



Metodologies analítiques per a l'estudi de compostos al·leloquímics en conreus de blat

Marta Villagrasa Giménez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



Facultat de Química
Departament de Química Analítica



Institut de Diagnòstic Ambiental i
Estudis de l'Aigua (IDAEA-CSIC)
Departament de Química Ambiental

METODOLOGIES ANALÍTIQUES PER A L'ESTUDI DE COMPOSTOS AL·LELOQUÍMICS EN CONREUS DE BLAT

Marta Villagrasa Giménez
Novembre 2013

CAPÍTOL I.- INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS



I.1.	El cultiu de blat	11
I.2.	Plaguicides i la problemàtica ambiental	24
I.3.	Al·lelopatia	29
I.4.	Al·lelopatia en cereals	44
I.5.	Anàlisi de compostos al·lelopàtics en el blat	55
I.6.	Publicació científica	65
	<i>Publicació científica #1#. "Analysis of benzoxazinone derivatives in plant tissues and their degradation products in agricultural soils"</i>	
I.7.	Estat de l'art de les metodologies d'anàlisi des del 2009 al 2013	79
I.8.	Objectius generals	83
I.9.	Referències	85

CAPÍTOL I.- INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

I.1. EL CULTIU DE BLAT

L'inici del cultiu de les plantes va tenir lloc en l'anomenada revolució neolítica on es va donar un canvi en la forma de vida de la humanitat, que va passar de ser nòmada a sedentària i d'economia recol·lectora a productora [1]. El procés va coincidir amb canvis climàtics molt intensos que deurién forçar a les societats humanes, que ja eren abundants i estaven organitzades, a modificar radicalment la seva manera de viure.

Estudis amb marcadors moleculars han mostrat que totes les formes de blat cultivades tenen el seu origen en el sud-oest de Turquia, el que és conegut com la regió del *Creixent fèrtil*, des d'on es van distribuir cap al nord i el sud de la Mesopotàmia fa uns 10.000 anys. Posteriorment, es va distribuir per tota la conca mediterrània, fins arribar a Itàlia i Espanya farà uns 7.000 anys [2-4].

El blat pertany a la divisió Magnoliophyta, classe *Liliopsida*, ordre *Poales*, família *Gramínies* (Poaceae), subfamília *Pooideae*, tribu *Triticeae* i gènere *Triticum*. Existeixen al voltant de 30 tipus de blat amb suficients diferències genètiques entre ells com per ser considerats espècies o subespècies diferents [5]. Les espècies del gènere *Triticum* poden agrupar-se en tres seccions naturals distingibles pel seu número bàsic de cromosomes (7, 14 o 21). Actualment, els blats comercials pertanyen bàsicament a les espècies *Triticum turgidum var. Durum* (tetraploide, $2n=28$, genoma AABB), blat dur, el producte comercial del qual és la pasta i els seus derivats, i el *Triticum aestivum* (hexaploide, $2n=42$, genoma AABBDD), conegut com a blat fariner o blat tou [6].

Des d'un punt de vista morfològic (Figura I.1), la planta de blat es caracteritza per presentar un sistema radical compost per arrels primàries i arrels secundàries que

neixen del nus de l'afillament i que apareixen quan la planta emet les tiges. Les arrels assoleixen en la seva majoria una profunditat de 25cm, arribant algunes d'elles fins a un metre de profunditat. La tija és una canya buida amb 6 nusos que s'allarguen cap a la part superior, assolint entre 0,5 i 2 metres d'alçada. Les fulles tenen una forma linear i en llança (allargades, rectes i acabades en punta) amb una beina, lígula i aurícules ben definides. La inflorescència és una espiga composta per un raquis (eix escalonat) o tija central d'entrenusos curts, sobre el qual van disposades de 20 a 30 espiguetes en forma alterna. Els grans són cariòpsides que presenten forma ovalada amb els seus extrems arrodonits. El germen sobresurt en un d'ells i en l'altre hi ha un floc de pèls fins. La resta del gra, anomenat endosperma, és un dipòsit d'aliments per a l'embrió, que representa el 82% del pes del gra. Al llarg de la cara ventral del gra hi ha una depressió (solc), una invaginació de l'aleurona i totes les cobertes. En el fons del solc hi ha una zona vascular fortament pigmentada. El pericarpi i la testa, juntament amb la capa aleurona, conformen el segó de blat [7].

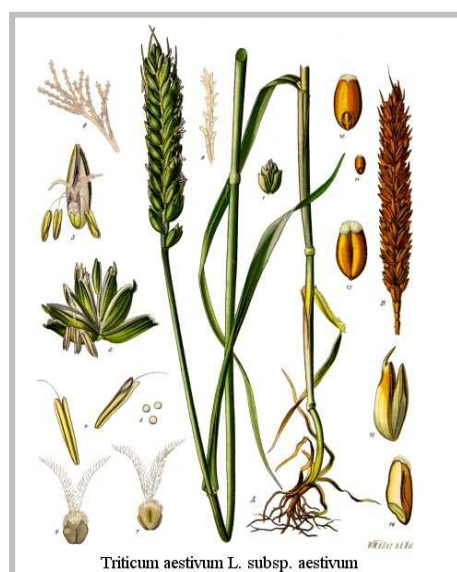


Figura 1.1.- Morfologia de la planta de blat *Triticum aestivum*. (<http://en.citizendium.org/wiki/wheat>)

Durant el cicle de cultiu del blat, es produeixen canvis tant a nivell morfològic extern de la planta, visibles per l'ull humà (creixement+desenvolupament), com en l'activitat dels teixits (desenvolupament), no sempre perceptibles. La descripció dels diferents estadis pels quals es desenvolupa el blat es pot dur a terme mitjançant l'ús de diferents escales,

les quals permeten tenir una referència precisa dels diferents estadis de creixement pels quals passa el cultiu. L'escala de Zadoks és la més usada en el cultiu de cereals i descriu els estadis morfològics externs, que involucren alguns processos de desenvolupament i altres de creixement. Conèixer i/o identificar a quin nivell de l'escala es troba el cultiu és de gran importància per tal de tenir en compte els factors que el regulen i modifiquen, com per exemple el moment adequat en l'ús de plaguicides. L'escala de Zadoks té 10 fases subdividides cadascuna d'elles en 9 sub-fases que en descriuen el cultiu (Figura I.2).

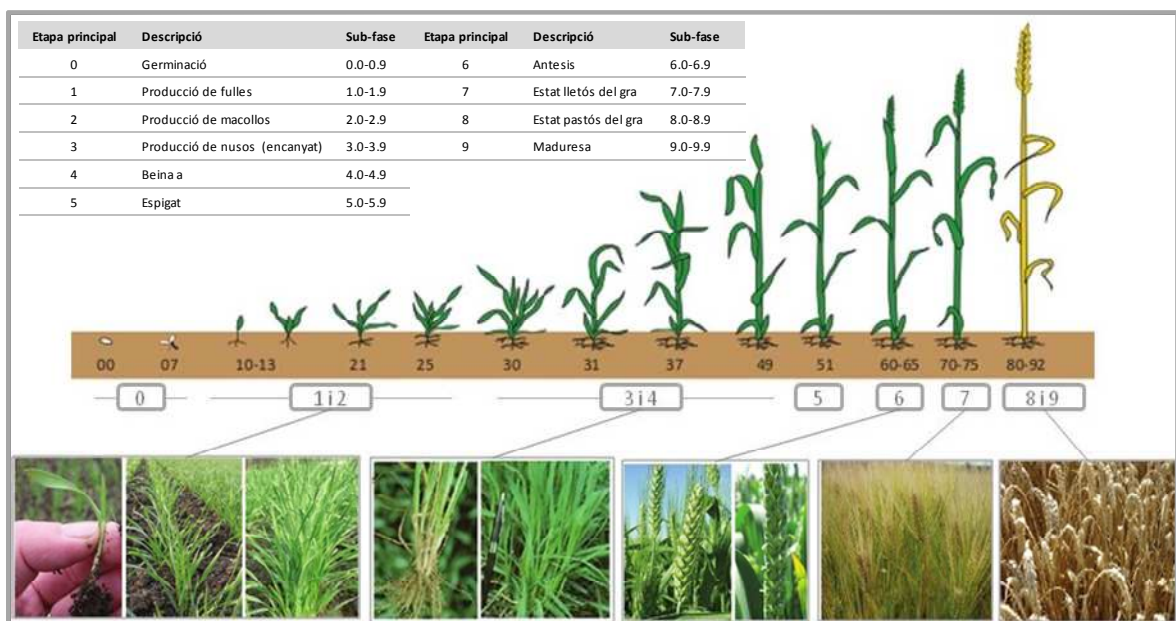


Figura I.2.- Escala de Zadoks en el cultiu de blat [8]

Durant milers d'anys, el blat ha estat l'aliment bàsic de les principals civilitzacions a Europa, oest d'Àsia i nord d'Àfrica. Aquest cereal es cultiva en una ampla gamma d'ambients climàtics i regions geogràfiques. Segons dades de la FAO l'àrea de cultiu de cereals al món compren 699 milions d'hectàrees, amb una producció de 2.264 milions de tonelades per a l'any 2009 de les quals 684 milions corresponen al cultiu de blat [9].

El blat ha format i segueix formant part del desenvolupament econòmic i cultural de l'home, essent un dels cultius més estesos mundialment. La Figura I.3 mostra la producció de cereals a nivell mundial per a l'any 2009, així com la seva estimació i pronòstic en els anys posteriors.

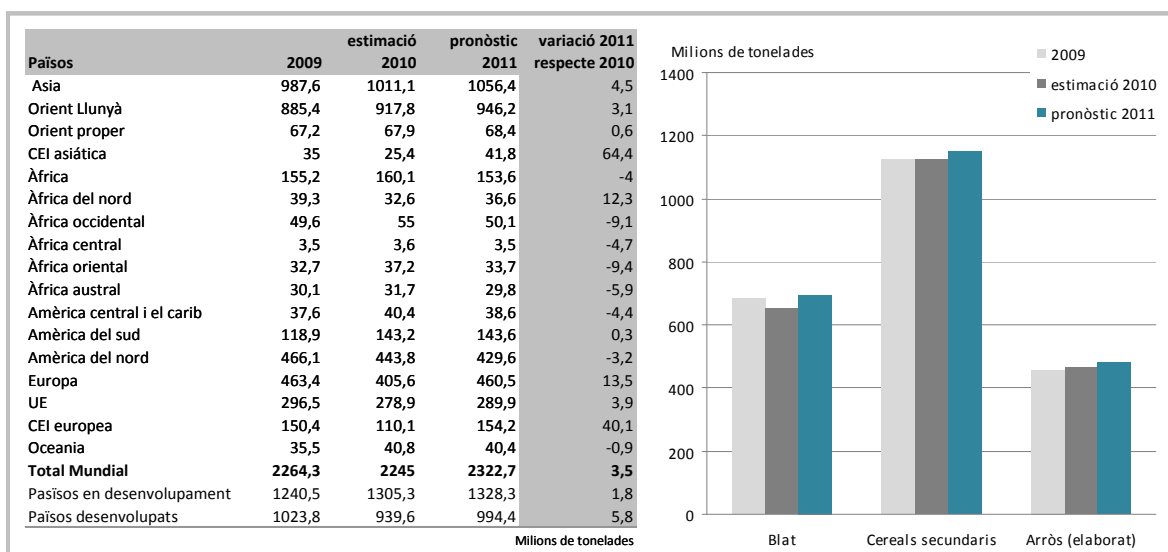


Figura I.3.- Producció de cereals a nivell mundial (Adaptació de [9])

I.1.1. Presència de males herbes en cultius de cereals

En els cultius extensius, el control de les males herbes juntament amb el de plagues i altres malalties, és un aspecte de gran importància a tenir en compte per tal d’obtenir la màxima producció possible. La Societat Espanyola de Malherbologia defineix una mala herba com a “qualsevol planta que interfereix amb els objectius i necessitats de l’home”. Per tant, en general és una planta que creix en un indret on no ha estat cultivada, que competeix amb el cultiu d’interès i interfereix negativament en l’activitat agrícola. Les males herbes poden competir amb els cultius per l’aigua, la llum, els nutrients del sòl, l’espai i el CO₂. Altres problemes associats a les males herbes, és que poden servir d’hostes a malalties i insectes o produir substàncies químiques que puguin ser tòxiques als humans o altres plantes [10].

Segons Baker [11] les característiques que fan que unes determinades espècies es comportin com a males herbes es deuen essencialment a diferents factors. Les males herbes produeixen desenes o centenars de milers de llavors, mentre que les plantes de cultiu només poden produir centenars de llavors per planta. La població s’estableix ràpidament, i poden produir llavors viables sota condicions desfavorables en un període relativament curt de temps (entre 6 o 7 setmanes). Les seves llavors poden romandre en

un estat temporal sense germinar degut a diversos factors com la temperatura, l'exposició a l'oxigen i la presència d'inhibidors químics, etc. Posseeixen mecanismes per dispersar les llavors, de manera que moltes d'elles presenten estructures especials que els hi permeten enganxar-se, volar o flotar i d'aquesta manera aconseguen dispersar la seva població. Aquests factors contribueixen a la llarga extensió de les males herbes en el camps de cultiu.

Malgrat els efectes negatius, algunes d'elles poden actualment aportar alguns beneficis com: establir i addicionar matèria orgànica al sòl; proveir d'hàbitat i menjar a la fauna i aportar productes pel consum humà.

Tot i que les principals espècies de males herbes poden ser força diferents d'una regió a una altra, d'una explotació a una altra o inclús en diferents parcel·les d'una mateixa explotació, es pot parlar d'unes quantes espècies esteses per tota la geografia espanyola i que representen una sèria amenaça per la seva competitivitat amb el cultiu, per la dificultat del seu control i per la ràpida expansió de la seva població. Entre elles es poden citar per exemple a algunes de les gramínies anuals més comuns tals com [12] :

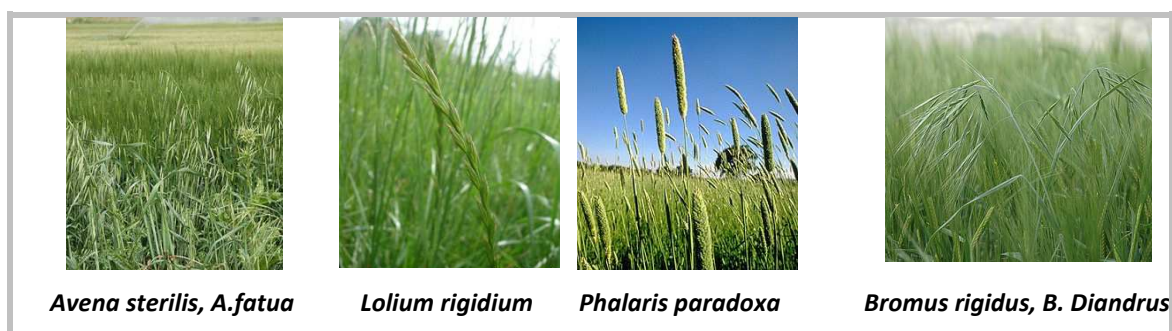
Avena sterilis*, *A.fatua comunament anomenada com a "avena loca", "ballueca" o "cogula" (Figura I.4). Aquesta espècie, estesa per tota la península, té un cicle biològic gairebé idèntic al dels cereals, germinant simultàniament amb ells i durant un període de temps perllongat. Aquesta característica juntament amb la seva capacitat per emergir a partir de profunditats relativament elevades i a la forta resistència de les seves llavors en el sòl, en facilita el seu desenvolupament i permanència en terrenys llaurats. S'ha estimat que una densitat de 5 plantes/m² pot causar una pèrdua del 10% en el rendiment del cultiu i densitats de 100 plantes/m² poden arribar a causar pèrdues del 40%.

Lolium rigidum comunament anomenada com a "vallico" o "margall"(Figura I.4). Aquesta espècie està especialment estesa en els cultius de cereals catalans. Germina amb les primeres pluges de la tardor, iniciant el seu naixement abans de la sembra. La seva competitivitat amb el cultiu de cereal és molt menor que en l' *Avena*. S'estima que la

presència de 20 plantes/m² poden causar un 10% de pèrdues en la producció del cultiu, de manera que són necessàries 4 plantes de *Lolium* per provocar un efecte equivalent a 1 planta d'*Avena*.

Phalaris paradoxa*, *P. minor*, *P. brachystachys comunament anomenades com a “alpistes”(Figura I.4). És probablement de les gramínies més problemàtiques en els cereals d'Andalusia, donat que la seva importància és molt menor a la resta de regions. Aquesta planta inicia el seu creixement durant les estacions de tardor-hivern, i si les pluges són suficients es pot donar fins la primavera. L'emergència és principalment superficial, de manera que es pot frenar el seu creixement enterrant les seves llavors a certa profunditat. La seva persistència en el sòl és molt menor que el de l'*Avena* però major que la del *Lolium*. La competència amb el cultiu de cereals és relativament elevada, s'han observat pèrdues d' entre el 7 i 25% en el cultiu de blat.

Bromus rigidus*, *B. Diandrus comunament anomenades com a “bromo” o “espigajo”(Figura I.4). Era molt comú veure-les en els marges dels camins i camps conreats, i com a conseqüència s'han establert ràpidament en els cultius provocant problemes importants. Aquestes espècies estan molt ben adaptades per emergir des de la zona més superficial del sòl, el que explica la seva aversió per camps llaurats. El seu període d'aparició és molt breu, iniciant-se amb les primeres pluges de la tardor, i pràcticament totes les seves llavors germinen a l'any següent de ser produïdes. En aquest sentit, resulta fàcil controlar-la amb rotacions de cultius o treballant el camp. Són suficients 10 plantes/m² per tal de causar danys significatius en el cultiu.



Avena sterilis*, *A.fatua

Lolium rigidum

Phalaris paradoxa

Bromus rigidus*, *B. Diandrus

Figura I.4.- Espècies de males herbes Gramínies anuals.

A més a més de les quatre gramínies mencionades anteriorment, existeixen algunes espècies de dicotiledònies anuals amb alta nocivitat, ja sigui per la seva abundància, competitivitat o per la dificultat que comporta el seu control (Figura I.5). Una d'elles és la *Papaver rhoeas* "rosella", la seva problemàtica es deu més a la seva gran abundància, associada a una enorme producció de llavors i a una elevada persistència d'aquestes a terra, que a la seva competitivitat amb el cultiu (relativament baixa) o a l'escassa dificultat del seu control. Una cosa semblant passa amb la *Sinapis arvensis*, *Diplotaxis erucoides* "jaramagos" tot i que la seva competitivitat amb el cultiu pot arribar a ser bastant elevada. Finalment, tenim el cas de *Galium aparine* (lapa) la "lapa", una espècie enfiladissa de ràpid creixement que pot arribar a ofegar gairebé completament al cereal. S'estima que són suficients 2 plantes/m² d'aquesta espècie per causar danys significatius al cultiu. Un problema afegit d'aquesta espècie és la dificultat de controlar-la amb els herbicides habituals, el que exigeix invertir en herbicides específics per al seu control.



Figura I.5.- Espècies de males herbes dicotiledònies.

I.1.2. El control de les males herbes

Hi ha bàsicament tres sistemes per dur a terme el control de les males herbes: l'agricultura ecològica, els mètodes de control directe i l'agricultura industrial [12, 13].

I.1.2.1. Agricultura ecològica

Es tracta d'un sistema global de gestió de la producció, que incrementa i realça la salut dels sistemes agrícoles, incloent la diversitat, els cicles i l'activitat biològica del sòl. S'aconsegueix aplicant, sempre que sigui possible, mètodes agronòmics, biològics i mecànics, en contraposició a l'ús de materials sintètics com els herbicides. L'agricultura

ecològica es basa en el respecte al medi ambient i en la producció d'aliments de màxima qualitat tant en la seva presentació, sabor i contingut alimentari a través de tècniques que:

- Estiguin integrades en el sistema agrícola, de manera que no produeixin impactes ambientals.
- Potenciïn la fertilitat natural del sòl i la capacitat productiva del sistema agrícola, i en garanteixin la continuïtat de la producció.
- No incorporin substàncies o residus als aliments produïts que puguin ser perjudicials per la salut.
- Respectin els cicles naturals dels cultius.

Els mètodes preventius són els més usats en agricultura ecològica i són de les tècniques de control més antigues. Prohibeixen l'ús de productes químics i tracten d'evitar la difusió de les llavors, i per tant l'establiment de les espècies problemàtiques. Són mesures molt eficaces a llarg plaç, però que, malauradament no es practiquen habitualment. En general, persegueixen aconseguir la reducció de llavors en el sòl, evitant la invasió de noves espècies locals o al·lòctones.

Dins els mètodes preventius cal destacar:

La rotació de cultius que consisteix bàsicament en intercalar en anys successius diferents tipus de conreus, de manera que les males herbes troben condicions i ambients diferents cada any. D'aquesta manera els serà molt més difícil germinar, desenvolupar-se i establir-se definitivament.

Els cultius associats on es conreen simultàniament diferents plantes per tal que es beneficiïn unes de les altres i s'aprofitin tots els recursos disponibles. Com a exemple hi ha l'associació del blat de moro-mongeta-carabassa, on el blat de moro permet a les mongetes trepar per tal de buscar la llum, i aprofitar el nitrogen que fixa la lleguminosa, i la carabassa explora la superfície del sòl, beneficiant-se de la ombra i humitat.

L'associació d'aquest cultiu ombreja la zona on creix afectant d'aquesta manera en el desenvolupament de les males herbes.

Ús de llavors certificades que es caracteritzen per estar netes, pures i lliures de males herbes. L'agricultor ha de fer un esforç econòmic inicial per adquirir aquestes llavors que serà àmpliament compensat al no aparèixer espècies indesitjables en el cultiu. La llavor certificada és la única que en garanteix aquestes propietats.

La neteja de la maquinària i els marges és una tasca de gran importància per tal de no infestar els nous camps, ja que freqüentment la recol·lectora arrossega llavors de males herbes, que podrien germinar i establir-se fàcilment d'un camp a un altre. La neteja dels marges dels cultius, tals com les vores d'un camí, riberes, sèquies, etc. s'ha de fer amb molt de compte, ja que moltes espècies presents en aquestes zones poden entrar a l'interior dels cultius i arribar a establir-se. S'ha donat el cas de la introducció i adaptació ràpida d'algunes espècies no molt freqüents a Espanya com el *Bromus*.

I.1.2.2. Mètodes de control directe

Així com els mètodes preventius no contemplen sota cap manera l'ús de productes químics, els mètodes de control directe combinen les tècniques dels mètodes de l'agricultura ecològica amb l'ús d'herbicides. Entre els mètodes de control directe es troben els mètodes culturals agronòmics, físics, mecànics i biològics.

I.1.2.2.1. Mètodes culturals agronòmics

Aquests mètodes inclouen pràctiques que influeixen directa o indirectament sobre les males herbes, aconseguint un control integrat d'aquestes de cara a una agricultura sostenible. Es pot parlar de la rotació de cultius, de guarets, selecció de la varietat, la fertilització i les dates i densitat de sembra.

La rotació de cultius i els guarets, així com la preparació del terreny s'han utilitzat des de l'antiguitat, amb finalitats diverses. Determinats cultius presenten una flora arvense

característica, que es veu afavorida quan els cultius es repeteixen, i la utilització consecutiva de certs herbicides fa que algunes males herbes siguin més resistents i altres més sensibles, de manera que s'han d'anar alternant, no tan sols els cultius, sinó les matèries actives, les seves mescles i dosis.

Respecte a la **selecció de la varietat**, és ben conegut que existeixen cultius que competeixen millor que altres amb les males herbes. Fet que pot ser degut a la ràpida germinació, creixement, frondositat, etc. A més a més de les diferències genètiques entre varietats de cultiu, l'ús de diferents pràctiques agronòmiques poden augmentar la competitivitat dels cultius, com la sembra a altes densitats, essent precís combinar totes aquestes opcions abans d'aconseguir una agricultura de conservació eficaç.

La **fertilització** és una de les millors mesures de control de les males herbes, ja que es pot aconseguir una estimulació del creixement del cultiu principal, no obstant no és tan senzill com aplicar-lo sinó saber quan s'ha d'aplicar. Una correcta elecció del moment d'aplicació de l'adob de coberta, desfavorirà el creixement d'algunes espècies no desitjables. Adobar amb suficient antelació a la sembra pot resultar interessant per tal d'eliminar plàntules posteriorment. No obstant, s'ha d'anar amb compte ja que un adob amb nitrats pot afavorir la germinació d'algunes llavors en estat latent de certes espècies com pot ser l'*Avena fàtua*. De la mateixa manera, certs adobs amb fems poc fermentats poden ser grans focus d'infestes, ja que contindran grans quantitats de llavors de males herbes.

