



70% Todas las plantas manifiestan muy severa epinastia y/o hiponastia: tallos muy retorcidos, hojas nuevas con muy severa fitotoxidad y/o expansión foliar inhibida. Se observa menor crecimiento de las plantas



80% Todas las plantas muestran muy severa epinastia y/o hiponastia: tallos muy retorcidos, plantas postradas, los primordios foliares (nomófilos y protófilos) necróticos. Se observa menor crecimiento de las plantas



90% Todas las plantas muriendo, hojas en su mayoría necróticas, meristema apical inhibido o necrosado. Se observa menor crecimiento de las plantas





100% Todas las plantas muertas



14. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Alan Sannen por su esmero y dedicación en el trabajo realizado; y a Juan Carlos Papa, Francisco Bedmar, Marcos E. Yannicari y Natalia Pesquero por sus aportes y contribuciones.

15. BIBLIOGRAFIA

- Bennet RJ. 1989. The effects of 2,4-D iso-octyl ester/ioxynil herbicide in the liquid and vapour phases on the growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants, South African Journal of Plant and Soil, 6:1, 24-31, DOI: 10.1080/02571862.1989.10634474
- Gervais JA, Luukinen B, Buhl K, Stone D. 2008. 2,4-D Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>. Fecha de consulta: diciembre-2021
- Guderian R. 1985. Air pollution by photochemical oxidants. Ecological Studies 52. Berlin, Springer-Verlag.
- Houbraken M, van den Berg F, Butler Ellis CM, Dekeyser D, Nuyttens D, De Schampheleire M, Spanoghe P. 2016. Volatilization of pesticides under field conditions: inverse modelling and pesticide fate models. Pest Management Science 72: 1309–1321. <https://doi.org/10.1002/ps.4149>
- Leistra M. 2011. Methods for estimating the vapour pressure of organic chemicals; Application to five pesticides. Wageningen, Alterra, Alterra report 2215. 60 pp.; 2 fig.; 25 tab.; 102 ref.
- Penner D y Jan M. 2014. Bioassay for Evaluating Herbicide Volatility from Soil and Plants. Pesticide Formulation and Delivery Systems: 33rd Volume, "Sustainability: Contributions from Formulation Technology" STP 1569, 2014. www.astm.org / doi: 10.1520/STP156920120132 36-43.
- Pignata ML. 2003. Curso sobre: Empleo de biomonitores en estudios de contaminación atmosférica. Auspiciado por Swiss Contact, IBTEN, Instituto de Ecología, La Paz, Bolivia.
- Ronco A, Díaz Báez MC, Pica Granados Y. 2004. Conceptos generales. En: Castillo Morales G. (ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, México. 17-22.
- Santelmann PW. 1977. Herbicide bioassay. In B. Truelove, ed. Research methods in weed science. Auburn: Southern Weed Science Society. 79-87.
- Schreiber F, Avila LA, Scherner A, Gehrke VR, Gostinetto D. 2015. Volatility of different formulations of clomazone herbicide. Planta Daninha 33: 315-321.
- SENASA. 2023. Vademecum. Versión: 1.10.2. <https://aps2.senasa.gov.ar/vademecum/app/> Registro nacional de terapéutica vegetal. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria - Dirección de Tecnología de la Información Av. Paseo Colón 367 - Piso 11 - Capital Federal - C1063ACD - Buenos Aires, Argentina
- SINAVIMO. *Gossypium hirsutum*. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/gossypium-hirsutum>. Fecha de consulta: diciembre-2021.
- SIOVM. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados. Algodón *Gossypium hirsutum*. Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20829_sg7.pdf. Fecha de consulta: diciembre-2021.
- Tarragó JR, Fernández F, Marinich MJ, Lilles L. 2005. Estudio comparativo de la volatilidad de dos formulaciones del herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Resumen: A-019 Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Universidad Nacional del nordeste. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/5-Agrarias/A-019.pdf>. Fecha de consulta: diciembre-2021.
- Tayeb W, Chaieb I, Hammami, M. 2011. Environmental fate and effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicides. En: Piotrowsky KP (ed.) Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards, Nova Science Publisher, NY., pp. 161-187.
- Troiani HO, Prina AO, Muiño WA, Tamame MA, Beinticinco L. 2017. Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía. Editorial de la Universidad Nacional de La Pampa (EdUNLPam). 321 p. <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/110>
- Troyer JR. 2001. In the Beginning: The Multiple Discovery of the First Hormone Herbicides. Weed Science, 49: 290–297. <http://www.jstor.org/stable/4046518>

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida hormonal, fenoxi derivado, de acción sistémica y selectiva para el control de malezas de hoja ancha. Existen diferentes productos formulados comerciales que poseen como ingrediente activo distintas fórmulas químicas derivadas del ácido 2,4-D. Estos herbicidas presentan diferente potencialidad de volatilizarse.

La volatilización es el proceso de emisión de sustancias químicas a la atmósfera y depende de la presión de vapor de cada compuesto y de todos aquellos factores y condiciones ambientales que la atenúen o modifiquen. Los vapores resultantes de la volatilización pueden causar efectos adversos a los seres humanos a través de la exposición por inhalación en los sitios de aplicación, efectos negativos sobre cultivos sensibles y efectos biológicos en organismos no blanco a cierta distancia del lugar tratado.

La volatilización de los herbicidas se puede estimar a través de la metodología de bioensayos con plantas como especies indicadoras. El presente protocolo es un método sencillo, sensible y reproducible para evaluar la volatilización relativa de productos formulados comerciales del herbicida 2,4-D mediante la metodología de bioensayos. La metodología plantea la utilización de algodón como planta bioindicadora de la presencia de vapores del herbicida en la atmósfera de una cámara individual cerrada.



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía
Argentina