

Fitotóxicos como alternativa a herbicidas contaminantes

Alejandro Ronco Campaña

Resumen— Actualmente existen dos principales problemas con el uso masificado de herbicidas. La aparición de plantas resistentes a dichos compuestos, y la contaminación de los compartimentos naturales. Como posible solución a estos problemas se plantean los fitotóxicos naturales, destacando dentro de estos la familia de los ácidos benzohidroxámicos. En particular se ha prestado especial atención al D-DIBOA por sus propiedades alelopáticas y su comprobada biodegradabilidad tanto en el medio acuático como en el suelo. Se ha conseguido llevar a cabo su síntesis mediante una biotransformación con *E. coli* y se ha caracterizado enzimáticamente dicho proceso. Actualmente se está investigando en la optimización del mismo.

Palabras Claves— Alelopatía, Biotransformación, D-DIBOA, Fitotóxico, Química verde.

1. INTRODUCCIÓN

Los fitotóxicos son aquellos compuestos, de origen natural o antropogénico, que impiden el normal crecimiento y desarrollo de uno o más tipos de plantas cuando estas son expuestas a una dosis determinada de dicho compuesto, pudiendo llegar a provocar la muerte del vegetal.

Generalmente impiden que la planta lleve a cabo alguna función metabólica esencial, como puede ser la inhibición de la fotosíntesis mediante la alteración de los fotosistemas. En el caso de los fitotóxicos naturales, éstos suelen ser producidos por distintos organismos, entre los que destacan las propias plantas que los generan como mecanismo de defensa.

Por tal motivo, estos compuestos se emplean como herbicidas, principalmente en el ámbito de la agricultura. Desde finales del siglo XX, los avances en este campo han permitido incrementar la producción de los cultivos, destacando el desarrollo de herbicidas que fueran selectivos frente a las malas hierbas y que no afectasen al cultivo de interés.

Este ha sido un campo de aplicación de la biotecnología, que se ha centrado en la modificación genética de organismos, dotando a las plantas cultivadas de resistencia al fitotóxico, y en la producción de nuevos compuestos mediante biotransformación o biosíntesis.

Sin embargo, la aplicación masiva de herbicidas ha acabado provocando la aparición de biotipos de malas hierbas inmunes a la acción de éstos. Esto se debe al desarrollo del fenómeno de resistencia, por el cual a causa de una mutación aleatoria un individuo es capaz de sobrevivir a la exposición de una dosis de herbicida que sería letal para su especie. La resistencia puede deberse a una mutación estructural en la enzima que de forma normal se ve afectada por el herbicida. En el caso de ser heredable dicha mutación, tendrá lugar una selección positiva en favor de aquellos individuos que la presenten y, por consi-

guiente, irá aumentando su número dentro de la población silvestre. Al final la abundancia de los mutantes será tan grande que el herbicida que se empleaba inicialmente resultará inútil [1]. Este hecho plantea la necesidad de desarrollar nuevos herbicidas que sean capaces de actuar sobre las plantas resistentes, permitiendo así controlar su población. Para ello, es conveniente que estos nuevos fitotóxicos sean selectivos y actúen sobre mecanismos distintos a los que afectaban los herbicidas iniciales frente a los que se desarrolló la resistencia.

Por otro lado, gran parte de los herbicidas que se usaban comúnmente hasta hace relativamente poco tiempo presentaban un gran impacto en el medio ambiente, a causa de la acción inespecífica de estos compuestos sobre el resto de especies y compartimentos que componen el ecosistema. Su presencia puede causar que los seres vivos en-

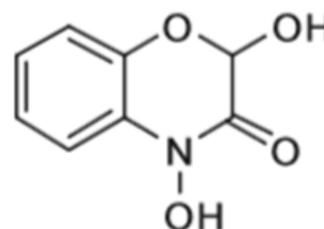


Fig. 1. Estructura química del DIBOA natural.

fermen o mueran dependiendo de su toxicidad, y dependiendo de su persistencia puede acumularse en el suelo, las aguas y los propios seres vivos dándose la biomagnificación [1]. Para evitar esto es preciso desarrollar una nueva generación de pesticidas que sean degradables por la propia autodepuración del sistema de forma rápida e inocua. Los fitotóxicos naturales se presentan como una posible solución.

Dentro de estos destaca la familia de los ácidos benzohidroxámicos. Este conjunto de químicos presenta como estructura principal el esqueleto (2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona.