En relació a les **cobertures vegetals**, existeix un cas particular d'ús de competència interespecífica, que es la competència vegetal viva o "living mulch". Consisteix en una associació de dos o més cultius que, sense arribar a interferir l'un amb l'altre, són capaços de cobrir el sòl.

La data i la densitat de la sembra també són factors a tenir en compte de cara al control de les males herbes. Un retràs en la data de sembra d'un cereal pot ser útil per lluitar

contra moltes gramínies, permetent les primeres germinacions i eliminant les plàntules, llaurant o amb un herbicida no residual.

I.1.2.2.2. *Mètodes físics*

Els mètodes físics tenen com a objectiu impedir la germinació o el creixement de les males herbes sotmetent-les a cremes o a un intens calor, o mitjançant barreres físiques com cobertures inerts.

Des de l'antiguitat es té constància de la **crema de rostolls** dels cereals. El procés de crema té avantatges com la seva senzillesa i baix cost, però desavantatges com la l'agressió al medi i la fauna, el possible descontrol del foc i l'empobriment del sòl en quant a matèria orgànica.

La **solarització** consisteix en cobrir el sòl, prèviament regat, amb una làmina de polietilè transparent i deixar que el sol l'escalfi aproximadament durant un mes a l'estiu. D'aquesta manera s'aconsegueix dificultar enormement la germinació de les males herbes, a més a més de controlar alguns nematodes i fitopatògens del sòl.

I.1.2.2.3. *Mètodes mecànics*

El control de la flora herbàcia s'ha dut a terme tradicionalment a través de mitjans mecànics, com la llaurada, la sega o l'escarda. Aquests procediments es basen en arrancar, fragmentar, enterrar o tallar les males herbes dels cultius.

Llaurant el camp s'aconsegueix la destrucció de la mala herba a través de diverses operacions mecàniques senzilles. En funció del tipus d'eina emprada la destrucció es dona per enterrament, arrencament, fragmentació, compressió o bé per rotació.

La sega de les males herbes s'ha de realitzar abans que aquestes estiguin molt desenvolupades, per evitar-ne la reproducció de llavors. Per aquesta raó, les segues són especialment recomanables en el control de les espècies anuals. L'escarda manual, malgrat ser el mètode més antic, es segueix emprant en molts casos, sobretot en parcel·les petites on la mà d'obra és barata. De totes maneres, aquest pràctica

s'acostuma a usar en el control integrat de les males herbes, en combinació amb herbicides o pràctiques mecàniques.

I.1.2.2.4. Mètodes biològics

El control biològic de les males herbes consisteix en utilitzar la influència de determinats factors biòtics, els enemics naturals (paràsits, predadors o patògens), sobre les plantes i les seves relacions de competència, en benefici dels cultius, intentant reduir les poblacions de les plantes no desitjades a nivells econòmicament acceptables. Qualsevol organisme que freni el desenvolupament o reproducció d'una planta pot ser usat com agent de control biològic. Tot i que els insectes han estat els enemics naturals més àmpliament usats, es poden incloure altres animals, plantes superiors paràsites, fongs, bacteris i virus. La història de la lluita biològica contra les males herbes ha presentat algun èxit espectacular, com el cas de control de *Opuntia inermis*, amb *Cactoblastis cactorum*, usat a Queensland (Australia) als anys 20. A Queensland hi havia milions d'hectàrees productives envaïdes per dues espècies de cactus la *Opuntia inermis* i la *O.stricta*. Al cap de pocs anys de la introducció del *Cactoblastis cactorum* originari d'Argentina, les espècies d'*Opuntia* van ser destruïdes i l'extensa regió infestada va poder ser recuperada com a zona de producció primària [14]. Tot i aquest resultat tant satisfactori, els fracassos deguts al control de les males herbes amb mètodes biològics són molt més abundants.

I.1.2.3. Agricultura industrial

L'agricultura industrial usa d'una manera indiscriminada productes químics per controlar les males herbes sense tenir en compte l'impacte ambiental creat. L'ús de productes per controlar les males herbes data de l'antiguitat, ja que els romans usaven sal, cendres o residus per eliminar-les, tot i que és a finals del segle XIX, quan es descobreixen les solucions de sulfat de coure, que les destrueixen. I ja al segle XX, es comença a fer servir l'àcid sulfúric per controlar-les en conreus de cereals. No obstant, la veritable fita en la història dels compostos químics, va començar amb el descobriment de l'activitat herbicida del 2,4-dicloro-fenil-acètic (2,4-D). Aquesta pràctica es va veure tremendament incrementada després de finals de la malaurada segona Guerra Mundial, quan l'agricultura comença una època de gran desenvolupament, cada cop més productiva,

augmentant l'ús d'adobs, herbicides i creant noves varietats cultivades. Com succeeix en altres països més desenvolupats tecnològicament parlant, l'increment dels productes fitosanitaris, va estretament relacionat amb la disminució de la població agrícola activa, essent a partir dels anys 80, quan l'ús d'herbicides es converteix en una pràctica habitual per tal d'obtenir una bona producció agrícola. A partir del 2,4-D van sorgir una sèrie de fenoxi-derivats com l'àcid 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic, l'àcid 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic (MCPA), l'àcid 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic (mCPP), alguns d'ells ja prohibits, que van donar magnífics resultats.

La presa de decisions relatives al tractament de les males herbes amb herbicides es basa en diferents criteris:

I.1.2.3.1. *Selecció de l'herbicida*

És important seleccionar el tractament més adequat tenint en compte l'eficàcia i la selectivitat dels diferents productes disponibles en el mercat. A Espanya hi ha registrades més de 30 matèries actives diferents per tal de ser usades en el cultiu de cereals i més del doble de productes comercials (amb diverses formulacions i/o combinacions de matèries actives). La selecció del producte a usar vindrà dictada en gran mesura pel moment en el que es vulgui aplicar el tractament. A tall d'exemple a la Taula I.1 es mostren alguns dels herbicides més usats en el cultiu de cereals i el seu moment d'aplicació.

Taula I.1.- Herbicides usats contra les males herbes en cultius de cereals

Moment aplicació	Mala herba	Matèria activa
Pre-emergència	Gramínies	Clorotoluró, isoproturó, trifluralina
	Dicotiledònies	Clorsulfuron, linuron
Post.emergència primerenca	Gramínies	Clorotoluron, diclofop-metil, fenoxaprop-etil
	Dicotiledònies	Bromixinil, clorsulfuron, triasulfuron, metribuzina
Post-emergència tardana	Gramínies	Clodinafop, tralkoxidim
	Dicotiledònies	2,4-D, MCPA, fluroxipir, bentazona

I.1.2.3.2. Cost dels tractaments pre seleccionats

Existeixen grans diferències entre el cost dels diferents productes. Per exemple, mentre el cost d'un tractament amb herbicides hormonal (2,4-D, MCPA, etc.) pel control general de dicotiledònies és gairebé inapreciable, l'ús d'herbicides específics per combatre l'*Avena* o el *Galium* poden suposar una inversió considerable per part de l'agricultor.

És necessari fer una estimació dels beneficis econòmics derivats de l'aplicació del tractament. Això implica estimar els rendiments esperats en el cultiu (i el seu valor de venda) i les pèrdues que s'evitarien a través del tractament. En aquest sentit, mentre que l'aplicació d'herbicides en zones d'alta productivitat (> 4tones/ha) normalment surt econòmicament rentable, en zones més marginals (2 tones/ha) dits beneficis són molt més dubtosos.

I.1.2.3.3. Efectes col·laterals

També és important tenir en compte els possibles efectes col·laterals que es poden donar per l'aplicació dels herbicides. No tan sols els efectes sobre el medi ambient (contaminació recursos hídrics), sinó també l'aparició de resistència a herbicides.

Tot i l'existència de diferents sistemes de tractament sobre la lluita contra les males herbes, cada cop més s'està intentant anar cap a la integració de mètodes eficaços per al control o reducció de la seva població d'una manera econòmicament factible per l'agricultor i segura en la protecció del sistema agrari. Les tècniques de control, inclouen mètodes físics, químics i biològics d'una manera conjunta sense dependència excessiva de qualsevol d'ells.

I.2. PLAGUICIDES I LA PROBLEMÀTICA AMBIENTAL

Des de els seus inicis, l'agricultura s'ha anat orientant cap al mercat urbà amb l'objectiu d'incrementar el rendiment (volum produït per hectàrea) i la productivitat (volum produït per unitat de treball) desconsiderant, més enllà del benefici econòmic immediat, els problemes per l'agricultor, treballadors agrícoles, i la fertilitat de la terra.

Els resultats d'aquestes transformacions han derivat en l'esgotament i contaminació dels recursos naturals (terra, aigua, llavors, animals), a la disminució de llocs de treball en el camp provocant emigracions cap a les ciutats, la necessitat creixent de capital i de terreny per guanyar en competitivitat, al'alteració de l'ecosistema amb la incorporació de noves tecnologies i mètodes industrials, i a l'augment de la dependència en l'ús de solucions tecnològiques d'elevat cost, en mans de les multinacionals productores de llavors, maquinària, fertilitzants i fitosanitaris.

El major problema de la pràctica de l'agricultura industrial prové de que l'únic factor que considera racional és la intensificació de la producció, sense tenir en compte les necessitats i els problemes de l'agricultor envers a l'articulació de l'agricultura amb la indústria i la dependència del mercat en aportar subministres i vendre el que s'ha produït, amb l'únic afany d'obtenir beneficis econòmics. De tal manera que, les solucions als problemes tècnics dels agricultors han de passar necessàriament pel mercat agroquímic. L'alimentació d'una població en constant creixement ha anat portant el perfeccionament de l'agricultura, obligant als professionals del sector a usar tècniques que proporcionin una gran producció. La preparació de la terra per al cultiu es fa sovint amb fertilitzants químics i la protecció de les collites es porta a terme mitjançant l'ús de plaguicides per evitar el desenvolupament de plagues, males herbes, etc.

1.2.1. Contaminació Ambiental i legislació

Les agències de protecció ambiental de molts països no identificaven l'agricultura com una font de contaminació ambiental. Aquest va ser un gran problema en la majoria de països, ja que al aplicar-se en milers d'hectàrees de terra de cultiu en tot el món, van resultar ser contaminants difosos del sòl a l'aigua. L'anàlisi de pesticides en el medi ambient ha estat i continua essent el focus d'atenció de molts estudis, on el nombre d'articles que en descriuen les més avançades metodologies i presenten els resultats de les concentracions trobades tant en aigües naturals, subterrànies, potables i residuals continua en augment [15-27].

En resposta als resultats obtinguts dels diferents estudis que mostren l'amplia contaminació ambiental de les aigües, diferents directives i decisions, amb l'actual **Directiva Marc de l'Aigua 2000/60/CE(DMA)** com a eina legislativa integradora, van ser adoptades per la Comissió Europea. La present DMA preveu sobretot la definició de les aigües europees i les seves característiques, per conques i demarcacions hidrogràfiques, així com l'adopció de plans de gestió i programes de mesura apropiats per a cada massa d'aigua.

La DMA derogarà passats tretze anys de la seva entrada en vigor Directives anteriors relatives a la qualitat de l'aigua tals com:

- **Directiva 76/464/CEE** del Consell, de 4 de Maig de 1976, relativa a la contaminació causada per determinades substàncies perilloses abocades al medi aquàtic de la comunitat.
- **Directiva 78/659/CEE** del Consell, de 18 de Juliol de 1978, relativa a la qualitat de les aigües continentals que requereixen protecció o millora per ser apta per a la vida dels peixos.
- **Directiva 80/68/CEE** del Consell, de 17 de Desembre de 1979, relativa a la protecció de les aigües subterrànies contra la contaminació causada per determinades substàncies perilloses.

L'annex X de la DMA que corresponia a la Decisió 2455/2001/EC, on s'havia establert un llistat de 33 substàncies contaminants prioritàries, de les quals una tercera part d'aquestes eren plaguicides, ha estat recentment modificat per la Directiva 2013/39/UE. A partir de la nova directiva s'ha efectuat una revisió del llistat de les substàncies prioritàries augmentant el llistat de 33 a 45. A més a més es substitueix l'article 16 apartat 4 de la DMA on s'indica que la comissió revisarà la llista adoptada de les substàncies prioritàries als 4 anys de l'entrada en vigor de la nova Directiva i posteriorment cada 6 anys. Prèviament a la DMA, la Directiva 98/83/EC marcava els límits per pesticides en aigua de consum humà que és la que actualment regeix a la UE. Si ens referim a la qualitat de l'aigua subterrània, la legislació aplicada fins l'any 2006 era la mateixa que per les

aigües de consum humà. No obstant, gràcies a l'aprovació de la DMA i la seva transposició als Estats Membres de la UE (desembre 2003), una Directiva de recent aprovació ha estat específicament elaborada per aigües subterrànies, la Directiva 2006/118/EC.

La legislació referent a la prohibició de productes fitosanitaris (plaguicides) d'ús agrícola, és sensiblement més difícil de seguir per la quantitat de modificacions que es van realitzant. Sovint es creen Directives específiques per un sol compost, com pot ser el cas de la prohibició de la atrazina (2004/248/EC). Així les Directives 79/117/CEE i 91/414/CEE regeixen la comercialització i l'ús de plaguicides d'ús agrícola i per tant, la seva legalitat en els Estats Membres de la UE. L'annex I de la Directiva 91/414/CEE llista tots els productes permesos a la UE, però cal tenir en compte que el seu contingut s'ha vist modificat contínuament mitjançant l'aprovació de noves Directives.

I.2.2. Resistència als herbicides

La contaminació ambiental no ha estat la única problemàtica envers el control de les males herbes. Com ja hem comentat anteriorment, durant els darrers 67 anys, des de que es va començar amb la introducció del 2,4-D l'any 1946 [28], les empreses agroquímiques han desenvolupat i han introduït al mercat una ampla gamma d'herbicides selectius. Aquests herbicides primer van revolucionar el control de les males herbes en el món desenvolupat i ràpidament van ser adoptats en països en vies de desenvolupament. L'èxit dels herbicides com el d'altres substàncies químiques de protecció als conreus és degut en gran part al manteniment de la producció dels aliments necessaris per a la població mundial.

No obstant, la natura ha anat reaccionant envers a l'agent extern incorporat al sistema natural, apareixent les males herbes resistents a aquests herbicides. La resistència als herbicides doncs, no és més que un efecte secundari no desitjat que es produeix després d'un ús reiterat d'un determinat herbicida, pel qual una població d'una mala herba deixa de ser controlada amb la mateixa eficàcia per un herbicida que, en condicions normals, en

un cultiu en concret i a una determinada dosis d'ús exercia un control adequat de la mateixa.

A la Figura I.6 hi ha representada la distribució mundial d'espècies resistents. El rànquing l'encapçalen els Estats Units seguit per França i Austràlia. Espanya situat en tercer lloc juntament amb Anglaterra es troba entre els països que presenten entre 21 i 30 espècies resistents.

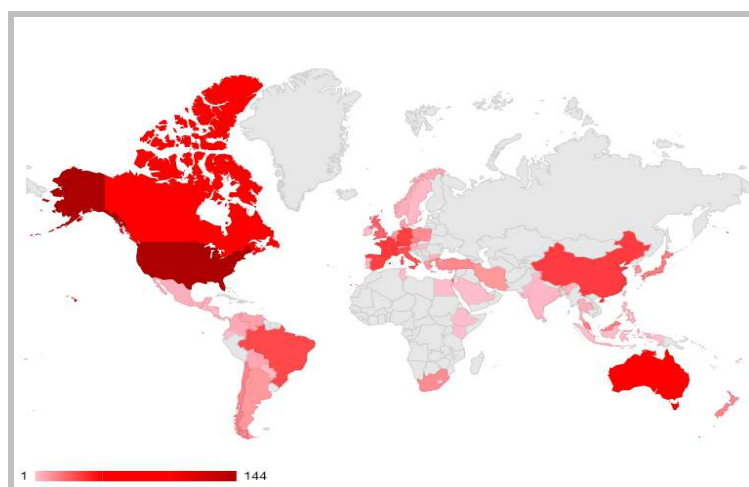


Figura I.6. Distribució mundial de biotips de males herbes resistents [29]

L'aparició de biotips resistents s'ha accentuat en les tres últimes dècades. A partir dels anys 70 es van començar a evidenciar els casos de resistència a triazines, i a partir dels 90 els casos de resistència a inhibidors de sintetasa d'acetolactat (ALS), segons s'observa a la Figura I.7.

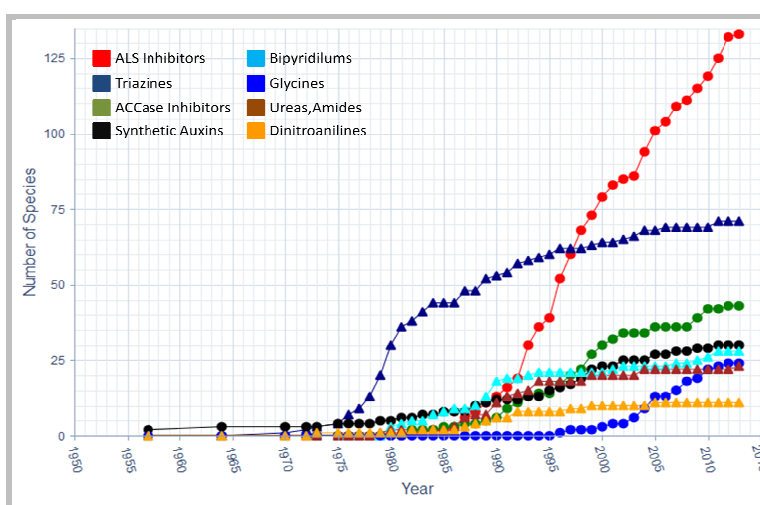


Figura I.7. Evolució de biotips resistents segons el mode d'acció dels herbicides [29]

I.3. AL·LELOPATIA

Degut als problemes descrits en l'apartat anterior provinents de l'ús abusiu de productes químics en els sistemes agrícoles, s'estan intentant trobar alternatives pel control de les males herbes, entre les quals es troba l'al·lelopatia.

Una de les característiques més notables de les plantes terrestres és que, en el seu estadi adult són sedentàries. Tot i que algunes espècies es poden desenvolupar vegetativament en diferents direccions des de el seu enclavament, la majoria es troben sempre en el seu lloc de germinació, fet que causa una influència important en l'ecologia i l'evolució de la població. La germinació, l'establiment de la plàntula, el seu creixement, la seva reproducció i forma de dispersar-se, són afectats de manera notable per les característiques del medi on creixen. Les plantes, com tots els microorganismes, són part de l'ecosistema i necessiten comunicar-se amb el seu entorn, atraure pol·linitzadors, repel·lir herbívors i competir amb les plantes veïnes per l'aigua, els nutrients i la llum. El limitat moviment de les plantes, ha estat compensat evolutivament dotant-les de diferents mecanismes de defensa, tals com els **mecànics** que afecten a la morfologia de la planta, els **fenològics** ajustant el cicle biològic i els **químics** a través de l'alliberament de compostos provocats per l'estrès a la que pot estar sotmesa. Tots aquests mecanismes de defensa, o bé de manera individual, additiva o sinèrgica, li han aportat a les plantes una excel·lent capacitat adaptativa, la qual els permet tenir una elevada prevalença respecte a altres espècies en diferents sistemes ecològics [30-32]. Centrant-nos en els mecanismes químics, la pressió de selecció exercida al llarg del procés evolutiu, ha provocat el desenvolupament en els vegetals de nombroses rutes de biosíntesi, a través de les quals sintetitzen i acumulen en els seus òrgans una gran varietat de metabòlits secundaris biològicament actius. Alguns actuen com a inhibidors de la germinació o afecten al creixement d'altres plantes, en tot cassón responsables de la transmissió de la informació d'una planta amb el seu entorn i inclouen la interacció entre planta-planta, planta-insectes i planta-microorganismes. Depenent del tipus d'interacció o informació a transmetre, molts d'aquests metabòlits són sintetitzats des dels primers estadis de creixement (defensa constitutiva), com en el cas de les interaccions planta-planta de la

mateixa espècie, o pel contrari, aquests poden ser sintetitzats per estímuls externs, com pot ser la presència d'herbívors, que es tradueixen en una alarma metabòlica que disparen o catalitzen les rutes bio-sintètiques (defensa induïda) [33]. Aquestes substàncies es coneixen com a compostos al·leloquímics i la seva possible acció inhibidora en el qual estan involucrats, es denomina amb el nom d' al·lelopatia [34].

I.3.1. Definició de l'al·lelopatia

La definició de l'al·lelopatia no ha estat un terme estàtic i s'ha anat aplicant de maneres lleugerament diferents al llarg del temps.

Al 1937, Molisch [35] va apuntar el terme al·lelopatia per referir-se a les interaccions bioquímiques entre tots els tipus de plantes incloent els microorganismes. En la seva discussió indicava que el significat del terme englobava tant les interaccions que tenien efectes inhibidors com estimuladors.

Al 1974, Rice [36] va desviar l'ús del terme per Molisch i va definir l'al·lelopatia com a qualsevol efecte directe o indirecte maligne d'una planta cap a una altra a través de la producció de compostos químics que s'alliberaven al medi ambient.

Actualment el terme al·lelopatia ha estat definit per la Societat Internacional d'al·lelopatia com a *"qualsevol procés on estan involucrats metabòlits secundaris (al·leloquímics) produïts per plantes, microorganismes, virus i fongs que influeixen en el creixement i desenvolupament dels sistemes agrícoles i biològics (excloent els animals), incloent els efectes positius i negatius"* [37].

I.3.2. Antecedents històrics de l'al·lelopatia

Les primeres observacions i anotacions sobre el fenomen de l'al·lelopatia es remunten des del temps dels grecs i romans. El grec Theophrastus (Segle III a.c.) va deixar anotat en

el seu llibre “Enquiry into plants” [38] que el cigró deixava exhaust el sòl on era cultivat a diferència d’altres llegums. Plinius Secundus (Segle I a.c.) en el seu llibre d’història natural va redactar tota una sèrie d’exemples d’interaccions al·lelopàtiques i amb la seva lògica es va avançar als ecòlegs i químics moderns al imputar la toxicitat de les plantes als seus llixiviats. Aquest fet va ser contrastat a través d’una sèrie d’experiments per Lee i Monsi al segle XX [39]. Al 1832, De Candolle va suggerir que la “malaltia dels sòls agrícoles” podria ser deguda a secrecions de les plantes i va proposar que la rotació de cultius podria ajudar a alleugerir el problema. Al 1881, Stickney i Hoy [40] van observar que la vegetació sota la noguera negra era poc densa i van assenyalar que els cultius no creixen sota o a prop de la mateixa. No obstant, van deixar anotat que la principal raó perquè no creixia la vegetació sota aquest arbre era pel caràcter verinós del seu degoteig.

No va ser però, fins després del 1900, on es comencen a trobar fets contrastats experimentalment. Massey et al.[41] al 1925, va observar que les plantacions de tomàquet i alfals es trobaven a un radi de 25 metres del tronc de la noguera, és a dir que les plantes situades fins a 16 metres morien, mentre que les situades més enllà del mateix creixien sanes.

Posteriorment, es va provar que la juglona, una hidroxinaftoquinona soluble en aigua, causant del color que tenyeix les mans de qui manipula nous, provocava aquesta fitotoxicitat. En totes les parts verdes de la planta (fulles, fruits i branques), es troba el 4-glucòsid del 4,5-trihidroxinaftalè, producte no tòxic que després de ser arrossegat al terra per les pluges, és hidrolitzat i oxidat a la juglona.

I.3.3. Compostos al·lelopàtics

L’extraordinària diversitat del metabolisme vegetal és l’origen de desenes de milers d’estructures químiques que poden agrupar-se en tres grups: compostos fenòlics, terpens i alcaloides. Totes elles procedeixen majoritàriament de les rutes metabòliques del **siquimat** (fenols simples, el àcid benzoic i derivats, el àcid cinàmic i derivats, cumarines,

sulfurs, glicòsids, alcaloides, alguns derivats de quinones i tanins) i del **acetat-mevalonat** (terpens, esteroides, àcids orgànics solubles en aigua, alcohols de cadena lineal, aldehids alifàtics, cetones, àcids grassos insaturats simples, àcids grassos de cadena llarga, acetilens, naftoquinones, antraquinones, quinones complexes i floroglucinol) (Figura I.8), de manera que existeixen llaços molt estrets entre les grans funcions fisiològiques de les plantes (fotosíntesi i respiració) i la producció de metabòlits secundaris potencialment al·lelopàtics. La quantitat de metabòlits secundaris en els vegetals és extremadament variable i està controlada per factors tant genètics com mediambientals. D'aquesta manera, es pensa que la seva aparició i/o acumulació coincideix freqüentment amb una fase de desenvolupament de la planta i està fortament regulada per les condicions ambientals en les quals es troba [42, 43].

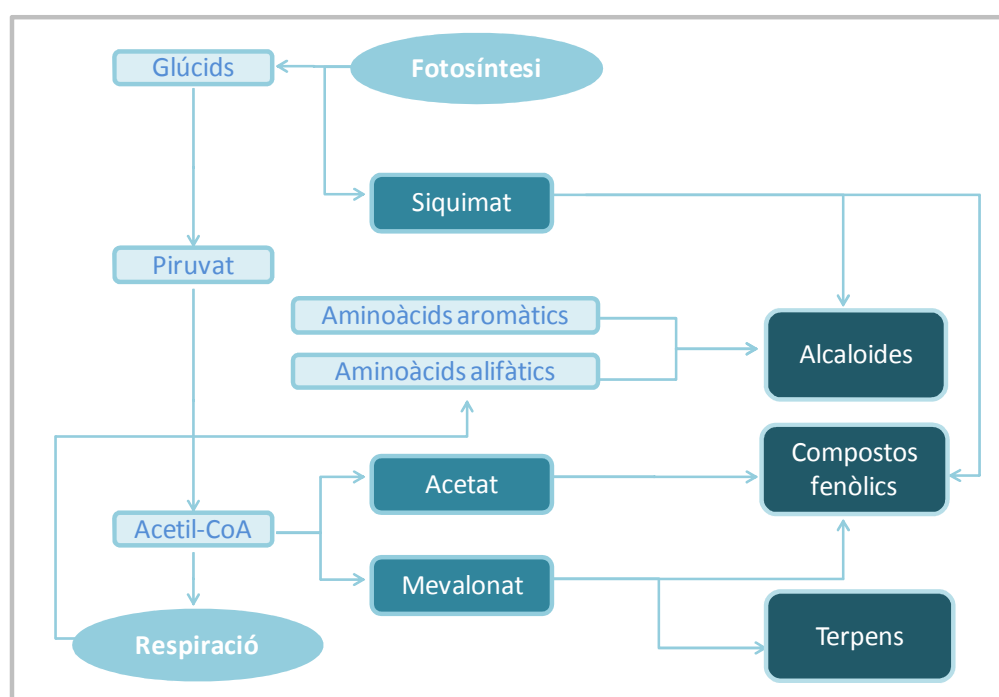


Figura I.8.- Vies de síntesi dels metabòlits secundaris i les seves relacions amb el metabolisme primari (Adaptació de [42]).

Donat que la naturalesa química dels compostos al·lelopàtics és molt variada, a mesura que es progressa en la investigació d'aquest fenomen es van incorporant nous grups de substàncies a les quals no se'ls havia atribuït cap activitat biològica entre els quals hi ha:

Terpens: les plantes superiors produeixen una gran varietat de compostos terpènics, però només alguns d'ells estan involucrats en l'al·lelopatia. Els monoterpens presents en els olis essencials dels vegetals són notables agents al·lelopàtics, inhibidors del creixement de plantes superiors i males herbes, essent en aquest grup on es troben la major quantitat d'inhibidors del creixement i germinació [44]. Entre els més estudiats estan α i β piré, alcanfor i 1,8-cineol, generats per la *Salvia* spp., *Amaranthus*, *Eucaliptus*, *Artemisia* i *Pinus*.

Glicòsids cianogènics: el fenòmen al·lelopàtic d'aquests compostos ve donada per la seva hidròlisi en el sòl donant lloc no tan sols a l'àcid cianhídric, sinó també a l'hidroxi-benzaldehyd que l'oxidar-se origina l'àcid p-hidroxi-benzoic, el qual poseeix activitat al·lelopàtica per si mateix.

Compostos fenòlics: són compostos aromàtics que contenen un grup hidroxil conjugat amb l'anell aromàtic. Són sintetitzats en les vies de síntesi del siquimat o acetat-mevalonat. La majoria d'aquests compostos són polifenols, és a dir que contenen més d'un grup hidroxil.

Compostos aromàtics: aquests comprenen la gamma més extensa d'agents al·lelopàtics. Inclou des de fenols, derivats de l'àcid benzòic i cinàmic, quinines, cumarines, flavonoides i tanins. Els derivats de l'àcid cinàmic, tenen una elevada persistència en el sòl i per tant presenten elevats efectes tòxics i molts d'ells han estat identificats com a inhibidors de la germinació. Els flavonoides són ampliament coneguts pel seu potencial al·lelopàtic i alguns d'ells resulten ser forts inhibidors de bacteris nitrificants i de la germinació de llavors. Els tanins, tant els hidrolitzables [45] com els condensats, tenen efectes inhibidors gràcies a la seva capacitat per unir-se a proteïnes. Els condensats els quals s'originen de la polimerització oxidativa de les catequines, inhibeixen els bacteris nitrificants en sòls forestals i redueixen el ritme de la descomposició de la matèria orgànica el qual és important pel cicle de circulació dels minerals en el sòl [44, 46, 47].

Àcids hidroxàmics i derivats: aquests compostos han estat identificats en varis cultius de cereals per la seva capacitat al·lelopàtica envers les males herbes i plagues. Són els compostos objecte de la present tesi i seran tractats amb més detall a l'apartat I.4.1.

A la Taula I.2 s'enumeren diferents compostos amb propietats al·lelopàtiques, els grups als quals pertanyen així com la planta on han estat trobats.

Taula I.2.- Compostos amb propietats al·lelopàtiques en espècies de plantes.

Grup	Compostos	Planta
Terpens	Alcanfor, α i β pinè, 1,8-cineol, di-pentè	<i>Salvia spp, Amaranthus, Eucalyptus, Artemisia, Pinus</i>
Glicòsids cianogènics	Durrina, amigdalina, prunasina	<i>Sorghum_spp, Prunus_amygdalus</i>
Àcid benzoic i derivats (compostos fenòlics)	Hidroxibenzoic, Vainillic	<i>Cucumis sativus, Avena, Sorghum vulgare</i>
Àcid cinàmic i derivats (compostos fenòlics)	Cinàmic, clorogènic, cafeic, p-cumàric, ferúlic	<i>Cucumis sativus, Helianthus annuus, Parthenium argentatum</i>
Quinones i derivats	Juglona, hidroxinaftoquinona	<i>Juglans</i>
Cumarines	Metilesculina, escopolina, escopoletina, furanocumarina	<i>Ruta, Avena, Imperata, Sorghum, Oryza, Triticum aestivum</i>
Flavonoides	Floridzina, quercetina, mircetina	<i>Malus</i>
Tanins	Ac. Gàl·lic, el·làgic, trigal·lic, tetragal·lic	Sòls forestals
Àcids hidroxàmics	2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one	<i>Secale cereale</i>

I.3.4. Vies d'alliberament dels compostos al·lelopàtics

Encara que hi ha una evidència creixent sobre el fenomen de l'al·lelopatia, la seva existència encara no està acceptada per tots els científics. Això és degut a l'ampli ventall de compostos al·leloquímics i a la seva varietat d'estructures que dificulten conèixer la majoria dels seus mecanismes de producció, alliberament i destí [48].

Tots els òrgans vegetals contenen quantitats variables de substàncies potencialment al·lelopàtiques que poden ésser alliberades al medi ambient per mitjà de l'exsudació de les arrels, lixiviació, volatilització i descomposició dels residus de les plantes en el sòl. La

Figura I.9 mostra els possibles camins actius i passius pels quals els compostos podrien ser alliberats des de la planta [49].

Es consideren exsudats radiculars totes aquelles substàncies orgàniques, solubles o insolubles alliberades al sòl per les arrels. Presenten un interès particular perquè es tracta d'una via d'alliberament directa de toxines que poden influir sobre la composició de la població microbiana [50]. Factors tals com l'edat de la planta, la nutrició, la llum i la humitat influencien tan qualitativa com quantitativament en l'alliberament dels agents al·lelopàtics per les arrels.

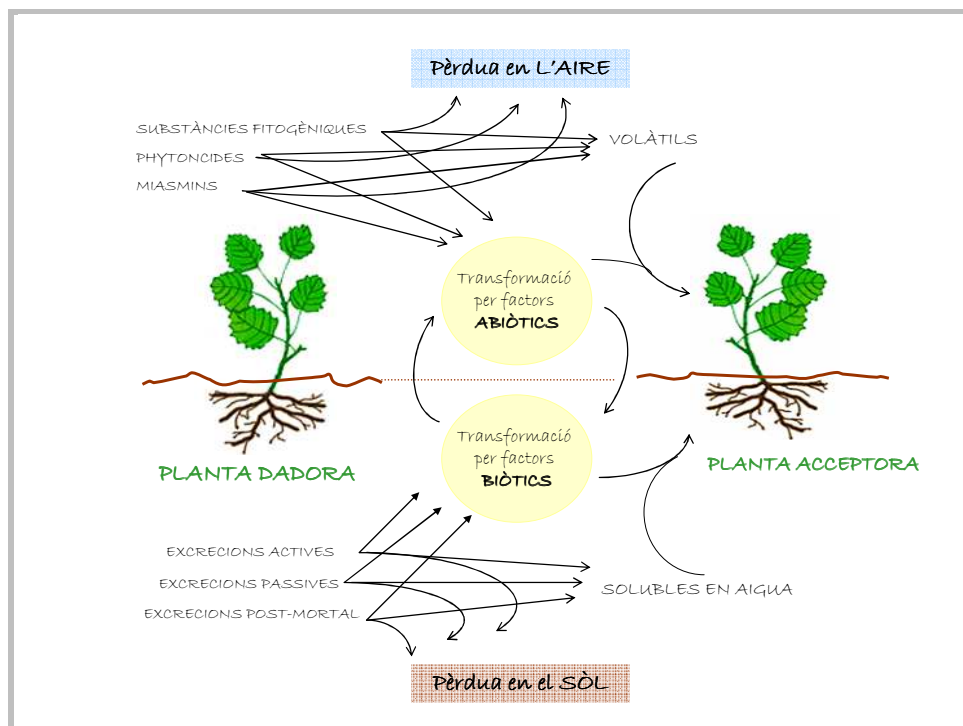


Figura I.9.- Possibles mecanismes d'alliberament d'al·leloquímics de planta a planta (Adaptació de [49]).

La lixiviació ve donada per la dissolució i el transport dels compostos al·lelopàtics per efecte de la pluja, la neu, la rosada o la boira. El grau de lixiviació d'un compost al·lelopàtic dependrà del tipus de teixit de la planta, de la seva edat i de la quantitat i naturalesa de la precipitació [51].

Donat que els compostos al·lelopàtics estan presents en tots els teixits de la planta, la descomposició dels residus vegetals dóna lloc a la seva alliberació en el sòl. Els factors que influeixen en aquest procés inclouen la naturalesa del residu, el tipus de sòl i les condicions de descomposició. En funció de les propietats físiques, químiques i biològiques del sòl on són alliberats els compostos al·lelopàtics, aquest no es comporta com un medi neutre sinó que influeix d'una manera decisiva en l'evolució de l'activitat al·lelopàtica d'aquest compostos [52, 53].

Tant la producció com l'alliberament dels compostos al·leloquímics, el transport, la transformació en el sòl i l'acceptació per part de la planta receptora, depenen de les condicions mediambientals [54]. Sovint no és fàcil saber si els compostos actius són els compostos primaris de la planta o bé són els transformats per microorganismes.

I.3.5. Mètodes d'estudi per provar l'efecte al·lelopàtic

Els majors avenços sobre l'al·lelopatia s'han centrat més en l'aplicació que en l'essència del fenomen, de tal manera que la majoria dels treballs trobats en bibliografia estan dirigits a l'aïllament, l'elucidació estructural i la determinació d'alguna propietat o activitat biològica dels metabòlits secundaris. L'estudi de l'essència del fenomen de l'al·lelopatia resulta ser més complex i des de un punt de vista ecològic, la principal limitació radica en ser capaços de diferenciar l'efecte al·lelopàtic d'altres processos ecològics que s'hi poden donar lloc [55].

Per tal d'intentar abordar l'estudi de la dinàmica de les defenses químiques, en primer lloc s'ha de dur a terme l'observació del fenomen en el seu habitat natural i en segon, degut a la gran varietat i complexitat de variables [56-58], portar a nivell de laboratori l'estudi de l'efecte prèviament observat per tal d'avaluar separatament la interacció dels diferents fenòmens que poden operar en la interacció de les plantes amb el seu entorn [40, 59-64]. Dos d'aquests fenòmens són la competència i l'al·lelopatia entre plantes. La competència entre espècies s'origina per la reacció d'un dels seus components sobre l'hàbitat, reduint el nivell d'algun factor (energia solar, oxigen, diòxid de carboni,

nutrients, aigua, depredadors, etc.) necessari per al normal desenvolupament de l'altre component [65], mentre que l'al·lelopatia no altera cap d'aquest factors, sinó que afegeix a l'hàbitat un nou factor de naturalesa bioquímica. Cal destacar que l'al·lelopatia no fa disminuir el potencial d'un altre fenomen ecològic, i en la majoria dels casos pot actuar sinèrgicament amb algun d'ells, fet que pot implicar, en conjunt, un augment de l'efecte observat envers els que es pot observar per separat.

Tot i que ha estat possible estudiar separatament aquests dos fenòmens, la determinació de la importància relativa dels mateixos és complicada, degut principalment a les dificultats experimentals trobades al separar els seus efectes [66, 67]. Des d'un punt de vista ecològic, existeix una necessitat imperiosa de definir amb major precisió els mecanismes del dos fenòmens [68-70], essent escassos els treballs en els quals s'ha aconseguit donar un pes específic a qualsevol d'ells [71], entre els quals s'ha demostrat que els compostos exsudats de l'arrel són majoritàriament els responsables de l'efecte al·lelopàtic [72].

No obstant, tot i aquestes dificultats, s'han desenvolupat algunes metodologies on s'ha posat de manifest el caràcter multidisciplinar de l'al·lelopatia evidenciant la dificultat de la seva anàlisi [67, 73, 74]. Amb l'estudi de Bais et al. [75] es van mostrar indicis del caràcter multidisciplinari del fenomen al·lelopàtic, on convergeixen diferents branques d'estudi, com l'ecologia, la fisiologia, la bioquímica i estudis citològics, en la investigació del desplaçament d'una espècie nativa per una invasora exòtica, atribuint l'acció del (\pm)-catequin (al·leloquímic), el qual va ser dosificat a les espècies receptores a les mateixes concentracions trobades en estudis de camp. A més a més van caracteritzar el mecanisme pel qual aquest compost afectava la planta nativa, on el mode d'acció transcorria amb la producció d'oxigen actiu a l'arrel, el qual activava una cascada de senyals, mesurada amb la producció de Ca(II), on s'iniciaven canvis importants en l'expressió genètica, provocant finalment la mort del sistema radicular.

Amb treballs d'aquest tipus es demostra la interferència d'un compost sobre la comunitat de varies espècies de plantes implicant la determinació de diferents estadis d'estudi que

van des de la identificació de l'agent al·lelopàtic, fins la seva interacció, no tan sols amb la planta receptora, sinó inclús la seva interacció amb substàncies presents en el medi.

En general, els treballs referits al fenomen al·lelopàtic, estan centrats en l'estudi de la dinàmica de la seva biosíntesis i acumulació del potencial al·leloquímic en les plantes [76-82], estudis de la alliberació mitjançant els exsudats de l'arrel [83, 84], dels efectes de la descomposició del seu teixit vegetal [85], estabilitat química del compost una vegada traspassat a l'ambient [86-88] i la mesura de la seva activitat biològica [89-91].

Tot i que aquests dissenys han estat avaluats separatament de la resta de possibles fenòmens que puguin donar-se en el sistema, i constitueixen estudis sobre un sistema ideal, si es compara amb el que pot donar-se lloc a la natura, en conjunt, els seus resultats ens donen una valuosa informació i han contribuït a entendre i ampliar les variables que intervenen en l'estudi del fenomen al·lelopàtic.

Recentment, s'han desenvolupat bioassaigs per avaluar el potencial al·lelopàtic i determinar els nivells de compostos exsudats de forma simultània, on la planta amb potencial al·lelopàtic (planta donadora) es manté en un co-cultiu amb una altra espècie (planta receptora) [92, 93]. Tot i que aquest assaig s'aproxima més a la realitat, s'han de considerar diferents variables, com són les característiques de l'espècie donadora (velocitat de creixement, nivells d'al·leloquímics alliberats a través de l'exsudació de l'arrel, densitat de plantes, etc).

Per exemple, s'ha demostrat que en el cas de les benzoxazolinones, la major quantitat de compostos són alliberats a través de l'exsudació per les arrels durant els primers estadis de creixement de la planta donadora [93], per tant, temps de pregerminació molt perllongats implicarien una menor concentració dels al·leloquímics en el co-cultiu, quedant una quantitat significativa de compostos en el medi emprat per a la germinació. Així, per aquesta tipologia de compostos, és convenient que el temps de pre-germinació sigui suficient per assegurar un nombre determinat de plantes viables, però que no representi una pèrdua important dels compostos exsudats. No obstant, pel cas de la planta receptora, el temps de pre-germinació estarà determinat pel nivell d'inhibició del

creixement provocat pel compost al·leloquímic (sensibilitat). El compromís en el temps de pre-germinació dependrà de la dinàmica de l'alliberament del compost per part de la planta donadora i els nivells de fitotoxicitat en front la planta receptora, de tal manera que permetin aconseguir una màxima sensibilitat en el bioassaig. El desfàs entre el temps de creixement d'ambdues plantes, abans de la seva interacció (co-cultiu) és un paràmetre important a tenir en compte, a banda de la densitat de les plantes i el temps d'assaig, doncs és el que permetrà poder determinar el compost al·leloquímic en la planta receptora. Si s'aconsegueixen controlar aquestes variables, es podran ajustar les corbes de dosi-resposta i així poder calcular paràmetres tals com la densitat de la planta que causa un 50% de reducció del paràmetre de creixement (ED_{50}) avaluat respecte una població control [92]. La ED_{50} permetrà determinar quina espècie donadora presenta una major activitat al·lelopàtica segons el paràmetre avaluat (pes i/o longitud de la planta o de l'arrel).

Per una altra banda, si l'objectiu de l'estudi és fer un seguiment del compost al·leloquímic des de la seva biosíntesi en la planta donadora fins la seva absorció per la receptora, aquestes variables no s'ajustaran a una funció de dosi-resposta sinó a aquelles condicions que permetin la detecció del compost d'interès. Com a conseqüència, els paràmetres i/o variables del disseny es compliquen, doncs els mètode d'anàlisi d'aquest compost serà una variable més a considerar, on les característiques instrumentals, com els límits de detecció i quantificació [94, 95], són les que governaran les variables biològiques en el disseny del bioassaig .

Tot i que en un disseny de co-cultiu moltes de les variables poden ser controlades de tal manera que només operi el fenomen al·lelopàtic, i la resta com la competència per nutrients, la llum, o l'efecte d'altres paràmetres com el pH, siguin anul·lades, l'estudi esdevé igualment extremadament complicat, però tot i així representa un dels que millor reflecteix la condició natural del fenomen estudiat.

El repte que avui en dia es presenta per tal de mostrar l'evidència del fenomen al·lelopàtic, és estudiar aquest sistema amb l'objectiu de seguir el compost al·leloquímic des de l'espècie donadora fins la receptora, d'una manera dinàmica, és a dir durant tot el

temps en que es troben enfrontades. Això demostraria la translocació d'un al·leloquímic sintetitzat per una espècie, alliberat al medi i detectat en els teixits de l'espècie receptora, on a més a més s'enregistrarien els efectes anormals del seu creixement.

I.3.6. El fenomen de l'al·lelopatia i la troballa d'herbicides

Durant molts anys, els estudis de l'al·lelopatia han estat liderats principalment per botànics, dirigint els seus estudis en:

- Estudiar l'ús dels residus de collites com a cobertures.
- La rotació de cultius.
- Estudiar l'efecte dels extractes de plantes amb propietats al·lelopàtiques en el rendiment de collites.

Recentment, degut a la millora i refinament de les tècniques en l'aïllament i caracterització de compostos químics, els treballs d'investigació s'han dirigit a la determinació de la naturalesa estructural dels compostos naturals que realment són responsables dels efectes fitotòxics observats. Així doncs, avui en dia l'al·lelopatia serveix com a eina per identificar espècies de plantes que poden presentar efectes fitotòxics, i que per tant contindran espècies químiques que mostrin una activitat sobre espècies de males herbes.

Els productes que eliminen la competència d'altres espècies, o inclús que estimulen la germinació o creixement d'altres, han despertat cert interès, principalment en la possible aplicació dels mateixos en l'agricultura degut a la seva activitat herbicida [96-98]. És més que una idea temptadora que les plantes de cultiu puguin proporcionar els seus propis herbicides.

Mentre que productes naturals biològicament actius han estat una font de molècules per al desenvolupament de productes farmacèutics, insecticides o fungicides, relativament pocs agents herbicides s'han derivat de productes naturals. L'obtenció d'herbicides basats

en fonts naturals son atractius per diverses raons: són solubles en aigua, i com a resultat, és possible que siguin més actius a baixes concentracions, reduint la seva presència en l'ambient. No obstant, la indústria agroquímica no ha potenciat en excés l'ús d'herbicides provinents de fonts naturals, donat que s'han de tenir en compte diferents factors per tal d'arribar a explotar un compost al·loquímic com a agent de control de les males herbes:

- La quantitat de substància activa aïllada, que generalment és limitada per tal de dur a terme tots els bioassaigs.
- El fet que el producte sigui natural no garanteix que sigui innoeu al medi ambient i per tant són necessàries proves de toxicitat i ambientals.
- Originar compostos derivats a partir del natural, a través de la manipulació de l'estructura molecular o síntesi química. Una de les característiques en general dels productes naturals és la seva complexitat estructural, que limita l'obtenció de series que permetin realitzar estudis de relació estructura activitat (SAR) i relació quantitativa estructura activitat(QSAR).
- Una vegada el compost actiu ha estat identificat, o bé el seu anàleg modificat, és necessari l'extracció en grans quantitats del compost de la seva font natural, o en el seu defecte, una ruta sintètica relativament senzilla i rentable.
- Darrerament el desenvolupament d'herbicides a partir de fonts naturals s'ha vist molt limitat degut a que s'ha de patentar el compost o la molècula. La patent es pot fer tant sobre el compost natural com sintètic, fet que limita de manera decisiva els estudis de l'activitat biològica.

Ala Figura I.10 es mostra un esquema dels diferents nivells d'estudi involucrats en la troballa d'herbicides naturals.

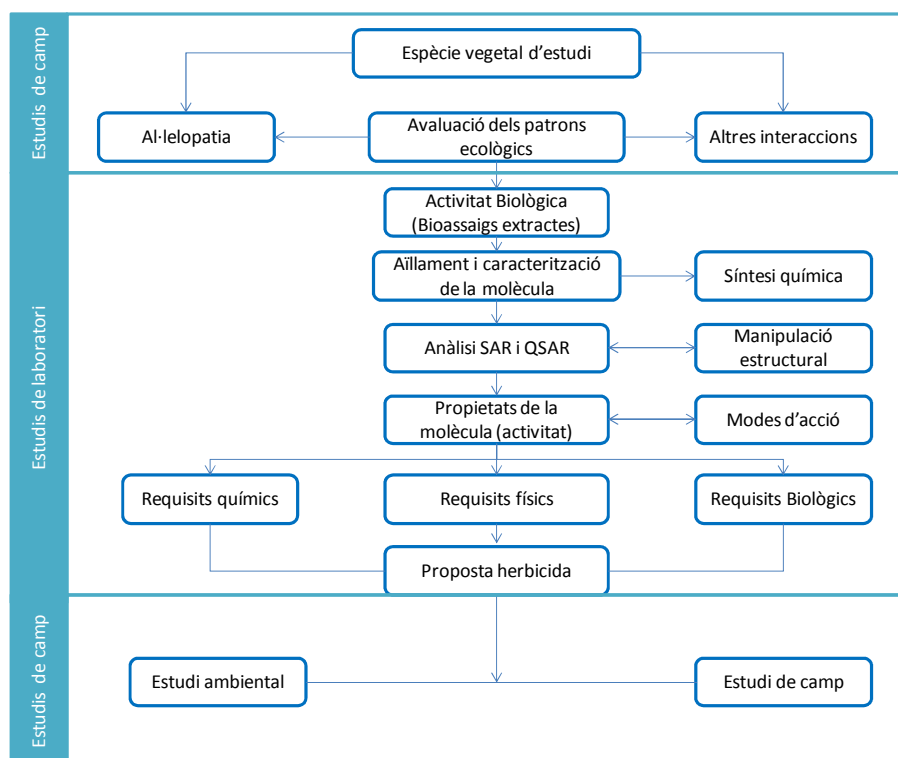


Figura 1.10.- Nivells d'estudi en la troballa de nous herbicides a partir de plantes.