Dichos ácidos benzohidroxámicos se encuentran de forma

normal en la naturaleza, concretamente son producidos por un amplio grupo de plantas, pertenecientes a las familias *Scrophlariaceae*, *Gramineae*, *Ranunculaceae* o *Poaceae* [2], [3]. En general dichos químicos presentan diferentes propiedades alelopáticas.

Según el Primer Congreso Mundial de Alelopatía celebrado en Cádiz en 1996, la alelopatía consiste en cualquier proceso en el cual estén involucrados metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias u hongos, que influyan sobre el crecimiento y desarrollo de otros sistemas biológicos [4], [5].

El 4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona, o D-DIBOA, destaca por su acción fitotóxica, fungicida, antimicrobiana e insecticida [6], [7], [8], [9], por lo que existe un gran interés en el desarrollo de su producción de forma eficiente y la aplicación de este y sus derivados, puesto que, ante ambos problemas anteriormente mencionados, el D-DIBOA se presenta como una posible solución por dos motivos. Puede servir como base para el desarrollo de nuevos herbicidas, puesto que se considera como la estructura más prometedora a la hora de la búsqueda de nuevos compuestos basados en el esqueleto de las benzoxacinonas [10]. Un ejemplo de esto son los estudios que se han realizado con algunos de sus derivados, de entre los cuales destacan el 6-Cl-4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona (6-Cl-D-DIBOA) y el 8-Cl-4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona (8-Cl-D-DIBOA) los cuales presentan una mayor actividad y selectividad respectivamente, resultando ser más fitotóxicos que los

compuesto de partida es el 2-nitrofenol, al cual se le realiza una sustitución nucleofílica para la activación del grupo fenol y la inserción de la cadena lateral, para lo cual es necesario el tratamiento con disolución de hidróxido potásico en etanol, dimetilformamida (DMF) y bromoacetato de etilo, obteniendo así el precursor 2-(2'-nitrofenoxi) acetato de etilo.

La segunda etapa se basa en una reacción de reducción del grupo nitro aromático a hidroxilamina, mediante una ciclación intramolecular por adición-eliminación sobre el éster de la cadena lateral empleando como catalizador Pd/C. Se trata de una reacción de catálisis heterogénea altamente exotérmica con liberación de hidrógeno, por lo

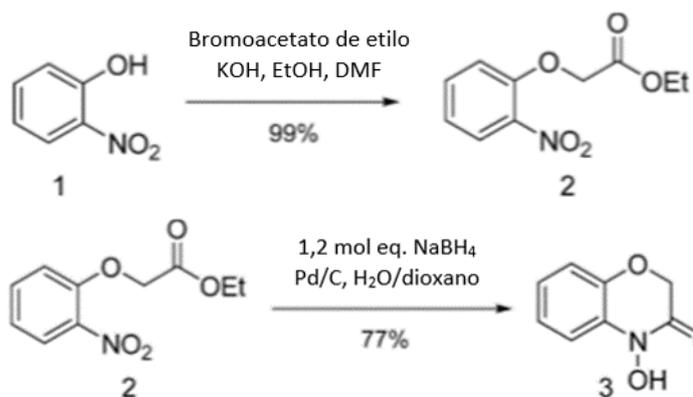


Fig. 3. Síntesis de ácido benzohidroxámico: (A) primera etapa: síntesis de etil 2-(2-nitrofenoxi) acetato (2) a partir de nitrofenol (1) y (B) segunda etapa: reducción del grupo nitro para la obtención de D-DIBOA (3).

que resulta ser muy peligrosa por el alto riesgo de explosión [13], [14], [15].

La primera etapa ha conseguido optimizarse mediante la variación de las condiciones de reacción, disminuyendo el tiempo de reacción a 24-28 h, y la temperatura a 55 °C; y la sustitución de algunos reactivos, como el uso de etanol en lugar de metanol [16].

Sin embargo, para la mejora de la segunda etapa se planteó el uso de la biotecnología como un modo para reducir los riesgos implicados en dicha etapa, así que se propuso que podría llevarse a cabo mediante una biotransformación lo que garantizaba de partida unas condiciones de reacción más suaves y, por tanto, menos peligrosas [15].