Actualment, els compostos amb activitat al·lelopàtica es consideren com una font d'estructures base, a partir de les quals, a través de modificacions sintètiques, donaran origen a potencials herbicides. Diferents productes han estat proposats com a molècules base per al desenvolupament d'herbicides, de entre els quals es troben els terpens [99], cumarines [100], benzoquinones [101] i alcaloides [90].

A partir de les modificacions estructurals sintètiques, s'originen una sèries de derivats modificats, donant lloc a una llibreria de compostos. L'avaluació de l'activitat fitotòxica sobre diferents espècies permeten dur a terme les relacions SAR-QSAR [102-105], de les quals es determinen les característiques estructurals que ha de tenir el compost per a dur a terme l'activitat.

El següent pas serà el de manipular sintèticament la molècula amb l'objectiu d'atenuar els trets estructurals i físics per tal de millorar l'activitat d'interès, que en el cas dels herbicides, és la seva activitat fitotòxica. Amb aquests estudis s'han aconseguit proposar

diferents molècules amb propietats herbicides, l'origen de les quals ha estat l'aïllament d'estructures mare a partir de fonts naturals.

Tot i que aquests factors dificulten la cerca de compostos amb propietat herbicides existeixen casos on molècules d'origen natural s'han explotat com herbicides naturals. Dins la indústria dels herbicides, els productes naturals amb activitat herbicida provenen bàsicament de fonts microbianes [96]. Centenars de compostos han estat patentats, però només dos, bialaphos i fosfinitricin han estat comercialitzats amb èxit. El Glufosinat (Basta[®], Liberty[®]), que es sintetitza a partir del fosfinitricin, actua directament sobre les plantes, mentre que el bialaphos és metabolitzat per la planta a fosfinitricin. Tot i que hi ha menys interès en els productes naturals provinents de plantes, alguns d'ells presenten elevada fitotoxicitat. Alguns exemples inclouen cinmethylin (Cinch[®]).

També existeix la possibilitat de modificar genèticament els cultius per tal de millorar i potenciar la seva capacitat al·lelopàtica. Alguns autors han recomanat dur a terme una regulació de la biosíntesi i la taxa d'alliberament d' al·leloquímics al medi [106, 107] i d'altres fer ús de la biotecnologia de transferència de trets al·lelopàtics entre cultius de la mateixa espècie o entre espècies diferents [40, 108, 109]. No obstant, tot i que l'ús de la manipulació genètica pot semblar prometedora, podria ser més factible seleccionar cultius amb millors propietats al·lelopàtiques usant mètodes de millora convencional ja que existeix una estricta regulació sobre els cultius transgènics, i a més a més és un tema d'elevada preocupació pública.

1.3.7. Avaluació de l'ús de compostos al·lelopàtics en el control de males herbes

Atès que el rendiment en la producció agrícola es veu afectat per organismes nocius, incloses les males herbes, i que és absolutament essencial protegir les plantes contra aquests riscos i ajudar a garantir la seguretat dels proveïments alimentaris, l'ús de productes al·leloquímics podria arribar a ser un dels camins més importants en la protecció de les plantes i millora en la producció agrícola.

Els productes fitosanitaris tot i provenir de fonts naturals d'una planta, no només poden tenir efectes beneficiosos en la producció vegetal, sinó que el seu ús pot comportar riscos i perills per als éssers humans, animals i el medi ambient. De tal manera que es fa necessària una regulació en la seva autorització com a possibles nous productes fitosanitaris. Aquestes normes han de garantir que els productes fitosanitaris siguin utilitzats adequadament tenint en compte els principis de les bones pràctiques fitosanitàries i de control integrat de plagues, així com també han de garantir un alt nivell de protecció, i s'han d'avaluar els riscos per a la salut, l'aigua subterrània, el medi ambient, la salut humana i animal i han de tenir prioritat sobre l'objectiu de millora en la producció vegetal.

Així doncs, quan es vols considerar un nou producte químic d'ús agrícola, és necessari dur a terme una sèrie de test d'anàlisi per tal de provar-ne la seva nocivitat. Aquests són els objectius que persegueixen les següents directives:

- Directiva 67/548/EEC. En l'annex V d'aquesta directiva, s'estipulen les anàlisis estàndards per tal de verificar l'efecte nociu que tenen els nous productes sobre organismes estàndards presents en el sòl agrícola.
- Directiva EU 91/414/EEC. Que marca les pautes a seguir per tal d'obtenir l'autorització d'ús d'un nou producte químic com a protector de plantes agrícoles.

I.4. AL·LELOPATIA EN CEREALS

I.4.1. Compostos al·lelopàtics en els cereals

Dins la gran diversitat de molècules procedents del metabolisme secundari de les plantes, els principals compostos amb propietats al·leloquímiques en les gramínies pertanyen a la família de les benzoxazinones. Es troben per exemple en el blat (*Triticum aestivum*), blat de moro (*Zea mays*) o centè (*Secale cereale*).

Les estructures de totes les benzoxazinones es caracteritzen per tenir un hemiacetal cíclic en combinació amb un àcid hidroxàmic cíclic o una lactama cíclica [110] (Figura I.11). Dins les benzoxazinones podem distingir entre: els àcids hidroxàmics, les lactames, els metil derivats i les benzoxazolinones.

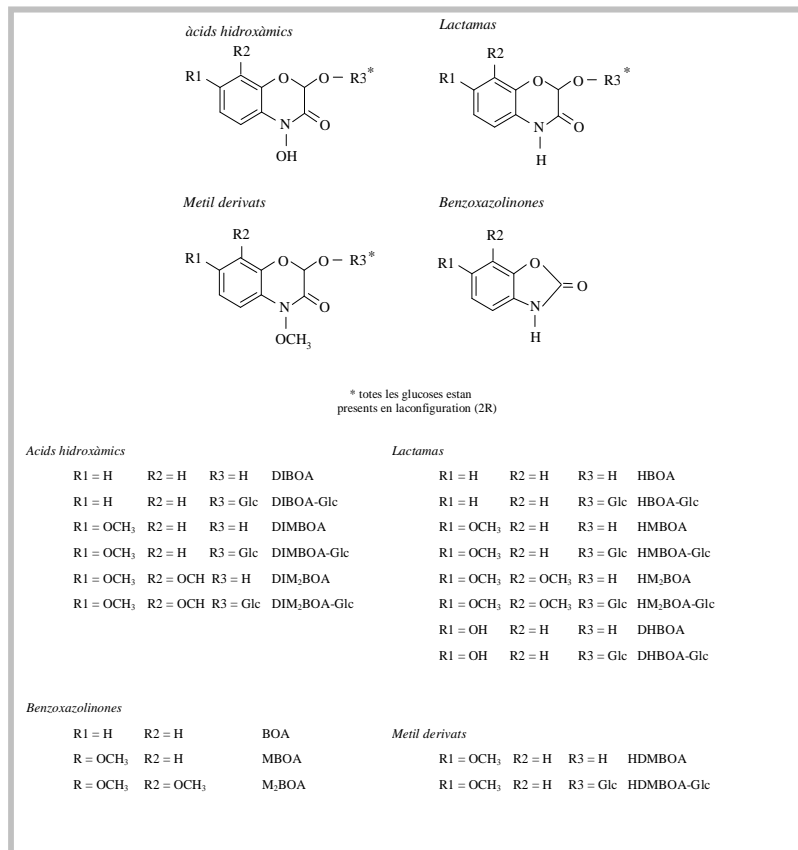


Figura I.11.- Estructures de les diferents benzoxazinones.

La primera referència a aquests compostos es deu a Virtanen et al. [111], que van aïllar la benzoxazolin-2-one (BOA) del sègol (*Secale cereale* L.). El metoxi derivat 6-methoxybenzoxazolin-2-one (MBOA) va ser aïllat del blat (*Triticum aestivum*) i el blat de moro (*Zea Mays* L.) [112, 113]. Posteriorment es van identificar i proposar les estructures dels precursors del BOA [114] i MBOA [115] que existeixen predominantment en la planta en la seva forma glucosada.

La biosíntesi dels àcids hidroxàmics es bifurca del metabolisme primari del indol-3-glicerol fosfat, un precursor immediat en la biosíntesis del triptòfan [116][117-119]. En una primera etapa l'indol-3-glicerol fosfat és transformat a indol. Posteriorment, a través de successives oxidacions que tenen lloc en el reticle endoplasmàtic s'obté l'àcid hidroxàmic 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA). La glucosiltransferasa serà l'encarregada de produir el 2-β-D-glucopyranosyloxy-4-hidroxy-1,4-benzoxazin-3-one (Diboa-Glc). La biosíntesi del derivat metoxilat 2-β-D-glucopyranosyloxy-4-hidroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (Dimboa-Glc) involucra l'oxidació del Diboa-Glc seguit d'una metilació (Figura I.12). Cadascun dels enzims involucrats en la biosíntesi dels àcids hidroxàmics està associat a un gen (Bxn), el qual depèn de la planta del que ha estat aïllat, el qual es denomina ZmBxn en el blat de moro, TaBxn en el blat, i ScBxn en el sègol.

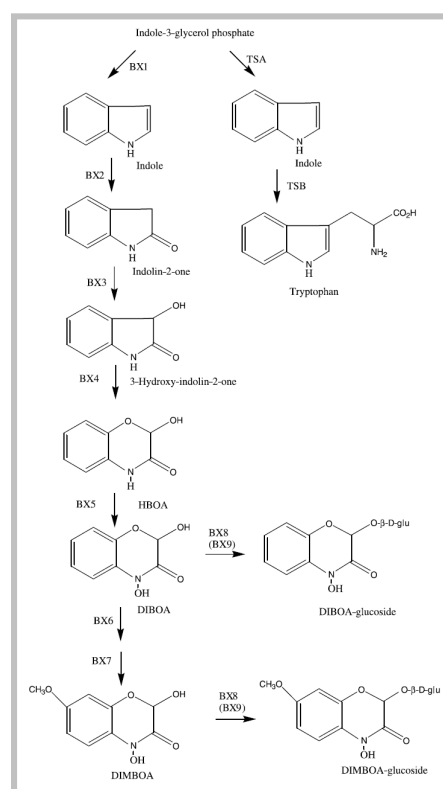


Figura I.12.- Biosíntesi dels àcids hidroxàmics

Els àcids hidroxàmics s'acumulen a la planta en forma de glucòsids. Aquests, són biològicament inactius, però enzimàticament transformats a les actives aglucones per

l'acció de la β -glucosidasa quan el teixit vegetal es veu danyat [114, 115, 120-122]. Les aglucones 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) i DIBOA són espontàniament degradades a les corresponents benzoxazolinones MBOA i BOA [114, 115, 120] (Figura I.13).

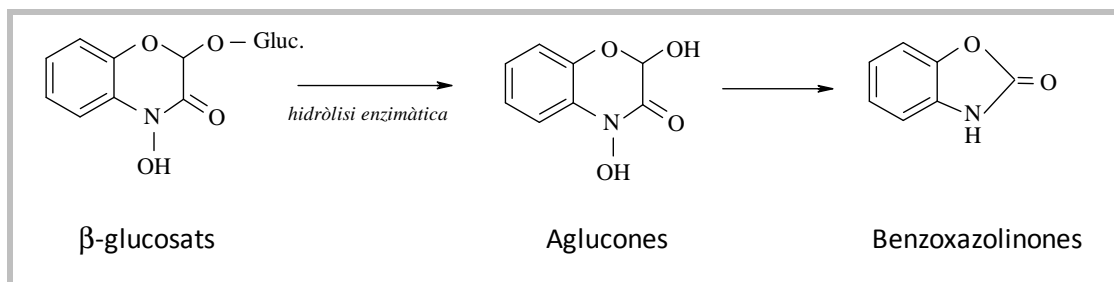


Figura I.13.- Formació de benzoxazolinones a partir dels compostos β -glucosats

I.4.2. Productes de degradació en el sòl

Fins fa relativament poc temps, l'evidència de la secreció dels àcids hidroxàmics des de les plantes vives al sòl només havia estat descrita en el sègol [123]. Posteriorment Wu et al. [124, 125] van descriure que algunes varietats de blat també eren capaces d'exsudar compostos al·lelopàtics.

Els primers estudis de la transformació de les benzoxazolinones en el sòl van ser duts a terme per Nair et al. [126] i Chase et al. [127, 128]. En un estudi dut a terme addicionant BOA i MBOA en un sòl es van obtenir uns compostos amb pigmentació vermella caracteritzant el major producte de degradació del BOA om a el 2,2'-oxo-1,1'-azobenzè (AZOB) i el 4-methoxy-2,2'-oxo-1,1'-azobenzè (MAZOB) del MBOA. Alguns autors [127] van declarar que la transformació del BOA a AZOB era deguda a l'acció d'un bacteri gram negatiu (*Acinetobacter calcoaceticus*).

Altres autors [129], van posar en dubte la formació de l'enllaç oxigen-oxigen entre els fenols en l' AZOB, donada la baixa estabilitat d'aquests compostos. Aquests autors van dur a terme estudis de degradació del BOA en sòl i van concloure que el compost format en un sòl no estèril era una aminofenoxazinona, la 2-amino-phenoxazin-3-one (APO)

provinent de la degradació del 2-aminophenol (APH) fruit d'un procés de transformació microbiana. De la mateixa manera es va trobar que el producte de transformació del MBOA en el sòl és el 2-amino-4,6,7-methoxy-3H-phenoxazin-3-one (AMPO).

Posteriorment altres autors [130] també van apuntar les aminofenoxazinones com a productes de degradació de les benzoxazolinones. Els productes de degradació van ser identificats en experiments de laboratori combinant mostres de sòl amb solucions dels compostos a ser degradats. Zikmundova et al. [86, 131] va identificar diferents aminofenoxazinones productes de la degradació del BOA i el 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) produïda per l'acció de diferents fongs endofítics aïllats de les arrels de l'*A. Tetragona* en sòls on havia estat cultivat el blat. Va descriure la formació seqüencial de l'APO, la seva acetilació produint 2-acetyl-amino-3-H-phenoxazin-3-one (AAPO), una N-oxidació donant lloc al 2-(N-hydroxy)acetyl-amino-3H-phenoxazin-3-one (NHAPO), i la formació final del 2-(2-hydroxyacetyl)amino-3H-phenoxazin-3-one (HAAPO). Van determinar el APH com a producte intermedi en aquest procés de transformació donant-se en primer lloc l'escissió de l'anell heterocíclic del HBOA seguida per una hidròlisi del APH i una posterior oxidació a APO.

A banda de les aminofenoxazinones, també van ser determinats com a productes de degradació de les benzoxazolinones, els àcids malonàmics i les acetamides degut a l'acció d'altres espècies de fongs fito patògens. El fong *G.graminis* varietat *tritici* i el *G. Graminis* varietat *graminis* degraden el BOA a N-(2-hydroxyphenyl)malonic acid (HPMA) i el MBOA a N-(2-hydroxyphenyl-4-methoxyphenyl)malonic acid (HMPMA) [130]. Les acetamides a diferència de les aminofenoxazinones i els àcids malonàmics no són formades a partir de la benzoxazolinona BOA sinó a partir del HBOA produïda per l'acció dels fongs *P.tabacinum* i *G.cibiotti* [86]. A la Figura I.14 es mostra l'esquema de degradació del BOA i MBOA segons Zikmundova et al.[86].

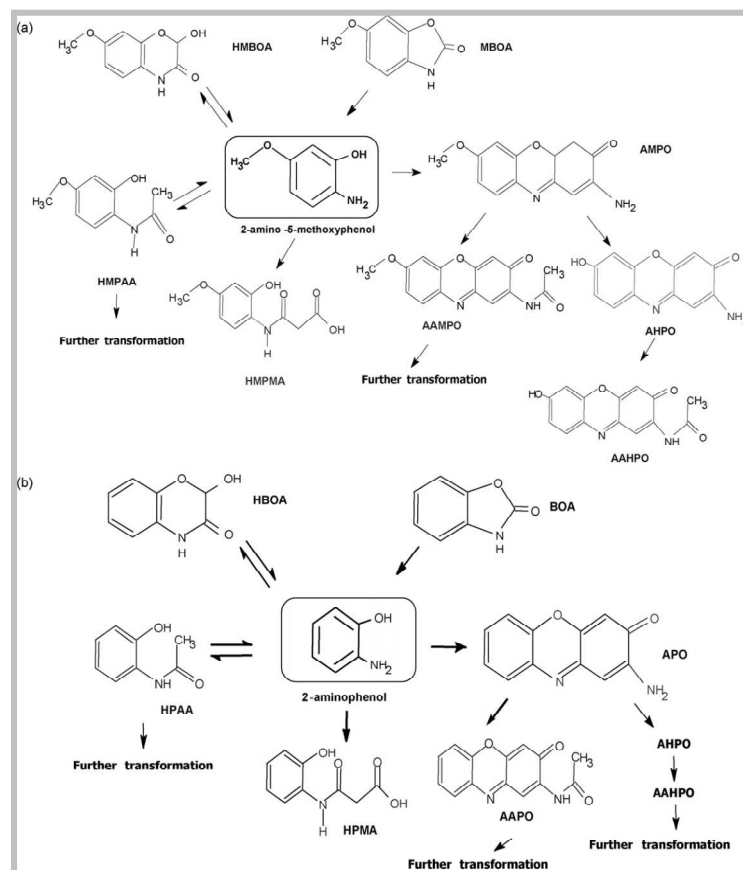


Figura I.14.- Esquema de degradació del a)MBOA i b)BOA [86]

L'alliberament d' al·leloquímics al sòl no només es veu afectat per les seves propietats físico-químiques sinó també per l'adsorció, desorció i transport en el sòl i el propi metabolisme dels compostos al·leloquímics. De la mateixa manera, l'activitat fitotòxica de les substàncies alliberades per les plantes, es veu influenciada per factors mediambientals tals com les propietats físico-químiques del sòl [132], l'activació [126, 133] i inactivació microbiològica [132, 134-138], i el nivell de nutrients en el sòl [139].

I.4.3. El projecte FATEALLCHEM

FATEALLCHEM "Fate and toxicity of allelochemicals in relation to environmental consumers" (FATEALLCHEM QLK5-CT-2001-01967) era un projecte europeu del cinquè programa marc en el que participaven set grups d'investigació: National Environmental Research Institute of Denmark (Roskilde, Dinamarca), Danish Institute of Agricultural Science (Tjele, Dinamarca), Österreichische Agentur für Gesundheit und

Ernährungssicherheit (Viena, Àustria), Universität für Bodenkultur Wien (Viena, Àustria), Universidad de Cadiz (Cadiz, Espanya), Istituto di Ricerche Farmacologiche (Milano, Itàlia), Universitat de Lleida (Lleida, Catalunya), Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis del Aigua (IDAEA) del CSIC (Barcelona, Catalunya).

El principal objectiu del projecte FATEALLCHEM, en el marc del qual s'ha desenvolupat aquesta tesi, era el de portar a terme una valoració del risc ambiental i humà en l'aprofitament de les propietats al·lelopàtiques del blat d'hivern tant en l'agricultura convencional com orgànica.

D'aquesta manera dins del projecte es van dur a terme diversos estudis realitzats per diferents grups d'investigadors europeus relacionats amb:

1. El contingut de compostos al·leloquímics pot estar influenciat per factors geambientals com la quantitat de nutrients presents en el sòl, la temperatura, la radiació o l'ús de productes químics pel control de les males herbes i/o plagues. L'objectiu plantejat va ser el d'identificar i quantificar la quantitat de compostos al·lelopàtics i els seus metabòlits en el blat de diferents varietats, cultivats sota diferents condicions climàtiques i ambientals (Dinamarca i Catalunya) i en diferents sistemes de cultiu (convencional i orgànic), així com en el sòl pròxim a les plantes cultivades sota aquestes condicions. Treball que ha estat desenvolupat dins del grup del IDAEA del CSIC i que queda plasmat en la present tesi.
2. El desenvolupament de pràctiques agrícoles basades en les propietats al·lelopàtiques requereix l'estudi dels efectes de cadascun dels compostos al·lelopàtics sobre determinades espècies de males herbes i insectes. De manera que es va plantejar generar les relacions de dosi-resposta dels principals compostos al·lelopàtics en 12 de les males herbes més importants i a 3 plagues amb 3 dels seus depredadors o paràsits.

3. Dur a terme una valoració del risc pel medi ambient i consumidors dels productes al·lelopàtics del blat i els seus metabòlits comparant-lo amb el risc avaluat de fitosanitaris de síntesis d'acord amb la metodologia descrita en l'Anex VI de la directiva 91/414/EEC, sobre la comercialització de productes de protecció vegetal.
4. Comparar els resultats empírics amb els teòrics utilitzant la predicció basada en models de toxicitat i de transformació ambiental anomenats QSAR.

El punt 1 quedarà explicat al llarg de la present memòria de tesi. Les investigacions realitzades en la resta de punts es resumeixen a continuació.

I.4.3.1. Fitotoxicitat de benzoxazinones i productes de degradació sobre males herbes

Actualment, el desenvolupament de noves tècniques d'assaig de toxicitat representa un dels avenços més importants en el camp de l'estudi dels cultius i compostos al·lelopàtics. L'efecte herbicida de les benzoxazinones s'avalua a través dels exsudats de les arrels d'aquests compostos i els seus productes de degradació.

Diferents estudis s'han dut a terme per tal d'estudiar la capacitat que tenen les benzoxazinones sobre la inhibició o germinació de les males herbes. Hi ha estudis on s'ha vist que tant el DIMBOA com el MBOA inhibien la germinació de l'*Avena fatua* [140]. Alguns estudis han arribat a determinar la potència de cada un d'aquests composts sobre una mateixa espècie de mala herba. Blum et al. [141] conclouen en el seu estudi que el MBOA és més potent en la germinació de *Trifolium incannatum* que el seu precursor DIMBOA. No obstant, en un altre estudi [90] el DIMBOA va resultar tenir un efecte fitotòxic major en 5 espècies de males herbes que els compostos BOA i MBOA.

En el treball dut a terme dins el marc del projecte FATEALLCHEM pels Instituts de Ciències Agrícoles i Recerca del Medi Ambient de Dinamarca [85] es van plantejar diferents assajos experimentals, que incorporen tant estudis de camp com de laboratori per tal de:

1. Estimar la potencial activitat sobre les males herbes de compostos purs tals com el DIMBOA, MBOA, BOA i APO. Els resultats van mostrar un efecte herbicida de 5 a 50 vegades major en l'APO que la resta de compostos. Aquest fet es va contrastar amb l'estudi de Macias et al. [88, 142] que també va trobar un efecte fitotòxic major pel producte de degradació APO. No obstant, cal tenir en compte que tot i ser el compost amb major potencial herbicida, aquest és molt menor que en la majoria dels herbicides sintètics.
2. Intentar correlacionar el contingut de DIMBOA, MBOA i BOA amb l'efecte sobre les males herbes. La quantificació d'aquests al·leloquímics en plantes de blat cultivades en condicions de camp és part del treball d'aquesta tesi (capítol IV). La major quantitat de compostos al·lelopàtics es va trobar en els primers estadis de creixement de la planta els quals presentaven efectes sobre les males herbes. No obstant en altres casos on es detectaven nivells de compostos similars no s'observaven efectes. Inclús s'observaven efectes sobre males herbes en plantes amb baixos nivells de compostos. En conseqüència, l'eficàcia d'aquests compostos químics envers la lluita amb les males herbes no es va poder correlacionar positivament amb els nivells estimats dels compostos.
3. Comprovar l'efecte d'incorporar residus de blat sobre la germinació i creixement de 12 espècies de males herbes. Els efectes d'inhibició més importants es van observar en la incorporació dels residus de blat dels primers estadis de creixement i pel blat cultivat en condicions orgàniques. No obstant, no va ser possible identificar una tendència general en la resposta sobre les diferències en la susceptibilitat de les espècies de males herbes o en les propietats al·lelopàtiques de varietats de blat. Els resultats van mostrar que la inhibició en el creixement de la planta era més freqüent en les plantes del cultiu orgànic envers al convencional (ús herbicides sintètics).

Mathiessen et. al. [85] plantegen que els efectes observats en alguns dels tractaments podrien ser deguts a la sinergia entre diversos compostos presents al mateix temps. No

obstant, en un treball on s'estudien els efectes sinèrgics de barreges de compostos al·leloquímics, els resultats van mostrar un efecte additiu en alguns casos i menys additiu en d'altres, de manera que aquests resultats suggereixen que l'efecte al·lelopàtic del blat no és degut a l'efecte sinèrgic de mescles d'aquests compostos.

Si la relació entre el contingut de compostos al·lelopàtics en la planta així com la sinergia de mescles dels mateixos no es podia correlacionar directament amb els efectes fitotòxics trobats, els autors van començar a avaluar la possibilitat que l'efecte fos degut als productes de degradació d'aquests.

Investigacions recents sobre la fitotoxicitat de les benzoxazinones i els seus productes de degradació sobre espècies estàndard i altres males herbes mostren que el producte de degradació APO és el que presenta major toxicitat envers els seus predecessors, tal i com havia observat Mathiessen et.al. [85] en el seu estudi amb compostos purs.

Des del punt de vista de la degradació de les benzoxazinones i la seva fitotoxicitat, l'exsudació d'aquests compostos des de les arrels d'aquests cultius desencadena processos de degradació tant espontanis com de degradació microbiana, que proporcionen un còctel químic que s'encarrega de donar lloc al fenomen al·lelopàtic.

I.4.3.2. Fitotoxicitat de benzoxazinones i els productes de degradació sobre organismes presents en el sòl

En un estudi dut a terme al Institute of plant Health de Viena [143], els autors avaluen els efectes tant letals com subletals del DIMBOA i els seus productes de degradació MBOA, AMPO i 2-acetylamino-9-methoxy-2-amino-3-H-phenoxazin-3-one (AAMPO) així com els efectes dels pesticides amb estructures relacionades (phosalone i oxadixyl) sobre organismes presents en el sòl agrícola (*F.candida* i *P.cupreus*). Els resultats obtinguts es van comparar posteriorment amb els efectes observats amb pesticides de referència (phenmediphan i dimethoate). Els resultats de l'estudi, van mostrar que ni el DIMBOA ni els seus productes de degradació MBOA, AMPO i AAMPO presenten cap risc pels

organismes del sòl exposats a les suposades concentracions d'aquests compostos en condicions de camp. En contrapartida, els pesticides testats van presentar un risc de moderat a alt, almenys per alguns dels organismes.

I.4.3.3. Models de toxicitat QSAR

Els sistemes basats en regles per a la predicció de l'ecotoxicologia i el comportament de productes químics, és a dir la *QSAR* estan prenent importància com a eines per a l'avaluació de nous productes químics, com poden ser el compostos al·leloquímics.

Per tal de dur a terme una rigorosa avaluació de la sostenibilitat dels diferents sistemes de cultiu incloent l'ús de productes fitosanitaris de síntesi, com pot ser el cas de compostos d'origen natural amb efecte sobre la producció de les plantes, són necessaris, sens dubte, estudis empírics. No obstant, donat que es tracta de sistemes complexos, en els que no es poden dur a terme aquests estudis en tots els escenaris possibles, una bona aproximació és dur a terme estudis *QSAR* que permetran obtenir eines que ens ajudaran a avaluar el risc. Aquests models determinen les característiques principals necessàries per l'activitat, així com diversos paràmetres que indicaran el pes específic de determinades propietats físico-químiques que les controlen [102, 144, 145].

Macías et al. [146] van aplicar un estudi *QSAR* sobre les benzoxazinones. Els resultats de *SAR* de les modificacions sobre l'estructura d'aquests compostos [147], mostraven que l'activitat fitotòxica es una funció dels efectes estèrics i electrònics causats pels substituents introduïts en l'estructura base, on el volum molecular i el moment dipolar resulten més rellevants. A partir dels estudis *QSAR*, es va trobar que la lipo-solubilitat (solubilitat en medi oliós) és un factor determinant en l'activitat fitotòxica, i que en alguns casos, els derivats mostren una major activitat fitotòxica i selectivitat sobre l'espècie receptora.

I.5. ANÀLISI DE COMPOSTOS AL·LELOPÀTICS EN EL BLAT

I.5.1. Introducció

El propòsit d'aquest apartat pretén situar al lector en el marc de les metodologies que s'han establert per tal de dur a terme l'anàlisi dels compostos definits com a responsables de l'activitat al·lelopàtica en el blat. Fins la data, no s'han dut a terme molts treballs sobre el desenvolupament i validació de metodologies analítiques per a l'anàlisi de benzoxazinones i els seus derivats en diferents plantes de cereals. Aquestes van ser objecte de revisió i es troben descrites en la publicació científica #1# "*Analysis of benzoxazinone derivatives in plant tissues and their degradation products in agricultural soils*", on es mostra l'estat de l'art de les metodologies abans del treball realitzat en la tesi així com les metodologies establertes durant el transcurs de la mateixa, destacant el desenvolupament de noves metodologies més selectives i sensibles, les quals seran explicades més extensament en el transcurs dels propers capítols.

El coneixement de la mostra i dels compostos a analitzar esdevé un punt clau a l'hora de planificar la metodologia analítica més adequada. Tant les plantes com el sòl són matrius extremadament complexes, que poden contenir un gran nombre de compostos pertanyents a famílies químiques diverses i a nivells de concentració diferents. Aquest fet, exigeix un pretractament de la mostra encaminat principalment a l'aïllament dels analits d'interès. Qualsevol procediment analític està integrat per una sèrie d'etapes relacionades entre si, que s'estenen des del plantejament de l'objectiu de l'anàlisi fins a l'obtenció de resultats. Totes i cadascuna d'aquestes etapes influencien sobre el resultat final. Per tant, la identificació i quantificació de compostos orgànics a nivells traça, en matrius complexes, es pot aconseguir combinant eficients mètodes de concentració i separació juntament amb tècniques de detecció sensibles i selectives.

En general, la preparació de la mostra per a la determinació de compostos orgànics, inclou habitualment una o varies etapes com són l'extracció dels analits de la matriu, la purificació de l'extracte, amb la finalitat d'eliminar interferents i, en molts casos, la pre-

concentració dels compostos objecte d'anàlisi, per tal d'assolir els límits de detecció adequats. Les característiques físico-químiques dels analits juguen un paper important en l'aplicació de diferents etapes en el tractament de la mostra. L'estructura química del compost, en determina la seva polaritat i volatilitat, el que permet seleccionar el dissolvent més apropiat per a la seva extracció, així com la tècnica més adequada per l'anàlisi cromatogràfic.

El coeficient de distribució octanol/aigua (K_{ow}) és una mesura de com una substància química pot distribuir-se entre dos solvents immiscibles, aigua (solvent polar) i octanol (relativament no polar, que representa a les grasses) i ens dóna informació de la seva polaritat. D'aquesta manera:

- o $\log K_{ow}$ ($\log K_{ow} > 3$ ó $K_{ow} > 1000$) **HIDROFÒBICS**. S'acumulen en les porcions lipídiques dels organismes i tendeixen a concentrar-se en sòls i sediments.
- o $\log K_{ow}$ ($\log K_{ow} < 3$ ó $K_{ow} < 1000$) **HIDROFÍLICS**. Tendeixen a distribuir-se a l'aigua i l'aire.

Hi ha poques dades experimentals sobre les característiques físicoquímiques de les benzoxazinones, però a través de diversos programes informàtics (Syracusa, Pallas, Sparc, VCC Lab), es poden arribar a estimar paràmetres com la polaritat dels analits (Taula I.3).

Taula I.3.- Estimació del $\log P$ per a les benzoxazinones i aminofenoxazinones

	SYRACUSA	PALLAS	SPARC	VCC Lab	Experim. Tractament dades							
	KOWWIN	LOG P	LOG P	ALOGPS	IA logP	Clog P	miLogP	xLogP	LogP	MITJA	DESVEST	%CV
HBOA	0.47	0.70	0.85	0.47	-0.13	0.1	0.74	-	-	0.32	0.33	103.03
DIBOA	1.72	0.23	1.48	-0.08	0.27	-0.22	0.31	-	-	0.38	0.77	201.80
HMBOA	0.39	0.59	0.99	0.41	-0.02	0.13	0.69	-	-	0.30	0.24	80.90
DIMBOA	1.64	0.28	1.55	0.13	0.18	-0.13	0.25	-	-	0.42	0.70	166.33
BOA	0.95	1.56	0.39	0.95	1.24	1.16	1.11	0.95	1.16	1.17	0.25	21.50
MBOA	1.03	1.35	0.48	1.21	1.37	1.08	1.05	-	-	1.20	0.15	12.72
APH	0.60	0.49	0.71	0.35	0.29	0.62	1.04	1.23	0.62	0.47	0.15	31.31
HPAA	0.62	0.78	0.77	0.54	0.62	0.72	1.36	0.62	0.72	0.66	0.09	14.37
AMPO	1.35	2.13	0.07	1.13	1.09	0.56	1.36	1.35	-	1.25	0.57	45.54
APO	0.85	1.62	0.05	1.00	1.19	0.39	0.31	0.10	-	1.01	0.45	44.68

Tot i que la variabilitat en els resultats de l'estimació del log P pot resultar ser elevada, observant l'estructura dels diferents compostos que presenten diferents grups polars en la seva estructura i els valors del logP estimats, es pot concloure que es tracten de compostos polars, el que en determina la seva extracció a través de dissolvents polars, com l'aigua i el metanol i el seva anàlisi a través de la cromatografia de líquids (LC).

Les tècniques d'extracció emprades, depenen també de la matriu a analitzar. Si no es duu a terme un tractament adequat i extensiu de la matriu, una gran quantitat d'espècies endògenes poden co-eluir amb els analits d'interès. Aquest efecte queda palès quan es duu a terme l'anàlisi instrumental de les mostres. Així doncs, una de les problemàtiques associades al desenvolupament de mètodes quantitius amb sistemes de LC acoblats a l'espectrometria de masses (LC-MS) és el denominat efecte de matriu (EM). L'EM pot provocar un augment o disminució no esperada de la resposta dels analits d'interès, que es produeix per la co-elució d'altres components presents en la matriu [148-154]. El mecanisme exacte que explica l'EM encara no s'ha descrit amb exactitud, però hi ha treballs com els de King et al. [155] i Kerbale et al. [156] que intenten explicar quin és el seu principi. En aquests estudis es mostra que l'EM prové de la competició entre els compostos no volàtils de la matriu i els ions dels analits per accedir a la superfície de les gotes i passar a l'estat gasos durant el procés d'ionització. Aquesta hipòtesi justificaria perquè l'EM és un problema més present en l'ús d'interfases ESI que en APCI. Aquest no és un efecte universal, i no depèn exclusivament del tipus d'analit sinó de la seva concentració i també del tipus de matriu a analitzar. L'EM normalment porta associat un significat deteriorament de la precisió del mètode analític [149], de manera que és important dur a terme una valoració d'aquest efecte per a cada analit seleccionat en les diferents matrius d'estudi.

La LC en fase invertida és la tècnica generalment escollida en la separació de compostos orgànics polars. Un dels beneficis que ofereix l'acoblament de la LC-MS, és que no és necessari que els analits es separin completament, per tal de poder-los detectar selectivament. Tanmateix, és sempre aconsellable a fi d'evitar o reduir els efectes de supressió anteriorment esmentats.

Pel que respecte als sistemes de detecció acoblats a la LC, el ràpid desenvolupament en el camp de l'espectrometria de masses, ha fet que aquesta sigui la tècnica de detecció per excel·lència en l'anàlisi de compostos orgànics a nivell ambiental, reemplaçant altres detectors que fins ara havien tingut una ampla difusió, com els de fluorescència o Diode array (DAD). Amb el desenvolupament de l'espectrometria de masses i masses en tàndem, s'aconsegueixen millors límits de detecció, que poden arribar a assolir nivells de fins a pico grams [157]. D'entre tots els tipus d'analitzadors, els més emprats són els de tipus quadrupol tant simple (Q) com triple (QqQ), la trampa d'ions (IT) i l'aparició posterior d'instruments híbrids tipus quadrupol-temps de vol (Q-TOF), quadrupol-trampa d'ions lineal (Q-LIT), trampa d'ions lines-Orbitrap (LTQ Orbitrap) i quadrupol-Orbitrap (Q-Orbitrap) els quals presenten l'avantatge d'ambdós tipus d'analitzadors, i combinen versatilitat, selectivitat i precisió en la identificació d'analits.

A continuació s'exposen els punts més rellevants de l'anàlisi de compostos al·lelopàtics en el blat i que seran descrits en més detall en el transcurs de la memòria de la present tesis.

I.5.2. Estratègies analítiques

Els compostos al·lelopàtics poden estar presents en diferents parts de la planta i la gran majoria dels estudis publicats s'han dut a terme determinant nivells de benzoxazinones i productes relacionats en arrels i fulles de diferents plantes de cereals.

Donat que els àcids hidroxàmics glucosats són extremadament sensibles a la seva deglucosilació enzimàtica seguit de la degradació química a benzoxazolinones, tant l'etapa de presa de mostra com l'etapa de la seva preparació esdevé de gran importància i ha creat controvèrsia a l'hora de determinar la presència o no d'aglucones en plantes no danyades.

En l'anàlisi qualitatiu i quantitatiu de les benzoxazinones i els seus derivats en extractes de plantess'han abordat diferents estratègies, en funció dels compostos al·lelopàtics

quees vulguin analitzar, basades principalment en l'estabilitat dels analits durant el tractament de la mostra i que es poden diferenciar en:

1. La determinació del contingut total de benzoxazolinones mitjançant la hidròlisis dels compostos glucosats a les aglucones i aquestes a benzoxazolinones de tal manera que no hi ha una diferenciació entre els diferents derivats. Amb aquesta estratègia s'assumeix que 1 mol d'àcid hidroxàmic produeix 1 mol de benzoxazolinones després de la seva degradació, i es mesura el contingut d'àcids hidroxàmics com a benzoxazolinones. Cal esmentar que la transformació dels compostos glucosats a les benzoxazolinones no és sempre una reacció quantitativa i depèn de factors tals com el pH, la temperatura i la composició del medi de reacció. Per tant, aquesta metodologia pot portar associat un error en l'estimació del contingut d'al·leloquímics en els extractes de la planta [158-162].
2. La determinació del contingut total d'aglucones a través de la mesura del contingut d'al·leloquímics duent a terme la hidròlisis dels compostos glucosats a aglucones i evitant la degradació d'aquestes a benzoxazolinones [76, 122, 124, 159, 163-168]. Un cop hidrolitzats els àcids hidroxàmics s'evita la degradació de les aglucones formades ajustant el pH dels extractes amb àcid, normalment fosfòric o clorhídric, ja que un medi neutre o bàsic facilita la degradació d'aquestes a les corresponents benzoxazolinones [115].
3. La determinació del contingut de compostos glucosats, aglucones i benzoxazolinones per separat. Aquests mètodes es basen en l'estabilitat dels àcids hidroxàmics en una solució aquosa [161] i l'extracció es du a terme amb solvents orgànics, normalment metanol (MeOH), a ebullició i a pH àcids per tal d'evitar la degradació de les aglucones. No obstant, s'ha de tenir present que aquestes són termolàbils i l'extracció a elevades temperatures pot provocar la seva degradació. La metodologia analítica desenvolupada en la present tesi es basa en aquesta estratègia i ha permès l'anàlisi dels diferents derivats dels les benzoxazinones

presentes en les plantes de blat, evitant la termo-degradació de les aglucones, fet que serà explicat en el transcurs de la present memòria de tesi.

I.5.3. Extracció de la mostra

Existeixen una gran varietat de tècniques d'extracció sòlid-líquid (SLE) àmpliament usades en l'anàlisi de productes naturals en plantes i microorganismes. Aquestes tècniques van des de les més tradicionals com poden ser el Soxhlet i l'ultrasons fins a tècniques més recents com l'extracció per fluids supercrítics (SFE), l'extracció assistida per microones (MAE) i l'extracció per líquids pressuritzats (PLE). Les tècniques usades per a l'extracció dels compostos al·leloquímics en plantes varia en funció als analits a analitzar i es troben metodologies que duen a terme una maceració de la mostra amb aigua amb posteriors etapes de filtració i centrifugació a metodologies basades en l'extracció mitjançant ultrasons usant MeOH com a solvent d'extracció. En el transcurs d'aquesta tesi es va posar a punt un mètode d'extracció mitjançant PLE el qual aporta els avantatges de la tècnica en quant a temps d'extracció més baixos i menor ús de dissolvents (veure capítol II i capítol III).

I.5.4. Purificació dels extractes

En els extractes de les plantes, una gran varietat de substàncies (lípid, sals, fosfats, pèptids, clorofil·la, etc.) poden interferir en la quantificació dels analits d'interès. Aquest fet indica la necessitat d'una etapa de purificació dels extractes prèvia a l'anàlisi instrumental. En la majoria dels treballs revisats no es duu a terme aquest pas, i els extractes són directament analitzats un cop finalitzada la seva extracció. L'estudi de Baumeler et al. [169] és dels pocs que descriuen una estratègia de neteja dels extractes. En el seu treball van observar que alguns compostos d'acord amb l'espectre UV obtingut, probablement flavonoids, eluïen amb temps de retenció idèntics a les benzoxazinones, i van dur a terme una purificació dels extractes que consistia en una extracció en fase sòlida (SPE) amb l'ús de cartutxos Sep-Pack C18. En la present tesi, es va dur a terme una etapa de purificació dels extractes mitjançant extracció en fase sòlida, seguint el proposat per Baumeler et. al, però tot i així aquest no va resultar ésser un tractament

suficientment extensiu i posteriorment es va haver de dur a terme l'estudi de l'efecte matriu dels extractes amb l'objectiu d'obtenir un anàlisi quantitatiu més acurat de les mostres.

1.5.5. Anàlisi instrumental

Els primers estudis sobre la separació i identificació dels compostos al·lelopàtics estaven basats en tècniques analítiques amb baix poder de separació, com la cromatografia en capa fina [159], i poc selectius, com els mètodes espectrofotomètrics [122, 163, 166, 167]. Aquests últims es basen en la formació de complexos blaus entre els àcids hidroxàmics i el clorur fèrric, essent una metodologia poc específica donat que no és possible distingir entre compostos. Posteriorment, es van anar desenvolupant noves metodologies basades en la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS), la cromatografia de líquids amb un detector ultraviolat (LC-UV) i la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses (LC-MS, LC-MS/MS), aportant una major selectivitat i sensibilitat a les metodologies fins el moment desenvolupades.

La GC-MS està considerada com una eina analítica potent per a la caracterització de mesclures orgàniques complexes. És una tècnica d'elevada sensibilitat i selectivitat amb l'avantatge de poder disposar de biblioteques d'espectres de massa per a la identificació i/o confirmació dels analits. No obstant, en molts casos cal dur a terme la derivatització de les mostres amb l'objectiu d'incrementar la volatilitat i estabilitat dels analits. Aquesta tècnica ha estat descrita per alguns autors per a determinar el contingut de compostos al·leloquímics. La gran majoria dels treballs descrits [124, 125, 170] focalitzen les anàlisis en la determinació dels àcids fenòlics (p-hidroxibenzoic, vanil·lic, p-cumaric, siringic), els quals també han estat identificats com a compostos al·lelopàtics en el blat, i pocs d'ells en descriuen l'anàlisi de les benzoxazinones i els seus derivats [107, 171]. Els agents derivatitzants més emprats són el bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide amb un 1% de trimethylchlorosilane i el N—methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. En el treball de Wu et al. [167] van dur a terme la determinació d'alguns àcids fenòlics juntament amb el

DIMBOA a través de la GC-MS-MS, usant el detector de trampa iònica per a l'anàlisi de MS-MS. L'ús d'aquesta metodologia va mostrar una major sensibilitat i selectivitat que els mètodes de GC-MS, obtenint per exemple relacions senyal soroll per al a l'àcid p-clorobenzoic 50 vegades majors en MS-MS que en MS.

Durant els anys 1980 i 1990s, es van desenvolupar varis procediments per la separació i quantificació dels àcids hidroxàmics i els seus productes de degradació en els extractes de planta, usant la LC com a tècnica de separació [76, 163, 172-178]. La detecció mitjançant un detector UV a 288, 280, 263 o 254 nm ha estat la més emprada, però aquest mètode pot portar associat errors en la determinació del contingut en al·leloquímics en la planta per possibles co-elucions amb altres compostos i és recomanable usar-la només quan es tracta de compostos de referència purs. Per vèncer les limitacions de LC-UV, l'ús de la LC-MS aporta clars avantatges, en termes de selectivitat i sensibilitat. Es troben pocs treballs que hagin utilitzat la LC-MS per a la identificació d'al·leloquímics [176, 179], entre les quals es troben les metodologies desenvolupades en el transcurs d'aquesta tesi i que seran explicats més extensament en el transcurs de la memòria presentada [180, 181].

La separació cromatogràfica dels àcids hidroxàmics i els seus derivats s'ha dut a terme principalment amb columnes de sílice modificada amb grup octadecil (RP-C18). Diversos estudis han mostrat la dificultat d'obtenir una bona separació cromatogràfica per a tots els analits i es troben estudis on s'avalua la separació amb diferents columnes basades en sílices modificades amb grups octadecil [166, 168, 169, 173, 176, 182]. Bonnington et al. [181] va dur a terme la valoració de diferents columnes cromatogràfiques per a la separació dels àcids hidroxàmics, aglucones, lactames i benzoxazolinones. Tres de les columnes basades amb RP-C18 (Lichrocart C18, Nucleosil C18 i Ultracarb C18) presentaven pics cromatogràfics amb cues i degradació de les aglucones DIMBOA i DIBOA. Donat que els pics cromatogràfics que presenten cua (*tailing*) indiquen que la interacció dels analits amb la fase estacionària és forta, va optar per provar una columna de sílice modificada menys apolar (Synergy MAX-RP C12 hydrocarbon modified silica phase with TMS end-capping of the surface silanols) (Figura I.15).

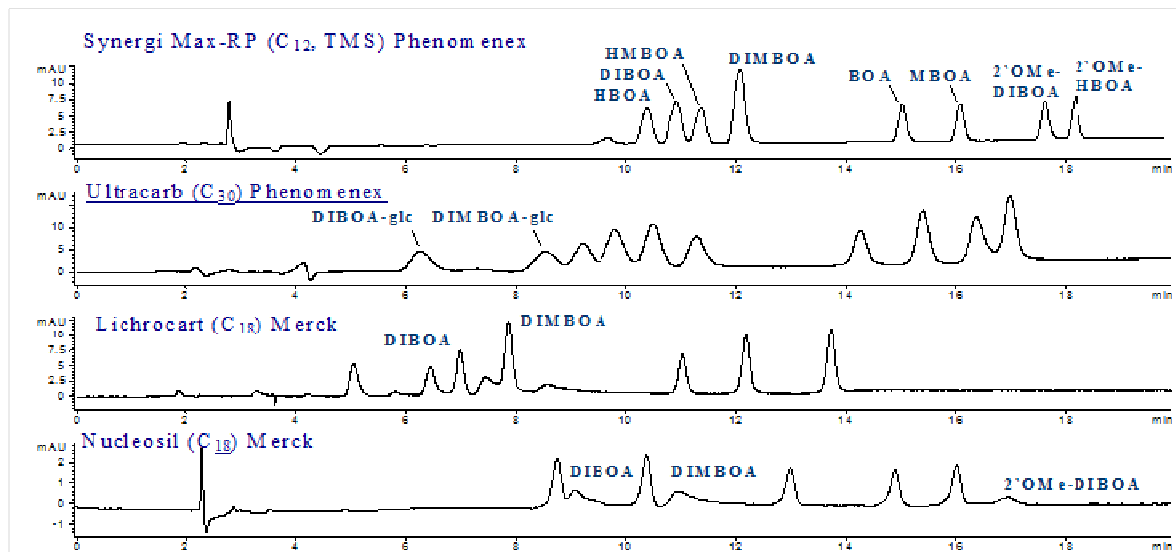


Figura I.15.- Separació cromatogràfica de les benzoxazinones en diferents columnes cromatogràfiques [181]

L'ús d'aquesta columna li va aportar millors resultats respecte a l'estabilitat tant dels analits, reduint les cues i la seva degradació, com de la columna. El treball de Bonnington et al.[181] es va prendre de referència per l'anàlisi d'aquests compostos en el transcurs de la present tesi.