2.1. Biotransformación

La biotransformación se define como la modificación de un compuesto por un organismo vivo para dar un producto diferente al ser metabolizado y procesado por las enzimas o células de éste [15]. En el caso de los microorganismos, estas reacciones tienen lugar en sus condiciones de cultivo, las cuales suelen encontrarse a temperaturas de entorno a los 37 °C, a excepción de los extremófilos. El medio de cultivo no suele contener sustancias de carácter tóxico y se desarrollan a presión atmosférica. Todo esto implica que, por lo general, son reacciones que tienen lugar en condiciones no peligrosas y que los requerimientos para llevarlas a cabo son relativamente bajos si se compara con algunos de los reactivos necesarios en las síntesis químicas.

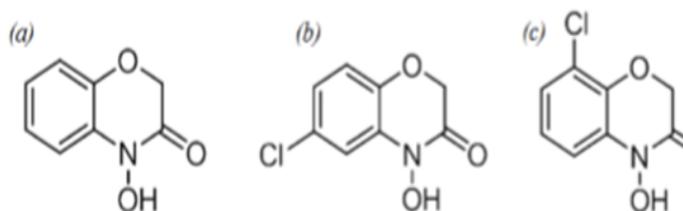


Fig. 2. Estructura del D-DIBOA (a), 6-Cl-D-DIBOA (b) y 8-Cl-D-DIBOA (c) sintéticos.

compuestos que no presentan sustituyentes en su anillo aromático [11], [12].

Igualmente el D-DIBOA, pese a ser una molécula estable, es completamente degradable en el suelo [2], [3], lo cual supone una gran ventaja puesto que reduce o elimina prácticamente por completo el riesgo de contaminación, por lo que no habrá biomagnificación, y el fitotóxico únicamente se encontrará en el medio durante el periodo de tiempo que es adecuado para su aplicación. Todo esto hace que el D-DIBOA, en particular, sea un producto de gran interés, y que se investiguen tanto sus usos y aplicaciones como la mejora de su producción.

Por estos motivos en el presente artículo se profundizará en el D-DIBOA.

2. SÍNTESIS

Inicialmente la síntesis del D-DIBOA se llevaba a cabo mediante una síntesis química en dos etapas (Fig. 3.). El

De esta forma la biotransformación se plantea como una posible ventaja en todos aquellos procesos donde sea aplicable. Se estudió la posible biotransformación a partir del precursor etil 2-(2-nitrofenoxi) acetato en D-DIBOA empleando dos cepas distintas *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* tanto en condiciones aerobias como anaerobias a escala laboratorio. Se consiguió producir D-DIBOA, el mejor resultado se obtuvo para *Escherichia coli* en condiciones aerobias [15]. Sin embargo, los bajos rendimientos obtenidos en estos primeros estudios condujeron a profundizar en el estudio del mecanismo de la biotransformación.

2.1.1. Enzimas involucradas en la síntesis de D-DIBOA mediante biotransformación

Los microorganismos empleados para realizar la biotransformación deseada se seleccionaron porque ambos presentaban de forma natural actividad nitroreductasa, las enzimas responsables de esta actividad tienen como función catalizar la reducción de grupos nitro hasta hidroxilaminas en moléculas nitroaromáticas análogas al precursor [15], [17].

Por este motivo, se procedió al estudio a nivel enzimático, para determinar qué enzimas eran las implicadas en el proceso de biotransformación y poder así comprender mejor el proceso y poder obtener una cepa que produjera mayores rendimientos empleando herramientas de ingeniería genética. Se comprobó que las enzimas implicadas eran las nitroreductasas oxígeno-sensibles, concretamente la nitroreductasa monomérica (NfsA), la dihidropteridina reductasa monomérica (NfsB) y la N-etilmalamida reductasa (NemA). Para descubrir la importancia de cada una dentro del proceso se crearon mutantes simples, dobles o triples en los cuales se deleccionaron los genes NfsA, NfsB, NemA, NfsA/NfsB, NfsA/NemA, NfsB/NemA, NfsA/NfsB/NemA respectivamente, y se llevó a cabo el proceso de biotransformación con cada una de las nuevas cepas mutantes. De esta forma podría comprobarse el efecto de cada una de las enzimas en la producción de D-DIBOA [18]. En cada experimento se estudió tanto el rendimiento de la biotransformación como la productividad específica, obteniendo como resultado que las enzimas que realmente realizan la biotransformación son NfsA y NfsB. Por este motivo se realizó la clonación de los genes codificantes de estas enzimas en un vector de expresión inducible y se ensayó el proceso de biotransformación del precursor de D-DIBOA, alcanzándose un rendimiento cercano al 60% al sobreexpresar el gen NfsB (cepa *Escherichia coli* nfsB/pBAD-NfsB).

El vector elegido para la sobre expresión del gen NfsB fue el pBAD/His A (Fig. 4.) [14]. Este es un plásmido de 4,1 kb, que contiene un gen de resistencia a la ampicilina y es capaz de modular diferentes niveles de expresión de genes ya que la transcripción de los genes está regulada por el promotor araBAD que se activa en presencia de concentraciones de L-arabinosa de entre el 0,01 y 0,02% [19]. Un plásmido es un fragmento de ADN de doble cadena, generalmente en estado circular, que se encuentra en el citoplasma de bacterias y levaduras, y aunque no se encuentra integrado en los cromosomas permite a la célula

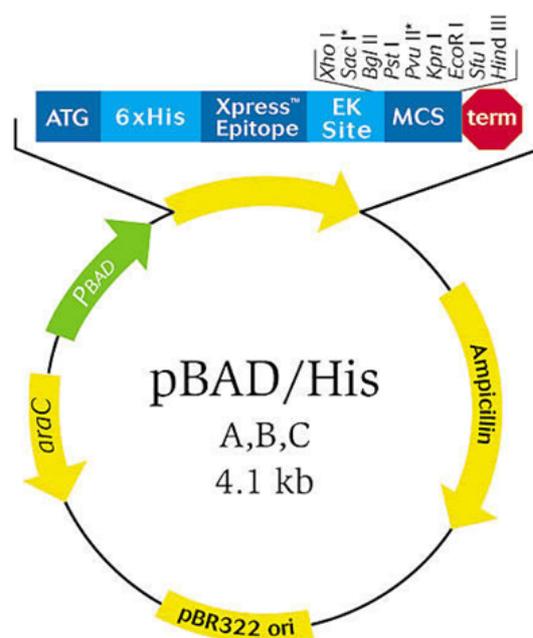


Fig. 4. Estructura plásmido pBAD/His A.

la expresar los genes que este contiene.

El plásmido contiene el promotor pBAD del operón arabinosa y su gen regulador AraC [20]. La proteína AraC actúa tanto como regulador positivo como negativo [21]. En presencia de arabinosa el transcripto de pBAD se activa, mientras que en su ausencia la transcripción ocurre a muy bajo nivel [22]. Los niveles de expresión no inducidos pueden reducirse más aún en presencia de glucosa. La glucosa reduce los niveles de AMP cíclico 39 y 59, reduciendo así la expresión del represor catabólico del promotor pBAD [23]. De esta manera se regula la expresión del gen clonado en el vector, NfsB en nuestro caso, pudiendo así inducir su sobre expresión para conseguir un mayor rendimiento en la biotransformación.

La enzima NfsB es dependiente de la disponibilidad de NADH y NADPH, puesto que los utiliza como donadores de electrones (e-). Por este motivo, una forma de mejorar el rendimiento de la biotransformación sería tratar de conseguir una mayor disponibilidad de poder reductor en el medio para conseguir aumentar la eficacia de la acción enzimática [15], [18].

5. CONCLUSIONES

Los fitotóxicos, ya sean naturales o antropogénicos, en general, y el D-DIBOA en particular, parecen ser una prometedora solución a los problemas planteados asociados al uso de herbicidas. La síntesis mediante biotransformación del D-DIBOA ofrece muchas ventajas sobre la síntesis química tradicional, como son unas condiciones reactivas mucho más seguras y el uso de reactivos de menor coste; integrándose de esta manera dentro de los procesos que pueden catalogarse como química verde. Sin embargo este proceso todavía requiere mucha investigación para su optimización, como son el microorganismo, las condiciones de cultivo, el precursor, el inductor, modi-

ficaciones genéticas y mayor disponibilidad de poder reductor entre otros. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones para poder conseguir la producción de D-DIBOA de forma eficaz mediante biotransformación a escala de laboratorio, con la perspectiva de su posterior escalamiento a planta piloto y finalmente a la industrial si fuera posible.

Apostar por el desarrollo de este tipo de fitotóxicos y su empleo supondrá un gran número de ventajas, en referencia al medio ambiente, dado que no son contaminantes y únicamente afectan a los organismos diana, y a nivel de producción puesto que en numerosas ocasiones se plantean procesos de producción más económicos y seguros aunque necesiten un mayor desarrollo todavía.