I.5.6. Anàlisi de compostos al·lelopàtics en sòl agrícola

Es troben pocs treballs sobre l'anàlisi dels compostos de degradació de les benzoxazinones en el sòl agrícola i la majoria d'ells no presenten una estratègia per dur a terme una anàlisi quantitativa. Aquests estudis es focalitzen en la identificació dels productes de transformació de les benzoxazolinones en estudis de laboratori, combinant mostres de sòl agrícola amb solucions dels analits que potencialment poden ser degradats en el sòl. Passat un temps d'incubació s'extreuen els compostos del sòl usant MeOH com a solvent d'extracció i posteriorment són analitzats per a la seva confirmació. Tots aquests treballs aporten informació qualitativa sobre la identificació dels productes de degradació que poden estar presents en el sòl però no aporten informació sobre les metodologies analítiques per una anàlisi quantitativa en estudis de camp. Les primeres metodologies analítiques desenvolupades per tal d'assolir una anàlisi quantitativa corresponen a les desenvolupades durant el transcurs de la present tesi i seran explicades més extensament en el transcurs d'aquesta memòria (Capítol III).

Finalment, és important mencionar que de la mateixa manera que els seus precursors, s'ha de tenir en compte la baixa disponibilitat comercial d'aquests compostos. Diversos autors han desenvolupat rutes de síntesis que en major o menor escala ens permeten disposar dels analits d'interès [130, 183-187]. L'estabilitat d'aquests analits s'haurà de tenir en compte per dur a terme el desenvolupament d'una metodologia analítica quantitativa.

I.6. PUBLICACIÓ CIENTÍFICA

Publicació científica #1

“Analysis of benzoxazinone derivatives in plant tissues and their degradation products in agricultural soils”

Per:

Marta Villagrasa, Ethel Eljarrat i Damià Barceló

Revista:

Trends in Analytical Chemistry

Analysis of benzoxazinone derivatives in plant tissues and their degradation products in agricultural soils

M. Villagrasa, E. Eljarrat, D. Barceló

Plant allelopathy may be considered an additional means of weed control in modern agriculture, but its means of action are not well understood and knowledge of specific allelochemicals involved in allelopathy is required.

Benzoxazinoids are a chemical family with the most active allelopathic compounds in some crops (e.g., wheat, rye or maize). The analysis of these analytes has been based mainly on gas chromatography coupled to mass spectrometry (MS) and liquid chromatography (LC) coupled to ultraviolet detection. To improve the sensitivity and selectivity, new methodologies (e.g., LC coupled to MS and tandem MS) are being developed. Less information is available on the analytical strategies to determine their degradation products in soil samples.

This article presents an overview of recent advanced analysis of benzoxazinone derivatives in plant tissues and their degradation products in agricultural soils.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Agricultural soil; Allelopathy; Allelochemical; Analysis; Benzoxazinoid; Benzoxazinone; Degradation product; Derivative; Plant tissue

M. Villagrasa,
E. Eljarrat*,
D. Barceló

Environmental Chemistry
Department, IDAEA-CSIC,
C/Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain

D. Barceló
Institut Català de Recerca de
l'Aigua (ICRA),
C/Emili Grahit 101,
17003, Girona, Spain

*Corresponding author.
Tel.: +34 93 4006100x322;
E-mail: eeeqam@cid.csic.es

1. Introduction

The excessive use of agrochemicals for pest control or weed control in recent years has caused not only problems (e.g., environmental pollution, unsafe products, human-health concerns, soil sickness, and reduction of crop productivity) but also some species to become resistant to synthetic pesticides. One safe way to overcome these problems is the use of allelopathy to sustain development in ecological agriculture and to maintain a clean environment for our future generations. Allelopathy refers to the beneficial or harmful effects of one plant on other plant, both crop and weed species, by the release of chemicals from plant parts by leaching, root exudation, volatilization,

residue decomposition and other processes in both natural and agricultural systems.

The chemicals identified as the most active allelopathic compounds in different crops (e.g., wheat, rye or maize) are of the same chemical family, the benzoxazinones. In this article, we review the methodologies for analyzing eight benzoxazinone derivatives and seven degradation products (Fig. 1).

Hydroxamic acids are found in plants as β -glucosidases [1] [i.e. 2,4-dihydroxy-2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one glucoside DIBOA-Glc and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one glucoside DIMBOA-Glc]. When plant tissue is damaged, β -glucosidase is enzymatically hydrolyzed to the corresponding aglucones [i.e. 2,4-dihydroxy-2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one (DIBOA), and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one (DIMBOA)], which are converted to their corresponding benzoxazolinones [i.e. 1,3-benzoxazol-2(3H)-one (BOA) and 6-methoxy-1,3-benzoxazol-2(3H)-one (MBOA)].

When leached to the soil, the aglucones are also rapidly transformed to benzoxazolinones [2,3]. Moreover, the benzoxazolinones are subjected to additional transformation in the soil. According to the literature [4], the major degradation products of benzoxazolinones (MBOA and BOA) are aminophenoxazinones [i.e. 2-amino-3-H-phenoxazin-3-one (APO), 2-acetylamino-3-H-phenoxazin-3-one (AAPO), 9-methoxy-2-amino-3-H-phenoxazin-3-one (AMPO), and 2-acetylamino-9-methoxy-2-amino-3-H-phenoxa-

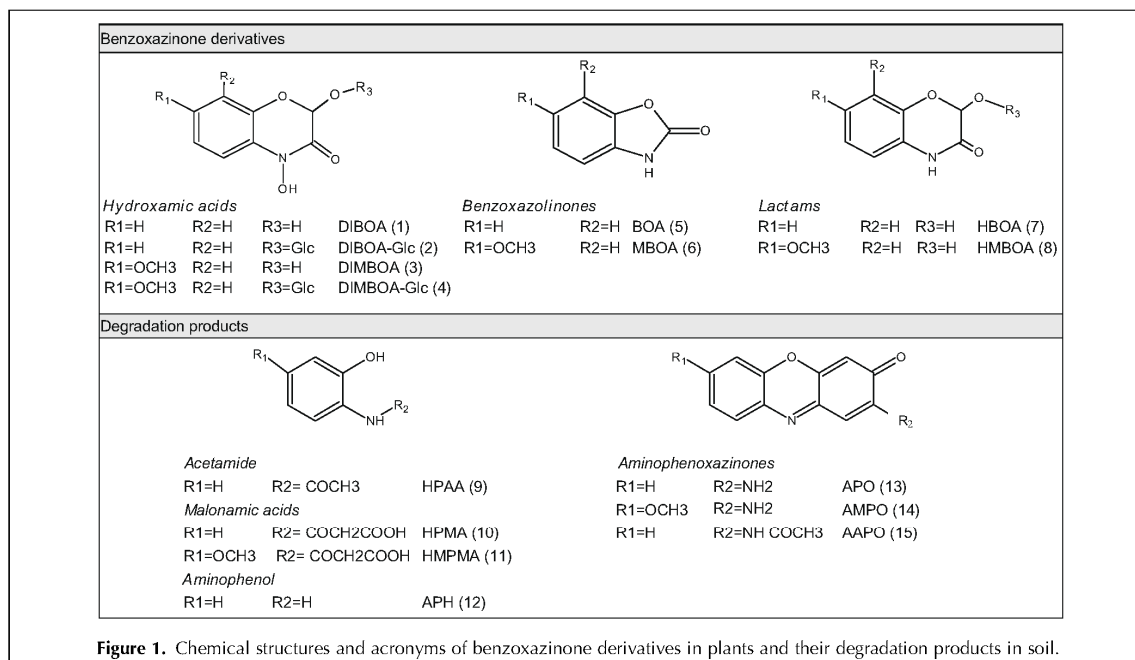


Figure 1. Chemical structures and acronyms of benzoxazinone derivatives in plants and their degradation products in soil.

zin-3-one (AAMPO)], acetamide [i.e. N-(2-hydroxyphenyl)acetamide (HPAA)] and corresponding malonic acids [i.e. N-(2-hydroxyphenyl) malonic acid (HPMA), and N-(2-hydroxyphenyl-4-methoxyphenyl)malonic acid (HMPMA)].

For an adequate understanding of allelopathic effects and mechanisms, knowledge of these specific allelochemicals is required. Capability in measuring benzoxazine derivatives is useful for studies on the biosynthesis of these compounds and for studies on their fate under conditions of insect feeding, disease or other stress. In recent years, interest in the possible biotransformation of benzoxazinone derivatives in cultivated soils has increased because the new compounds with modified biological properties could affect the ecological role and the chemical-defense mechanism of the plant.

The present article surveys the current state of methodologies for the determination of benzoxazine derivatives in plants and their degradation products in soil, including sample preparation and instrumental analysis. The determination of these compounds depends strongly on the procedure used.

In the literature reviewed, there were many works on chemical identification but few on quantification. During the 1980s and the 1990s, analysis of benzoxazinone derivatives was based mainly on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to ultraviolet spectroscopy (LC-UV). To improve the sensitivity and the selectivity of these

previous methods, new methodologies [e.g., LC coupled to MS (LC-MS) and tandem MS (LC-MS²) were developed. A previous work summarized the methodologies developed up to 2000 [5].

Less information is available about the analytical strategies to determine the degradation products of benzoxazine derivatives in soil samples. These were identified from studies carried out in the laboratory by combining soil samples from commercial wheat crops with stock solutions of the substrates to be degraded [2,6].

2. Analytical methodologies

Table 1 show the most relevant experimental conditions of the procedures, including the sample-preparation steps, the LC column and the mobile phase used, the detection systems, and the limits of detection and quantification for the various target analytes.

2.1. Standards

One of the major difficulties associated with analysis of several allelochemicals is their scarcity as commercial compounds. This section describes the methods employed for their synthesis.

2.1.1. Benzoxazinone derivatives. Sicker et al. [7] and Macías et al. [8] published overviews of the chemical synthesis of benzoxazinone derivatives. Several reference

Table 1. The most relevant experimental conditions of the procedures, including the sample-preparation steps, the LC column and the mobile phase used, the detection systems, as well as the limits of detection for the various target analytes

Sample	Analyte	Sample preparation	Technique	Stationary phase	Mobile Phase	LOD	Ref.
Benzoxazolinones as a measure of glucoside content							
<i>Zea mays</i>	5,6	Freeze and cut samples Wash with ethanol Filtration Addition of Celite 545 Wash with H ₂ O and heated Extraction with CH ₂ Cl ₂	IR	-	-	NR	[25]
<i>Zea mays</i>	5,6	Homogenization with H ₂ O Centrifugation Incubation at room temperature for 1 h Heat at 100°C for 30 min Centrifugation Extraction with CH ₂ Cl ₂	GC	1 m x 2 mm id glass column packed with Silar-5CP on 80-100 mesh Chromosorb W-HP	-	NR	[27]
Hydroxamic acids avoiding the degradation to benzoxazolinones							
<i>Triticum aestivum</i>	3,5,6	Freeze-dried Cut sample Add 3 mL 0.001 M HCl Sonication Centrifugation	GC-MS ²	DB-5 MS Fused-silica (30 m x 0.25 mm I.D.)	-	NR	[36,37,50]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3	Maceration with H ₂ O Adjusted to pH 3 (0.1 M H ₃ PO ₄) Centrifugation Filtration	HPLC-UV	Lichospher 100 RP-18 (125 x 4 mm)	A: MeOH B: H ₂ O (0.5 mL H ₃ PO ₄ /1 L H ₂ O)	1 µmol/kg fr.wt.	[32]
<i>Graminea</i>	1,3	Maceration (H ₂ O) Filtration Adjust pH 3 with HCl Centrifugation. Extraction with Et ₂ O	HPLC-UV	µBondapak phenyl	A: MeOH B: H ₂ O (15 mM Na ₂ HO ₄ ; pH.5)	1 µmol/kg fr.wt.	[34]
<i>Graminea</i>	1,3	Maceration (H ₂ O) Filtration Adjust pH 3 with HCl Centrifugation. Extraction with Et ₂ O	TLC-UV	TLC silica gel GF 254 plate (5 x 20cm)	A: Benzene-Et ₂ O (1:4) (TLC) B: EtOH (extraction)	50 nmol/g fr.wt.	[35]
<i>Triticum aestivum</i>	3	Maceration (H ₂ O) Adjusted to pH 3 (0.1 M H ₃ PO ₄) Centrifugation	HPLC-UV	RP-18 (12.5 x 4 mm)	A: MeOH B: H ₂ O (0.05% H ₃ PO ₄)	-	[30]

(continued on next page)

Table 1. (continued)

Sample	Analyte	Sample preparation	Technique	Stationary phase	Mobile Phase	LOD	Ref.
<i>Triticum aestivum</i>	1,3	Ground sample with H ₂ O in Agar Adjusted pH with H ₃ PO ₄ Centrifugation Extraction with E ₂ O	TLC HPLC-UV	HPLC: R18 (15 x 1 cm id)	TLC: toluene-diethylether butanol: HOAc HPLC: A: MeOH B: H ₂ O (0.05% H ₃ PO ₄)	NR	[26]
Corn Leaf	1,3,5,6	Glucoside compound: Extraction in boiling MeOH Evaporation of MeOH Reconstitution (H ₂ O) pH adjustment (HCl) Extraction (ethyl acetate) Aglycone compounds: Homogenization (H ₂ O) pH adjustment (HCl) Extraction (n-Hexane) Extraction (ethyl acetate)	HPLC-UV	Guard column (C18, Supelco) RP-18 column (4.5 mm x 25 cm)	A: H ₂ O (1% HOAc) B: MeOH	0.2 nmol	[38]
Glucosides, aglucosides and benzoxazinones							
<i>Triticum aestivum</i>	1,3,5-8	Freeze-dried Extraction by PLE SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-MS ²	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (2.50 x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (0.05% HOAc) B: MeOH (0.05% HOAc)	0.1-1.1 µg/g	[54]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3	Extraction in boiling MeOH Filtration Centrifugation	HPLC-UV	RP-18 column (4.5 mm x 25 cm)	A: H ₂ O B: MeOH	0.2 nmol	[39]
<i>Triticum aestivum</i>	3-8	Ultrasonic extraction (MeOH/H ⁺) Filtration Evaporation Dissolved with H ₂ O/H ⁺ SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-MS	ODS pre-column (4 x 2 mm) Hypersil BDS C18 (2.50 x 2.1 mm)	A: H ₂ O/MeOH/HOAc B: MeOH/HOAc	NR	[60]
<i>Triticum aestivum</i>	1,4,5,6,8	Ultrasonic extraction (MeOH/H ⁺) Overnight cold extraction (4°C) Filtration Ultrasonic extraction (MeOH/H ⁺) Reconstitution (H ₂ O/MeOH/H ⁺) SPE clean-up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-DAD	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (2.50 x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (1% H ₃ PO ₄) B: CH ₃ CN (1% H ₃ PO ₄)	NR	[45]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3	Ultrasonic extraction (MeOH/H ⁺) Filtration	HPLC-UV	Metal free C18	A: H ₂ O B: MeOH (0.1%HOAc)	NR	[42]

<i>Triticum aestivum</i>	3-8	Ultrasonic extraction (MeOH/H ⁺) Filtration SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-MS	Hypersil BDS C18 (250 x 2.1 mm, 5 µm)	A: H ₂ O:MeOH (HOAc) B: MeOH (HOAc)	NR	[60]
<i>A. squarrosa</i> <i>A. fuscopunctata</i>	1,3,5,6	Extraction with MeOH Dilution with H ₂ O SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-LUV	Guard column (C18 Supelco) UltraSphere ODS C18 column (4.5 mm x 2.5 cm, 5 µm)	A: H ₂ O B: MeOH/iso-PrOH (95/5)	NR	[10]
<i>Triticum aestivum</i>	1-8	PLE extraction with MeOH/H ⁺ Filtration SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	LC-ESI-MS	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (250 mm x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (1% HOAc) B: MeOH (1% HOAc)	1-11 µg/g (foliage) 1-27 µg/g (root)	[43]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3-8	Freeze-dried Extraction by PLE SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HLC-DAD	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (250 mm x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (1% HOAc) B: MeOH (1% HOAc)	ND	7.76 ng/µL [23]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3-8	Freeze-dried Extraction by PLE SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-APCI-MS	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (250 mm x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (1% HOAc) B: MeOH (1% HOAc)	ND	4.29 ng/µL [23]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3-8	Freeze-dried Extraction by PLE SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-ESI-MS	Hypersil BDS C18 (250 mm x 2.1 mm, 5 µm)	A: H ₂ O - MeOH (1% HOAc) B: MeOH (1% HOAc)	ND	5.82 ng/µL [23]
<i>Triticum aestivum</i>	1,3-6	Freeze-dried Extraction by PLE SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-ESI-MS ²	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (250 mm x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (1% HOAc) B: MeOH (1% HOAc)	ND	4.80 ng/µL [23]
Degradation products in soil Agricultural soil	5,6, 9-15	PLE extraction with MeOH/H ⁺ Filtration SPE clean up (Sep-pack C ₁₈)	HPLC-ESI-MS ²	Synergi MAX-RP (C12 Phenomenex) (250 mm x 4.6 mm, 4 µm)	A: H ₂ O (1% HOAc) B: MeOH (1% HOAc)	2.4-21 ng/g	[48]

substances were obtained from natural sources. Hydroxamic acids (DIMBOA-Glc, HDMBOAGlc, HMBOAGlc, DIMBOA and HMBOA) could be isolated from maize plants [1,8,9]. Non-methoxy derivatives (DIBOAGlc, DIBOA and HBOA) could be obtained from *Aphelandra tetragona* roots [10] and rye seedlings [8]. The isolation procedure involved several steps. An extraction with ethyl acetate, and further purification of the organic phase with a silica-gel column yielded the aglucone derivatives. The glucoside compounds had been obtained by the extraction of the aqueous phase with *n*-BuOH and further purification on a column obtained pure compounds. Finally, heat treatment of the aglucones produced the benzoxazinone derivatives.

Besides the isolation of target compounds from natural sources, there are several synthetic methods to obtain benzoxazinone derivatives. The methods of synthesis started with the addition of a suitable chain to a functionalized phenol [11] followed by reductive cyclization conditions [12,13]. To obtain these compounds, it has become usual to use the reductive method involving sodium borohydride (NaBH₄) and palladium over charcoal suspended in aqueous dioxane. The lactol-deprotection step could be avoided by other methods [14–17], which have in common the oxidation of the heterocycle after its formation.

2.1.2. Aminophenoxazinones and malonamic acids. The first methodologies employed to synthesize aminophenoxazine derivatives were based on the dimerization of two phenol units to access the tricyclic structure [18–20], mainly dealing with the synthesis of APO.

The methoxy derivative (AMPO) has been obtained as a by-product in the search for organometallic reagents [20,21].

The direct acylation of aminophenols yielded the detoxification metabolites HPMa and HMPMA [22].

Novel methodologies were developed by Macias et al. [8]. A simple reductive method of 5-methoxy-2-nitrophenol using NaBH₄ and palladium over charcoal suspended in aqueous dioxane yielded AMPO. Then, acylation of AMPO with acetic anhydride in acidic media obtained AAMPO. The methods described are a very simple way of obtaining these chemicals, avoiding some of the inconvenience associated with their synthesis (e.g., use of organometallics).

2.1.3. Stability studies. The stability of target compounds during the analysis is an important issue to obtain reliable results. Eljarrat et al. [23] and Guillamon et al. [24] presented the stability of benzoxazinone derivatives and their degradation products, respectively. In both studies, the stability was tested with spiked acidic solutions stored during 7 days at three different temperatures (–20°C, 4°C and room temperature). Significant losses occurred when solution was stored at room

temperature and 4°C. At –20°C, HMBOA and DIMBOA were the most unstable compounds with ~20% degradation.

Regarding the stability of the degradation products, APO and AMPO were the more unstable compounds, with approximately 75–100% of degradation at –20°C after 7 days of storage. In view of these results, the correct storage of the standard solutions in acidic conditions at –20°C is useful to provide reliable results.

2.2. Sample preparation

2.2.1. Wheat samples. Most of the studies reviewed on the analysis of allelochemicals in plants were carried out on leaves, roots and seeds. In this sub-section, we briefly discuss the main sample-pre-treatment procedures applied to the determination of allelochemicals in wheat plants and the problems associated with low stability of the target analytes.

The presence of aglucones in intact plants has generated controversy for many years. When plant material is homogenized at room temperature, the glucosides present in plants are easily hydrolyzed to give the aglucones (DIMBOA and DIBOA), which are thermolabile and transformed to their corresponding benzoxazinones (MBOA and BOA) in neutral and alkaline media [1]. Different strategies could be applied depending on the compound that will be analyzed in plant samples (Table 1).

The first strategies involved hydrolysis of the glucosides and conversion of the aglucones to more stable benzoxazinones. As reported by Scim et al. [25], freezing followed by thawing released the enzymes and allowed them to catalyze the hydrolysis reaction. In this work, the use of more than one freeze-thaw treatment was evaluated and it was observed that more than one freeze-thaw treatment did not improve the yield of aglucones, as also observed by Garcia et al. [26].

Once the glucoside compounds are transformed to aglucones, the maceration of plant sample with water (H₂O) after incubation at room temperature and then heating the aqueous solution at high temperature formed benzoxazinones (MBOA and BOA). Next, the samples were centrifuged and extracted with dichloromethane (CH₂Cl₂) [25,27]. To diminish the presence of interferences in the analysis of benzoxazinones in plant samples, Scim et al. [25] performed several chromatographic separations before hydrolysis of the analytes, including the use of Celite 545 to remove the chlorophyll from tissue extracts. It is important to note that the hydrolysis reaction is not completely quantitative and depends on pH, temperature and composition of the reaction medium [28,29], so this analytical strategy could not be useful in quantifying the occurrence of the analytes in plants [27].

The second group of methodologies is based on quantifying hydroxamic acids as aglucones. The

glucosides were hydrolyzed on macerating the plant material with H₂O, and, in order to prevent degradation of aglucones to the corresponding benzoxazolinones, the pH was then adjusted to 3 with phosphoric acid (H₃PO₄) or hydrochloric acid (HCl). Afterwards, the extract was centrifuged and analyzed [30–32]. In several papers, the supernatant was then extracted with diethylether (Et₂O), dried and dissolved with an appropriate solvent before further analysis [26,33–38].

The third group of strategies prevented the enzymatic hydrolysis of the glucosides during extraction. As a result, the direct measurement of glucosides, aglucones and benzoxazolinones could be achieved. Several authors based their analysis on the stability of hydroxamic acids in aqueous solution [28], and the extraction of the analytes from plant samples was carried out using boiling methanol (MeOH) [39–41]. As was mentioned above, aglucones (DIBOA and DIMBOA) are known to be thermolabile and are transformed to benzoxazolinones in neutral and alkaline media.

In order to prevent the degradation of the aglucones, several authors have chosen weakly acidic MeOH as extraction solvent and achieved good recoveries [42–45]. Soak and ultrasonic extraction are the most traditional methods used for this purpose. Nakagawa et al. [42], examined the efficiency of the extraction at different temperatures using an ultrasonic generator; in this case, a low recovery of hydroxamic acids was obtained at higher temperature, probably because of thermal decomposition.

Villagrasa et al. developed a novel pressurized liquid extraction (PLE) method [43]. The amenability of the benzoxazinone derivatives to high temperature and pressure under PLE was tested. We achieved significant improvement in the extraction efficiency of the analytes tested by raising the extraction temperature [43].

Within European project FATEALLCHEM, a comparison study was carried out in order to evaluate two different extraction methodologies (Fig. 2a). Method 1 was based on a cool sonication extraction [45] and, in Method 2, the analytes were extracted by PLE at 150°C [43].

As can be observed in Fig. 2b, the sonication extraction degraded the glucoside compound (Dimboa-β-D-glucoside) leading to higher values of the corresponding aglucone (DIMBOA), while, using PLE, the glucoside compound could be detected. Nevertheless, the total amount of the benzoxazinone detected was similar using both approaches. Results showed that extraction technique is a determinant in the analysis of benzoxazinone derivatives, so sample manipulation is a very important step in the analysis of these compounds.

2.2.2. Soil samples. The great majority of papers reviewed identified the degradation products from studies carried out in the laboratory by combining soil samples

with stock solutions of the substrate to be degraded [6,46,47]. For this purpose, the soil was incubated at different temperatures in the dark. After a period of days, soil samples were taken for the extraction of the target compounds.

Gagliardo et al. [46] studied the degradation of BOA in non-sterile and autoclaved soil at 28°C. After 10 days, an extraction was performed with MeOH. The authors identified a red pigment produced from BOA by non-sterile soil as 2-amino-3H-phenoxazin-3-one (APO), but this compound was not present in sterile soil. They proposed that the probable route of transformation of BOA is its hydrolysis to 2-aminophenol, followed by oxidation to aminophenoxazinone. The authors concluded that formation of the intermediate 2-aminophenol was a microbial process, while chemical oxidation of the intermediate to APO in soil could occur as a microbial process in the presence of air.

Kumar et al. [47] performed a similar study showing the transformation of MBOA to AMPO in soil.

Another study [6] determined the transformation products of BOA in soil at two different concentrations. In this case, the soil samples incubated with BOA were extracted with acidified MeOH by PLE and then analyzed without prior purification. Several metabolites (e.g., APO and AAPO) occurred in the experiments using BOA at high concentrations.

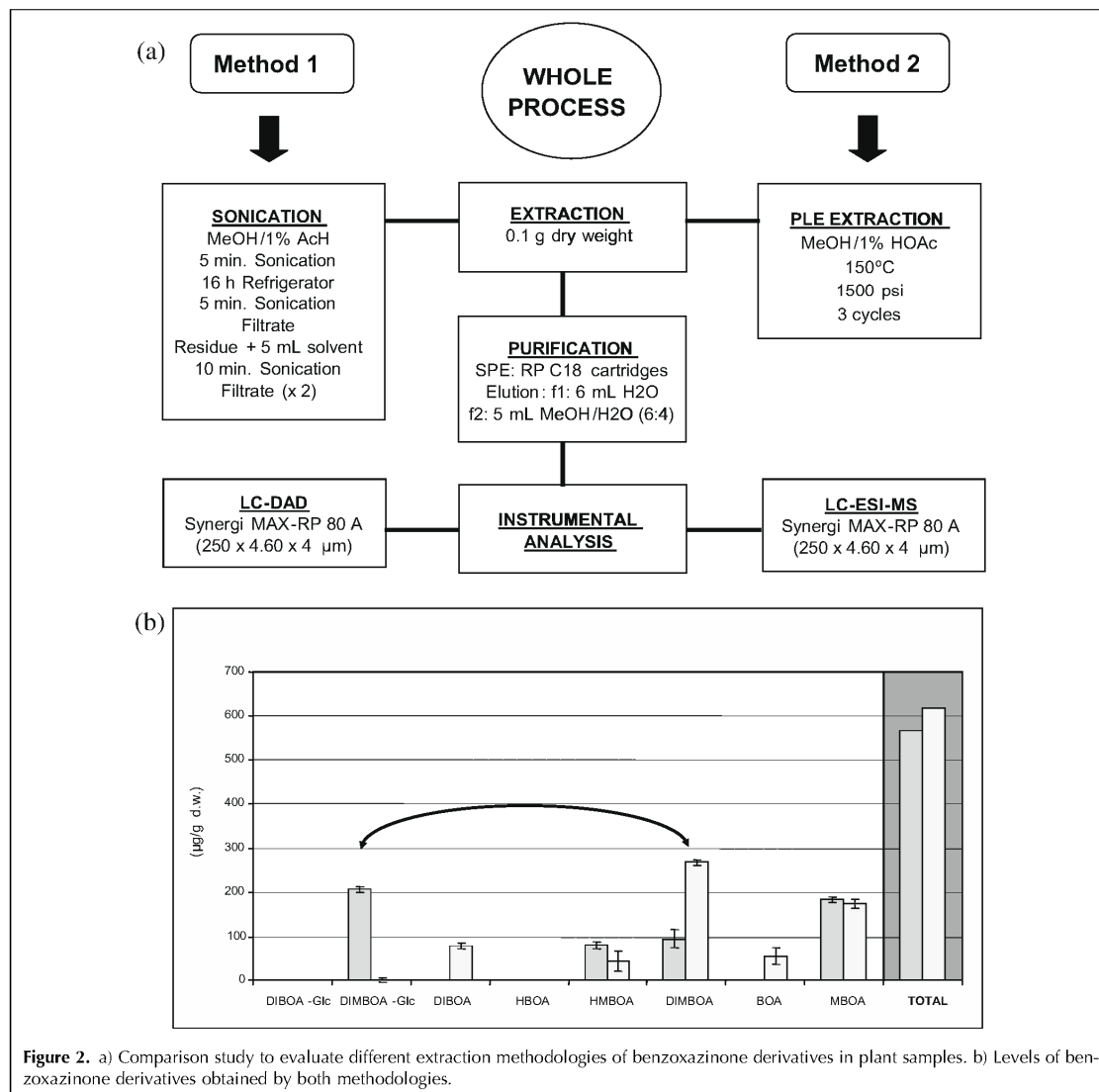
Only the previous work of Villagrasa et al. [48] reported information about the sample-preparation steps for the determination of allelochemicals in cultivated soil samples (field studies). In this work, benzoxazolinones, aminophenoxazinones, malonic acids, and acetamides were analyzed in different cultivated soil samples. For this purpose, a rapid and simple analytical method was developed. The analytes were extracted from 5 g of soil with acidified MeOH (1% HOAc) by means of PLE. A simple purification step after extraction was performed using LiChrolut RP C₁₈ SPE cartridges (Table 1).

2.3. Instrumental determination

The first studies of separation and identification of allelopathic compounds were based on techniques such as thin-layer chromatography (TLC) [26] and column chromatography, but these methods are characterized by their low separation power [36].

Spectrophotometric and colorimetric methods based on formation of blue complexes between hydroxamic acids and ferric chloride have been extensively used [30,33,35]. Nevertheless, due to the non-specific nature of the colorimetric reaction of Fe(III), this methodology does not distinguish between different hydroxamic acids in the extract.

In recent years, more selective and sensitive techniques for the analysis of benzoxazinone compounds were developed. GC-MS, LC-UV and LC-MS or LC-MS² are the most widely used.



2.3.1. Gas-chromatography methods. GC-MS is a selective, sensitive, cost-effective and suitable analytical technique for separation and quantification of a mixture of numerous compounds for routine environmental analysis. The works reviewed focused their analysis on the phenolic compounds [37,49,50]. In practice, there have been few studies reporting the application of GC-MS to identifying benzoxazinone derivatives [51,52]. A derivatization step of the analytes is needed because underivatized analytes have relatively low volatility and are not suitable for direct capillary GC analysis. Derivatization is generally performed with N-methyl-N-(tri-

methylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and aims at increasing volatility and thermal stability of the target compounds [36,37,49,50,52]. The published methods report GC-MS identification based on electron-impact (EI) ionization and single-quadrupole MS or MS² as the detection system.

As Wu et al. reported [36], due to the complexity of the sample matrix, some analytes could present strong co-elutions with background substances and, in this case, GC-MS was not a useful technique to obtain an accurate quantification of the analytes. In order to improve the selectivity of the method, GC-MS² analysis was

developed by the same authors [36]. The signal-to-noise ratios for all compounds were improved, obtaining under MS² conditions ratios for phenolic acids and DIMBOA up to 50 and 5 times higher, respectively, than under MS conditions.

2.3.2. Liquid-chromatography methods. According to the literature reviewed, LC separation of the benzoxazinone derivatives has been mainly carried out with C₁₈ columns.

Lyons et al. [38] used an Ultrasphere ODS-C₁₈ column in order to separate glucosides, aglycones and benzoxazolinones, but the chromatogram obtained presented an overlap between peaks of the glucoside and the corresponding aglycones. To perform simultaneous analysis of these compounds, Nakagawa et al. [42] proved the efficacy of a metal-free ODS C₁₈ column by improving on the results obtained by Lyons et al. [38].

The use of ordinary ODS columns would be useful for the analysis of glucosides (DIMBOA-Glc and DIBOA-Glc) [38] or aglycones and benzoxazolinones [53] separately. Nevertheless, Cambier et al. [41] analyzed different glucosides with the same column as Lyons et al. [38] and two of the glucosides analyzed (Dimboa-glc and Dim₂boa-glc) co-eluted.

Baumeler et al. [10] used the Nucleosil 100-7 C₁₈ and 100-5 C₁₈ columns, achieving good separation of the hydroxamic acids (DIBOA-Glc and DIMBOA-Glc), their aglycones (DIBOA and DIMBOA), the lactams (HBOA and HMBOA) and the corresponding benzoxazolinones (BOA and MBOA).

Zuñiga et al. [35] separated the glucosides and their corresponding aglycones using an RP-C₁₈ column. In order to solve some problems related to low stability of the analytes on the column, Bonnington et al. [54] tested different LC columns (e.g., Lichrocart C₁₈, Nucleosil C₁₈, Ultracarb C₃₀ and Synergi MAX-RP C₁₂ LC), the last of which presented improved separation, peak shape and column stability, and minimized matrix interference. According to the authors, the use of the Synergi Max-RP column reduced undesired interactions of the basic analytes with the bonded phase and reduced tailing and analyte degradation. Furthermore, compatibility with acidic solvents over a broad pH range eliminated the problems with column stability under the acidic conditions required for hydroxamic-acid analysis.

Regarding mobile phases, mixtures of H₂O (solvent A), often modified with acid (HoAc, or H₃PO₄) or buffer solutions (Na₂HPO₄) and MeOH (solvent B), have usually been used to improve LC separation and MS sensitivity. Baumeler et al. [10] investigated the composition of the mobile phase and obtained the best results replacing methanol by a higher alcohol (isopropanol) and adding acid to the alcoholic phase.

Several procedures were developed for the detection of benzoxazinone derivatives in plant extracts during the 1980s and the 1990s. LC in combination with

diode-array detection (DAD) was the technique most widely used for the analysis of benzoxazinoids in plant tissues. The target compounds have similar, but distinct, UV spectra and presented maxima absorbance at different wavelengths. Due to the complexity of the samples, it is possible that the presence of some compounds in the matrix interferes with analyte determination. Nowadays, the sensitivity and the specificity of the LC-UV methods could be enhanced using more specific techniques (e.g., LC-MS and LC-MS²). However, even working in LC-MS², certain compounds present in the sample can affect the initial ionization of the analyte through what is often called ion suppression or enhancement. The characterization of the matrix effects of eight selected benzoxazinone derivatives in the foliage and the roots of wheat plants using LC-MS and the methods to overcome the effect have been described [55]. For this purpose, two different methods were applied: use of an internal standard and extract dilution. Due to the difficulty in obtaining isotopically-labeled internal standards of benzoxazinone derivatives, dilution of the extract was the most appropriate method. Optimal dilutions were achieved at 5 and 10 times for extracts of root and foliage, respectively.

The interfaces most widely used in LC-MS or LC-MS² are atmospheric pressure ionization (API) sources, electrospray ionization (ESI) and atmospheric chemical ionization (APCI). Today, it is widely accepted that APCI is less susceptible to matrix effects than ESI because the ionization takes place in the gas phase. Nevertheless, ESI operating in negative-ion (NI) mode has been the technique most widely used for analysis of benzoxazinone derivatives.

In a previous work [43], LC-MS techniques using ESI and APCI were tested in the analysis of benzoxazinone derivatives. For all analytes, a significant improvement of sensitivity was observed working in ESI mode. The glucoside compounds were not detected by APCI, so ESI conditions are mandatory for the determination of these analytes.

Cambier et al. [56] reported a qualitative MS² characterization of glucosylated derivatives using APCI in NI mode. However, Bonnington et al. [54] developed an LC-MS² method using ESI in NI mode, which offered significant improvements in terms of sensitivity and selectivity and diminished the matrix effects associated with the more conventional techniques.

Regarding LC-MS² analysis, it would be ideal to obtain unique transitions for each compound in order to avoid interference caused by other possible co-eluting compounds. However, because benzoxazinone derivatives presented a similar fragmentation pattern, this was not possible, and, in this case, generic transitions were selected [54].

Nevertheless, it is useful to identify the presence of other potentially derivatives. The methoxylated

derivatives presented transitions involving the loss of a methoxy radical and subsequently a CO moiety, whereas the losses of 2 CO moieties and CO₂ corresponded to the common fragmentations of non-methoxylated derivatives.

In order to characterize fragmentation patterns of benzoxazinone derivatives reliably, Bonnington et al. [57] used electrospray time-of-flight MS (QqTOF). From this work, a generic fragmentation pattern of benzoxazinone derivatives was deduced. Moreover, low stability of hydroxamic acids (DIBOA and DIMBOA) was observed in the mass spectrometer. As a result, the [M-H]⁻ ions presented weak responses and strong fragmentation was observed. By contrast, the benzoxazolinone derivative (BOA) showed higher stability and weak fragmentation. The main advantages of QqTOF instruments are:

- (1) the ability to perform accurate product-ion mass scans; and,
- (2) the accurate information provided regarding molecular formulae and consequently the structures of the observed ions.

QqTOF instruments also help to avoid false-positive results in target analysis and reliably identify unknown compounds [58]. Nevertheless, QqTOF technique presented lower sensitivity and lower linear dynamic range than triple-quadrupole (QqQ) instruments [59].

As regards instrumental analysis of the degradation products of benzoxazolinones, LC-MS analysis is performed, but only as a complementary identification technique for biotransformation products of several benzoxazolinones. Only the works of Guillamon et al. [24] and Villagrasa et al. [48] have described an analytical strategy for their determination. The separation of aminophenoxazines, malonic acids and benzoxazolinones was achieved using a synergi MAX-RP 80A column and acidified H₂O and MeOH as a mobile phase.

2.4. Quality assurance and quality control

Quality assurance of the instrumental method could be evaluated by measuring particular parameters [e.g., sensitivity, selectivity and precision (repeatability and reproducibility)].

2.4.1. Sensitivity. The sensitivity of an analytical method is normally determined by means of a limit of detection (LOD) and a limit of quantification (LOQ). LODs and LOQs are based on the peak-to-peak noise of the baseline near the analyte peak obtained by the analysis of standard solution (LODinst and LOQinst) and spiked real samples (LODmet and LOQmet) on minimal value signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. The LODinst obtained using different techniques have been reported by several authors [23,32,34,38] but they did not explain the way of obtaining them (Table 1).

In order to check the instrumental approaches used for the analysis of benzoxazinone derivatives, Eljarrat

et al. [23] performed an interlaboratory study. Six laboratories took part in the exercise and different instrumental techniques (e.g., LC-DAD, LC-MS and LC-MS²) were compared in terms of selectivity and sensitivity. The work showed that LC-DAD had a lower sensitivity than LC-MS and LC-MS² (Table 1). The compounds HBOA and DIMBOA could be detected by MS only. The study involved the analysis of seven benzoxazinones in two standard solutions and one purified extract of a plant root. This work concluded that LC-MS and LC-MS² are the more sensitive techniques for the determination of benzoxazinone derivatives in plant material.

LODmet and LOQmet vary significantly with the type of matrix and should be determined with not only standard solutions but also real samples. Only a few authors have reported the sensitivity of the methodologies applied in their studies. Bonnington et al. [54] presented LODmet in the range between 0.1–1.1 µg/g. The methodology developed (LC-MS²) was 50–500 times more sensitive than other studies (UV) [32,34]. The sensitivity was also evaluated by Villagrasa et al. [43], who obtained values of LODmet and LOQmet for foliage and root samples (Table 1). The methodology applied to foliage produced LODmet and LOQmet values in the range 1–11 µg/g and 3–37 µg/g, respectively. The methodology applied to root samples provided LODmet in the range 1–27 µg/g and LOQmet in the range 3–89 µg/g.

For aminophenoxazinone derivatives, using a single LC-MS method [24], LODinst was at the ng level, whereas, with LC-ESI-MS² [48], LODinst decreased to the pg level, allowing quantitation of the degradation products in field samples. Only two works have reported LODmet. Values of LODmet achieved by Gents et al. were in the range 9–35 ng/g. These values were lower than those obtained by Villagrasa et al. [48], who obtained LODmet in the range 2.4–21 ng/g of dry weight.

2.4.2. Selectivity. The capacity of methods to provide an accurate answer in the presence of potential interferences is related to the selectivity of the methodologies developed. Eljarrat et al. [23] observed the poor selectivity of LC-DAD technique. Several co-elutions were detected when plant material was analyzed by LC-DAD. HMBOA was the analyte most affected. The calculated concentration with DAD was 7.8 ng/µL, whereas 0.6 ng/µL was the concentration of HMBOA estimated using LC-MS.

2.4.3. Precision (repeatability and reproducibility). Precision is the capacity of the methodology to give comparable results in different measurements realized in the same conditions. The two components of precision are repeatability and reproducibility and these values are reported as standard deviation (SD) or relative standard deviation (RSD).

Method precision (%RSD) was checked by Bonnington et al. [54] by analyzing one foliage sample in triplicate: results varied between 1.74% for HMBOA and 17.35% for DIMBOA.

Villagrasa et al. [43] tested the reproducibility of the method developed with spiked methanol, foliage and root samples in triplicate. The RSD was always below 15%, indicating good reproducibility of the methodology applied.

The method reproducibility was also checked by Villagrasa et al. [48] in the analysis of benzoxazinone in soils, obtaining RSD with spiked samples in quintuplicate below 14%, again indicating good reproducibility of the method.

3. Conclusions

We have presented an overview of analytical strategies to determine benzoxazinone derivatives in plant tissues and their degradation products in agricultural soil.

Some problems (e.g., the availability of standard compounds, their low stability and matrix interferences) make difficult reliable analysis and imply that these analytes are strongly dependent on the working procedures adopted.

Different sample-preparation strategies can be applied, depending on the compound to be analyzed:

- the first strategy degrades glucoside compounds to aglucones and assumes that the decomposition of aglucones to benzoxazolinones is quantitative, so the determination of benzoxazolinones is carried out as a measure of the original concentration of glucoside; and,
- the second strategy prevents degradation of aglucones to benzoxazolinones, so that direct measurement of the target compounds can be achieved.

During the 1980s and 1990s, LC-UV detection was the most widely applied technique for analysis of benzoxazinone derivatives. LC-MS has been developed in order to enhance the sensitivity and the selectivity of LC-UV methods.

There is less information available on the analysis of benzoxazolinones and their degradation products in soil. Recently, a novel method was developed, allowing the determination and the quantification of benzoxazolinones and their degradation products in soil samples. The application of LC-MS² analysis operating in MRM mode improved on the sensitivity of a previous LC-MS method.

Little information has been reported about the quality assurance of the methodologies developed. The objective of validation of an analytical method is to demonstrate that the procedure, when correctly applied, produces results that are fit for purpose. Sensitivity has been estimated as LODinst in MeOH, but, more rarely, in real

matrices (LODmet). Selectivity has been studied little, and only one paper has referred to the accuracy of the method. Generally, precision of the method was evaluated as reproducibility.

References

- [1] O. Whalroos, I. Virtanen, *Acta Chem. Scand.* 13 (1959) 1096.
- [2] F.A. Macias, A. Oliveros-Bastidas, D. Marin, D. Castellano, A.M. Simonet, J.M.G. Molinillo, *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 6402.
- [3] F.A. Macias, A. Oliveros-Bastidas, D. Marin, D. Castellano, A.M. Simonet, J.M.G. Molinillo, *J. Agric. Food. Chem.* 53 (2005) 554.
- [4] M. Zikmundova, K. Drandarov, L. Bigler, A. Hesse, C. Werner, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 4863.
- [5] E. Eljarrat, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 584.
- [6] M.B. Gents, A.G. Mortensen, S.T. Nielsen, C. Christoffersen, I.S. Fomsgaard, *Chemosphere* 61 (2005) 75.
- [7] D. Sicker, H. Hartenstein, M. Kluge, *Recent Res. Dev. Phytochem.* 1 (1997) 203.
- [8] F.A. Macias, D. Marin, A. Oliveros-Bastidas, D. Chinchilla, A.M. Simonet, J.M.G. Molinillo, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 991.
- [9] E. Larsen, L. Christensen, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000) 2556.
- [10] A. Baumeler, M. Hesse, C. Werner, *Phytochemistry* 53 (2000) 213.
- [11] E. Honkanen, A.I. Virtanen, *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 504.
- [12] J.L. Jernow, P. Rosen, 2H-1, 4-Benzoxazin-3(4H)-ones, US Patent 3862180, 1975.
- [13] R.T. Coutts, K.W. Hindmarsh, *Can. J. Pharm. Sci.* 1 (1966) 11.
- [14] S.A. Matlin, P.G. Sammes, R.M. Upton, *J. Chem. Soc.* 10 (1979) 2481.
- [15] D. Sicker, H. Hartenstein, *Synthesis* (1993) 771.
- [16] D. Sicker, B. Prätorius, G. Mann, L. Meyer, *Synthesis* (1989) 211.
- [17] H. Hartenstein, D. Sicker, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 4335.
- [18] F. Kehrman, *Chem. Ber.* 39 (1906) 134.
- [19] Z. Szvevényi, E. Milaeva, L. Simandi, *J. Mol. Catal.* 67 (1991) 251.
- [20] R.G. Buckley, J. Charalambous, K. Henrick, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 38 (1982) 289.
- [21] J. Charalambous, M. Kensett, J. Jenkins, *J. Chem. Soc.* 12 (1977) 400.
- [22] A. Friebe, V. Vilich, L. Hennig, M. Kluge, D. Sicker, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 2386.
- [23] E. Eljarrat, M. Guillamon, J. Seuma, B. Bugel, I. Formsgaard, W. Oleszek, A. Stochmal, O. Shakaliene, D. Barceló, *J. Chromatogr., A.* 1047 (2004) 69.
- [24] M. Guillamon, M. Villagrasa, E. Eljarrat, D. Barceló, *J. Chromatogr., A.* 1052 (2004) 53.
- [25] A.J. Scism, J.N. Bemiller, A.L. Caskey, *Anal. Biochem.* 58 (1974) 1.
- [26] C. Garcia, S. Garcia, H. Heinzen, P. Moyna, H.M. Niemeyer, *Phytochem. Anal.* 9 (1998) 278.
- [27] C.S. Tang, S.H. Chang, D. Hoo, K.H. Yanagihara, *Phytochemistry* 14 (1975) 2077.
- [28] M.D. Woodward, L.J. Corcuera, J.P. Helgeson, C.D. Upper, *Plant Physiol.* 61 (1978) 796.
- [29] H.R. Bravo, H.M. Niemeyer, *Heterocycles* 24 (1986) 335.
- [30] H.M. Niemeyer, E. Pesel, S.V. Copaja, H.R. Bravo, S. Franke, W. Francke, *Phytochemistry* 28 (1989) 447.
- [31] E. Gianoli, M. Hermann, H.M. Niemeyer, *J. Chem. Ecol.* 23 (1997) 543.
- [32] S.V. Copaja, D. Nicol, S. Wratten, *Phytochemistry* 50 (1999) 17.
- [33] V.H. Argandona, H.M. Niemeyer, L.J. Corcuera, *Phytochemistry* 20 (1981) 673.
- [34] G.E. Zuniga, S.V. Copaja, H.R. Bravo, V.H. Argandona, *Phytochemistry* 29 (1990) 2139.