REFERENCIAS

- [1] Flamini, G. (2012). Natural herbicides as a safer and more environmentally friendly approach to weed control: A review of the literature since 2000. *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 38). Elsevier B.V. 354-355.
- [2] Virtanen AI, Hietala PK. The structures of the precursors of benzoxazinone in rye plants II. *Suom Kemistil B* 1959;32:252.
- [3] Hamilton RH, Bandurski RS, Reusch WH. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamate from *Zea mays*. *Cereal Chem* 1962;39:107-13.
- [4] Torres, A., Oliva, R. M., Castellano, D., Cross, P. (1996). First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future. SAI (University of Cadiz). Cadiz, Spain.
- [5] Anaya, A. L. (2003). *Ecología química*. 1ª edición. México, D. F: Plaza y Valdes. 255.
- [6] Macías, F. A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Molinillo, J. M. G. (2006). Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9357-9365.
- [7] Niemeyer, H. M. (1988). Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*, 27(11), 3349-3358.
- [8] Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastida A, Molinillo JMG. Rediscovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones. *Nat Prod Rep (UK)* 2009;26:478-89.
- [9] Macías FA, Molinillo JM, Galindo JC, Varela RM, Simonet AM, Castellano D. The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. *J Crop Prod* 2001;4:237-55.
- [10] Chinchilla, N., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Molinillo, J. M. G., & Macías, F. A. (2015). Soil biodegradation of a benzoxazinone analog proposed as a natural products-based herbicide. *Plant and Soil*, 393(1-2), 207-214.
- [11] Macías, F. A., De Siqueira, J. M., Chinchilla, N., Marín, D., Varela, R. M., & Molinillo, J. M. G. (2006). New herbicide models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9843-9851.
- [12] Macías, F. A., Chinchilla, N., Varela, R. M., Molinillo, J. M. G., Marín, D., & de Siqueira, J. M. (2009). Aromatic-ring-functionalised benzoxazinones in the system *Oryza sativa*-*Echinochloa crusgalli* as biorational herbicide models. *Pest Management Science*, 65(10), 1104-1113.
- [13] Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A, Chinchilla D, Simonet AM, Molinillo JMG. Isolation and synthesis of allelochemicals from Gramineae: benzoxazinones and related compounds. *J Agric Food Chem* 2006;54:991-1000
- [14] Valle, A., Cabrera, G., Molinillo, J.M.G., Gómez, J.M., Macías, F.A., Cantero, D.. Biotransformation of ethyl 2-(2-nitrophenoxy) acetate to benzohydroxamic acid (D-DIBOA) by *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. (2011). 46, 358-364.
- [15] Gross, E. M. (2015). Optimización de la Síntesis Química del Precursor "2-(2'-nitrofenoxi) acetato de metilo" partiendo del 2-nitrofenol. Trabajo fin de Grado (Grado en Química). Universidad de Cádiz.
- [16] González-Pérez MM, Pieter Van D, Rolf MW and Juan LR. *Escherichia coli* has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth. *Environmental Microbiology. Applied genetics and molecular Biotechnology*. (2007); 9(6): 1535-1540.
- [17] Valle, A., Le Borgne, S., Bolívar, J., Cabrera, G., & Cantero, D. (2012). Study of the role played by NfsA, NfsB nitroreductase and NemaA flavin reductase from *Escherichia coli* in the conversion of ethyl 2-(2'-nitrophenoxy) acetate to 4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (D-DIBOA), a benzohydroxamic acid with interesting bi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1), 163-171.
- [18] Guzman LM, Belin D, Carson MJ and Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*. (1995); 177(14): 4121-4130.
- [19] Lee, N. 1980. Molecular aspects of ara regulation, p. 389-410. In J. H. Miller and W. S. Reznikoff (ed.), *The operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [20] Carra, J. H., and R. F. Schleif. 1993. Variation of half-site organization and DNA looping by AraC protein. *EMBO J*. 12:35-44
- [21] Lee, N., C. Francklyn, and E. P. Hamilton. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8814-8818.
- [22] Miyada, C. G., L. Stoltzfus, and G. Wilcox. 1984. Regulation of the araC gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, auto-regulation, and effect on araBAD expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4120-4124.



Alejandro Ronco Campaña recibió el título de Biotecnólogo por la Universidad de Cádiz en 2017, estudiante de primer curso del Máster en Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria por la Universidad Pablo de Olavide.