Trends

- [35] G.E. Zuniga, V.H. Argandona, H.M. Niemeyer, L.J. Corcuera, *Phytochemistry* 22 (1983) 2665.
- [36] H.W. Wu, T. Haig, J. Pratley, D. Lemerle, M. An, *J. Chromatogr., A* 864 (1999) 315.
- [37] H.W. Wu, T. Haig, J. Pratley, D. Lemerle, M. An, *J. Chem. Ecol.* 26 (2000) 2141.
- [38] P.C. Lyons, J.D. Hipskind, K.V. Wood, R.L. Nicholson, *J. Agric. Food. Chem.* 36 (1988) 57.
- [39] G.E. Zuniga, F. Massardo, *Phytochemistry* 30 (1991) 3281.
- [40] V. Cambier, T. Hance, E. de Hoffmann, *Phytochem. Anal.* 10 (1999) 119.
- [41] V. Cambier, T. Hance, E. de Hoffmann, *Phytochemistry* 53 (2000) 223.
- [42] E. Nakagawa, T. Amano, N. Hirai, H. Iwamura, *Phytochemistry* 38 (1995) 1349.
- [43] M. Villagrasa, M. Guillamon, E. Eljarrat, D. Barcelo, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 1001.
- [44] A. Oikawa, A. Ishihara, M. Hasegawa, O. Kodama, H. Iwamura, *Phytochemistry* 56 (2001) 669.
- [45] A. Stochmal, J. Kus, S. Martyniuk, W. Oleszek, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 1016.
- [46] R.W. Gagliardo, W.S. Chilton, *J. Chem. Ecol.* (1992) 1683.
- [47] P. Kumar, R.W. Gagliardo, W.S. Chilton, *J. Chem. Ecol.* 19 (1993) 2453.
- [48] M. Villagrasa, M. Guillamon, E. Eljarrat, D. Barcelo, *J. Chromatogr., A* 1179 (2008) 190.
- [49] H. Wu, T. Haig, J. Pratley, D. Lemerle, *J. Agric. Food. Chem.* 49 (2001) 3742.
- [50] H. Wu, T. Haig, J. Pratley, D. Lemerle, M. An, *J. Chem. Ecol.* 27 (2001) 125.
- [51] H. Wu, J. Pratley, D. Lemerle, T. Haig, *Weed Res.* 39 (1999) 171.
- [52] M. Finney, D. Danehower, J. Burton, *J. Chromatogr., A* 1066 (2005) 249.
- [53] Y.S. Xie, A.J. Atkinson, J.T. Armason, P. Morand, B.J.R. Philogene, *J. Chromatogr., A* 543 (1991) 389.
- [54] L. Bonnington, E. Eljarrat, M. Guillamon, P. Eichhorn, A. Taberner, D. Barcelo, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3128.
- [55] M. Villagrasa, M. Guillamon, E. Eljarrat, D. Barcelo, *J. Chromatogr., A* 1157 (2007) 108.
- [56] V. Cambier, T. Hance, E. Hoffmann, *Phytochem. Anal.* 10 (1999) 119.
- [57] L. Bonnington, D. Barceló, T. Knepper, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 1054.
- [58] M. Petrovic, D. Barcelo, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1259.
- [59] J. Van Bocxlaer, S. Van de Castele, C. Van Poucke, C. Van Peteghem, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 65.
- [60] B.B. Mogensen, T. Krongaard, S.K. Mathiassen, P. Kudsk, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 1023.

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009

I.7. Estat de l'art de les metodologies d'anàlisi des del 2009 al 2013

L'article #1 recull una revisió de les diferents metodologies descrites en bibliografia fins l'any 2009. A continuació es fa un recull dels nous treballs trobats en bibliografia des de l'any 2009 al 2013. A la Taula I.4 es troba un resum de les metodologies descrites en aquest període. A continuació es fa un breu resum.

I.7.1. Anàlisi de benzoxazinones i els seus derivats en plantes

Entre els treballs descrits en bibliografia per a l'anàlisi dels derivats de les benzoxazinones a partir del 2009, es troben metodologies similars a les descrites anteriorment, on depenent del compost a analitzar s'aplica un mètode de preparació de la mostra diferent. Així doncs, es troben articles com el de Prinz et al. [188] on analitzen els àcids hidroxàmics DIMBOA i DIBOA forçant la hidròlisi enzimàtica dels precursors glucosats tractant les mostres amb H₂O durant 15 min a temperatura ambient, per tal que aquests siguin transformats a les corresponents aglucones, seguidament es fa l'ajust del pH a 3 amb HCl i una extracció líquid-líquid amb èter etílic. Zohu et al [189] du a terme l'anàlisi de DIMBOA fent l'extracció a l'ultrasons amb MeOH a 25⁰C, posteriorment l'extracte és purificat a través de SPE i els compostos són eluïts amb MeOH acidificat (1% HOAc). En contraposició, el treball de Elek et al. [190] evita la degradació dels compostos glucosats conservant les mostres a -80⁰C i duent a terme l'extracció a l'ultrasons amb MeOH acidificat (2% HOAc) i posteriorment centrifuga l'extracte durant 10min a 21.465g. En el treball de Rice et al [191] duen a terme l'extracció de diferents benzoxazinones en mostres de sègol seguint un procediment similar al desenvolupat en la present tesi. Les mostres s'extreuen a través de la tècnica de líquids pressuritzats amb una mescla de MeOH:H₂O:HOAc (80:19:1) i els extractes són evaporats sense cap etapa de purificació.

Cal destacar l'augment de treballs dedicats a l'anàlisi de les llavors de cereals, ja que cada cop més s'està intentant fer una valoració dels potencials efectes que podrien tenir aquests compostos des del punt de vista de la seguretat alimentària. D'aquesta manera

s'han trobat descrits treballs en els que duen a terme una anàlisi del perfil metabòlic de llavors de blat i sègol [192, 193]. El tractament de la mostra per a la determinació dels diferents metabòlits és més tediós, on es duen a terme diferents etapes d'extracció. L'anàlisi qualitativa duta a terme per Hanhineva et al. [192] en la caracterització dels diferents metabòlits de les benzoxinones es va aplicar a mostres de grans sencers de sègol, en diferents fraccions de segó de sègol i en grans de blat. Per als grans de sègol, aquests es van moldre en pols fina amb nitrogen líquid. L'extracció la duen a terme a l'ultrasons amb MeOH/H⁺. Posteriorment les mostres es centrifuguen, es filtren i es conserven a -20⁰C fins la seva anàlisi. Per a les mostres de segó de sègol, s'extrudeixen i s'hidrolitzen per tractament amb xilanasa, per tal d'alliberar els components de la matriu de segó. Un 10% de la suspensió aquosa del segó de sègol extruït es sotmet amb l'enzim de xilanasa durant 21 h a 12-16⁰C seguit de la separació de la fase extraïble (aquosa) i no extraïble (residu) per centrifugació. Addicionalment, els metabòlits de la fase aquosa es purifiquen a través d'una columna cromatogràfica (Amberlite XAD 8 HP) i s'elueixen amb etanol. Posteriorment ambdues fraccions es liofilitzen i es conserven a -80⁰C. L'extracció dels metabòlits de la fracció extraïble del segó de sègol es dissol directament amb MeOH:H₂O (75:25), mentre que la fracció seca s'hidrolitza amb hidròxid de sodi, s'incuba a 70⁰C, s'ajusta el pH a 1-2 amb HCl, s'extreu la mostra amb acetat d'etil, s'asseca sota buit, es re dissol amb MeOH i es filtra abans de la seva anàlisi. En l'estudi de Mathews et al. [193] es du a terme l'extracció dels metabòlits presents en una col·lecció de grans de blat pertanyents a diferents classes genètiques. El procediment aplicat per a l'extracció dels metabòlits és més senzilla. En aquest cas es basa en l'extracció a l'ultrasons amb etanol seguit d'una centrifugació de l'extracte obtingut. Per altra banda, en el treball de Tanwir et al. [194] analitzen tant el gra sencer com diferents parts del gra realitzant l'extracció per líquids pressuritzats. Cal destacar que en aquest treball també realitzen un estudi de comparació entre diferents tractaments anteriors a l'extracció per PLE i la seva influència en el contingut de diferents derivats de benzoxazinones. El primer tractament consisteix en posar en remull les mostres en H₂O a temperatura ambient durant 6 h, mentre que en el segon es sotmet la mostra en aigua bullent durant 15 min. Segons els resultats obtinguts, el primer tractament dona lloc a una major degradació de la di-

hexosa del Dibo-a-Glc donant lloc a Dibo-a-Glc a majors concentracions que sotmetent les mostres en aigua bullent.

L'anàlisi quantitativa dels compostos objectiu es du bàsicament a través de la LC-UV [188-190]. En contraposició, els treballs de Tanwir et al. i Rice et al. [191, 194] fan ús de la LC-MS/MS. Per a l'anàlisi metabòlic de les mostres s'utilitza la UPLC-qTOF-MS. La separació cromatogràfica es du a terme principalment amb columnes C-18 i les fases mòbils usades consten de mescles d'aigua (solvent A) i MeOH o ACN (solvent B) modificades amb àcid (HOAc o HCOOH) en percentatges que oscil·len del 0.1 al 10%.

I.7.2. Anàlisi de benzoxazolinones i els seus productes de degradació en el sòl agrícola

Mentre que la gran majoria de treballs descrits en bibliografia han estat destinats a determinar les rutes de degradació de les benzoxazolinones en estudis de laboratori, n'hi ha pocs que estiguin orientats a la identificació i quantificació dels compostos de degradació en la rizosfera del sòl. En els darrers anys s'han trobats descrites noves metodologies d'anàlisi per a la identificació i quantificació dels compostos de degradació de les benzoxazolinones en el sòl agrícola.

En treball de Chen et al. [195] duen a terme la quantificació de les benzoxazolinones MBOA i DIMBOA presents en el sòl agrícola en diferents varietats de blat, prenent de referència el treball desenvolupat en la present tesi. En aquest treball duen a terme l'extracció de les mostres liofilitzades amb MeOH i EtOAc seguit d'una centrifugació i purificació dels extractes a través de SPE. En l'estudi de Rice et al, per tal de determinar la concentració de benzoxazolinones i els seus derivats en sòl tractat amb residus de sègol, duen a terme l'extracció de les mostres amb aigua acidificada. Posteriorment fan una extracció líquid-líquid amb acetat d'etil, seguit d'una centrifugació de l'extracte, evaporació fins a sequedat i reconstitució amb MeOH:H₂O (1:1). El darrer treball publicat l'extracció dels sòls es du a terme mitjançant una extracció líquid-líquid amb MeOH/Me₂CO seguit d'una etapa de purificació de l'extracte per SPE.

Pel que respecte a la determinació i quantificació d'aquests compostos, l'anàlisi es du a terme a través de la LC-MS/MS en els treballs de Chen et al. [195] i Rice et al. [191, 195], mentre que Li et al. la du a terme a través de la LC-UV. La separació cromatogràfica es du a terme amb columnes C-18 i les fases mòbils usades consten de mesclades d'aigua (solvent A) i MeOH o ACN (solvent B) modificades amb àcid (HOAc o HCOOH) en percentatges que oscil·len del 0.1 al 10%.

Taula I.4.- Condicions experimentals descrites en els diferents treballs en l'anàlisi de compostos al·lelopàtics

Anàlisi de benzoxazinones en mostres de blat			
Mostra	Tractament	Anàlisi Instrumental	Ref.
Llavors blat i sègol	Gra sencer: Homogenització Extracció per PLE (MeOH:H ₂ O:H ⁺) (80:18:1) Aliments sègol: Remull en H ₂ O a T ^{amb} o en ebullició Extracció per PLE (MeOH:H ₂ O:H ⁺) (80:18:1)	LC-MS/MS Columna Phenomenex Synergi polar (250x2 mm id, 4µm)	[194]
Fulles de blat	Homogenització N ₂ líquid Sonicació amb MeOH:H ⁺ (98:2) Centrifugació	LC-UV Columna Hypersil C18 A: H ₂ O B: MeOH/H ⁺ (0.025%)	[190]
Brots de blat	Homogenització amb N ₂ líquid Hidròlisi enzimàtica amb H ₂ O Ajust del pH amb HCl Filtració Extracció líquid-líquid amb Dietilèter Evaporació Reconstitució amb MeOH	LC-UV Columna Lichrosphere RP-18 (250x4 mm id, 5µm) A: H ₂ O/H ⁺ (10% HOAc) B: MeOH	[188]
Triticum aestivum	Liofilització Sonicació amb MeOH Evaporació Reconstitució amb MeOH:H ₂ O (60:40) al 0.05% HOAc Neteja extracte per SPE (Sep-Pak C18) Elució amb MeOH/H ⁺ (1%)	LC-UV Columna Hypersil C18 (150 mm x 4.6 mm, 5µm) A: H ₂ O/H ⁺ (0.5%) B: MeOH/H ₂ O (70:30)	[189]
Llavors de blat Triticum aestivum	Sonicació amb Etanol Centrifugació	UPLC-qTOF-MS Columna UPLC BEH C18 (100 mm x 1 mm, 1.7µm) A: MeOH/H ₂ O (70:30) B: MeOH/H ⁺ (0.1 %HCOOH)	[193]
Anàlisi de benzoxazinones i els seus derivats en mostres de sòl			
Mostra	Tractament	Anàlisi Instrumental	Ref.
Sòl cultivat amb blat	Liofilització Extracció MeOH i EtOAc, 4h, 25 ^o C Neteja extracte per SPE (Sep-Pack C18) Elució amb MeOH (1%HOAc)	UPLC-MS/MS Columna UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.7µm) A: H ₂ O/H ⁺ (0.2%HOAc) B: MeOH	[195]
Sòl tractat amb residus de sègol	2g sòl amb H ₂ O/H ⁺ (1% HOAc) Extracció líquid-líquid EtOAc Centrifugació Evaporació Reconstitució MeOH:H ₂ O (1:1)	LC-MS/MS A: H ₂ O:ACN/H ⁺ (70:30, 1%HOAc) B: H ₂ O	[191]
Sòl cultivat amb blat	Extracció Líquida amb MeOH/Me ₂ CO (3:5, v/v), 6h T ^{amb} ambient Centrifugació 1200g durant 10 min Neteja extracte per SPE (Sep-Pack C18) Elució amb MeOH/H ₂ O (50:50) i MeOH	UPLC-MS/MS Columna UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.7µm) A: H ₂ O B: ACN	[196]

I.8. OBJECTIUS GENERALS

Tenint en compte tot el que s'ha exposat anteriorment, i amb el principal objectiu d'aportar noves metodologies per a l'anàlisi de compostos al·lelopàtics en mostres de blat i els seus productes de degradació en el sòl agrícola, es van establir els següents objectius generals per a la present tesi:

- 1.- Desenvolupar i validar metodologies d'anàlisi sensibles i selectives, que permetin la determinació simultània d'àcids hidroxàmics i els seus derivats en plantes de blat.
- 2.- Desenvolupar metodologies d'anàlisi, fins al moment inexistents, per als productes de degradació de les benzoxazolinones en sòl agrícola.
- 3.- Aplicar les metodologies desenvolupades per la identificació i quantificació de la quantitat de compostos al·lelopàtics en blat de diferents varietats, cultivats sota diferents condicions climàtiques, ambientals (Dinamarca i Catalunya) i en diferents sistemes de cultiu (convencional i orgànic).
- 4.- Identificar per primera vegada els productes de degradació en mostres de sòl en un estudi de camp, i així confirmar les rutes de degradació establertes en estudis a nivell de laboratori.

I.9. REFERÈNCIES

1. **Renfrew, C. and Bahn, P.** (1993). "Arqueologia: Teoría, métodos y práctica".AKAL, Madrid: 576.
2. **Heun, M., Schäfer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., et al.** (1997). "Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting". *Science* 278: 1312–1314.
3. **Nesbitt, M.** (1998). " Where was einkorn wheat domesticated ?". *Trends in Plant Science* 3 1360–1385.
4. **Dubcovsky, J. and Dvorak, J.** (2007). "Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication". *Science* 316: 862–1866.
5. **Mac Key, J.** (2005 , vol 1, pp 3–61). "Wheat: its concept, evolution and taxonomy. In: Royo C et al. (eds) Durum wheat breeding. Current approaches and future strategies".
6. **Carrillo, J.M., Vázquez, J.F. and Rodríguez De Quijano, M.** (2006). "Mejora de la calidad del trigo".En: Mejora genética de la calidad en plantas. Universitat Politècnica de Valencia, M.J. Díez G. Yacer, J.M. Carrillo y M.L. Badenes (Eds): 127-164.
7. **Guerrero, A.** (1999). "Cultivos herbáceos extensivos".Mundi-Prensa Libros S.A (Ed), Bilbao: 831.
8. **Zadoks, J.C., Chang, T.T. and Konzak, C.F.** (1974). "A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals". *Weed Research* 14: 415-421.
9. "División de Comercio y Mercados de la FAO en el marco del Sistema Mundial de Información y Alerta (SMIA).Perspectivas de cosechas y situación alimentaria" (2011). Food on Agriculture Organization of the United Nations.
10. **Janick, J.** (1979). "Horticultural Science ".W.H. Freeman., San Francisco.
11. **Baker, J.** (1974). "The evolution of weeds". *Annual Review of Ecology and Systematics* 5: 1-24.
12. **Labrada, R., Caseley, J. and Parker, C.** (1996). "Manejo de malezas para países en desarrollo".Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma.
13. **Upadhayaya, M.K. and Blackshaw, R.E.** (2007). "Nonchemical Weed managment. Principles, Concepts and Technology".Cambridge.

14. **Dodd, A.P.** (1936). "The Control and Eradication of Prickly-Pear in Australia". *Bulletin of Entomological Research* 27: 503-517.
15. **Koeck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Gonzalez, S., Luis Cortina, J., Lopez De Alda, M., et al.** (2012). "Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain)". *Chemosphere* 86 (1): 8-16.
16. **Lopez-Roldan, R., Lopez De Alda, M., Gros, M., Petrovic, M., Martin-Alonso, J., et al.** (2010). "Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry". *Chemosphere* 80 (11): 1337-1344.
17. **Benvenuto, F., Marin, J.M., Sancho, J.V., Canobbio, S., Mezzanotte, V., et al.** (2010). "Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (7): 2791-2805.
18. **Kuster, M., Diaz-Cruz, S., Rosell, M., Lopez De Alda, M. and Barcelo, D.** (2010). "Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters". *Chemosphere* 79 (8): 880-886.
19. **Azevedo, D.D., Lacorte, S., Vinhas, T., Viana, P. and Barcelo, D.** (2000). "Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 879 (1): 13-26.
20. **Lacorte, S., Guiffard, I., Fraisse, D. and Barcelo, D.** (2000). "Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE Council Directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS". *Analytical Chemistry* 72 (7): 1430-1440.
21. **Rodriguez-Mozaz, S., De Alda, M.J.L. and Barcelo, D.** (2004). "Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1045 (1-2): 85-92.
22. **Rodriguez-Mozaz, S., Reder, S., De Alda, M.L., Gauglitz, G. and Barcelo, D.** (2004). "Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the River ANALyser (RIANA), an optical immunosensor". *Biosensors & Bioelectronics* 19 (7): 633-640.
23. **Da Cunha, A.C.B., De Alda, M.J.L., Barcelo, D., Pizzolato, T.M. and Dos Santos, J.H.Z.** (2004). "Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic,

- triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (4): 940-954.
24. **Rodriguez-Mozaz, S., De Alda, M.J.L. and Barcelo, D.** (2006). "Fast and simultaneous monitoring of organic pollutants in a drinking water treatment plant by a multi-analyte biosensor followed by LC-MS validation". *Talanta* 69 (2): 377-384.
25. **Kampioti, A.A., Da Cunha, A.C.B., De Alda, M.L. and Barcelo, D.** (2005). "Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (8): 1815-1825.
26. **Hildebrandt, A., Guillamon, M., Lacorte, S., Tauler, R. and Barcelo, D.** (2008). "Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain)". *Water Research* 42 (13): 3315-3326.
27. **Hernandez, F., Marin, J.M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Lopez, F.J., et al.** (2008). "Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 88 (6): 409-424.
28. **Troyer, J.R.** (2001). "In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides". *Weed Science* 49: 290-297.
29. **Heap, I.** "The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Internet Available: www.weedscience.org".
30. **Rosenthal, G. and Berenbaum, M.** (1991). "Herbivores, Their Interactions with Secondary Plant Metabolites". Academic Press, San Diego: 1
31. **Coley, P.** (1983). "Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest". *Ecological Monographs* 53: 209-233.
32. **Aide, T.** (1993). "Patterns of leaf development and herbivory in a tropical understory community". *Ecology* 74: 455-466.
33. **Tallamy, D. and Raupp, M.** (1991). "Phytochemicals Induction by Herbivores". John Wiley & Sons (Eds), New York.
34. **Fournier, L.** (1985). "El fenómeno de la alelopatía y su posible aplicación en la agricultura". *Plits*, 3:12-25.

35. **Molisch, H.** (1937). "The Influence of One Plant on Another: Allelopathy". Scientific Publishers Journals Dept: 155.
36. **Rice, E.L.** (1974). "Allelopathy". Academic Press: 353.
37. **Torres, A., Oliva, R.M., Castellano, D. and Cross, P.** (1996) "Introduction. A Science for the Future". First World Congress on Allelopathy. Cadiz, Spain.
38. **Theophrastus** (1916). "Enquiry into Plants". Loeb Classical Library, 1:512.
39. **Lee, K. and Monsi, M.** (1963). "Ecological studies on Pinus demifiru forest 1. Effects of plant substances on the floristic composition of the undergrowth". Botanical Magazine: 76.
40. **Rice, E.L.** (1984). "Allelopathy". Academic Press: 422.
41. **Massey, A.B.** (1925). "Antagonism of the walnuts (*Juglans nigra* L. and *J. cinerea* L.) in certain plant associations". Phytopathology 15: 773-784.
42. **Regnault-Roger, C., Philogène Jr, B. and Vincent, C.** (2003). "Biopesticides d'origine végétale". Lavoisier, Paris:546.
43. **Inderjit, D.K., Dakshini, K. and Einhellig, F.** (1984). "Allelopathy. Organisms, processes and applications". ACS Symposium Series. American Chemical Society:388.
44. **Putnam, A.R.** (1985). "Allelopathic research in agriculture. Past highlights and potentials". The Chemistry of Allelopathy: Biochemical Interactions among Plants. American Chemical Society, Washington. 268:1-8.
45. **Rice, E.L. and Panchoy, S.K.** (1973). "Inhibition of nitrification by climax ecosystems". American Journal of Botany 60: 691.
46. **Putnam, A.R.** (1985). "The Chemistry of Allelopathy: Biochemical interactions between plants". Wiley, American Chemistry Society, Washington:317.
47. **Thompson, A.C.** (1985). "The chemistry of allelopathy: Biochemical interactions among plants". ACS Symposium Series. American Chemical Society, A. C. Thompson, Washington.
48. **Nelson, C.J.** (1996). "Allelopathy in cropping systems". Agronomy Journal 36 (6): 991-996.
49. **Willis, R.J.** (1993). "Terminology and trends in allelopathy". Allelopathy Journal 1 (1): 6-28.

50. **Wood, F.W.** (1960). "Biological antagonisms due to phytotoxic root exudates". *Botanical Review* 26: 546-569.
51. **Tukey, H.B.** (1970). "The leaching substances from plants". *Annual review of plant physiology* 21: 305.
52. **Fisher, R.F.** (1987). "Allelopathy: A Potential Cause of Forest Regeneration Failure". *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. American Chemical Society, ACS Symposium Series, Washington DC: 184.
53. **Huang, P.M., Wang, T.S.C., Wang, M.K., Wu, M.H. and Hsu, N.W.** (1977). "Retention of Phenolic Acids By Noncrystalline Hydroxy-Aluminum and -Iron Compounds and Clay Minerals of Soils". *Soil Science* 123 (4): 213-219.
54. **Einhellig, F.A.** (1996). "Interactions involving allelopathy in cropping systems". *Agronomy Journal* 88: 886-893.
55. **Reigosa, M., Sánchez-Moreiras, A. and González, L.** (1999). "Ecophysiological Approach in Allelopathy". *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 577-608.
56. **Welden, C. and Slauson, W.** (1986). "The intensity of competition verses its importance: an overlooked distinction and some implications". *The Quarterly Review of Biology* 61: 23-44.
57. **Callaway, R., Nadkarni, N. and Mahall, B.** (1991). "Facilitating and interfering effects of *Quercus douglasi* in central California ". *Ecology* 72: 1484-1499.
58. **Chapin, F., Walker, L., Fastie, C. and Sharman, L.** (1994). "Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecological Monographs* 64: 149-175.
59. **Connell, J.** (1983). "On the prevalence and relative importance of interspecific competition: evidence from field experiments". *American Naturalist* 122: 661-696.
60. **Schoener, T.** (1983). "Field experiments on interspecific competition ". *American Naturalist* 122: 240-285.
61. **Caldwell, M., Eissenstat, D. and Richards, J.** (1985). "Competition for phosphorous: differential uptake from dualisotope-labeled interspaces between shrubs and grass". *Science* 229: 384.
62. **Caldwell, M., Richards, J., Manwaring, J. and Eissenstat, D.** (1987). "Rapid shifts in phosphate acquisition show direct competition between neighboring plants". *Nature* 327: 615-616.

63. **Mahall, B. and Callaway, R.** (1991). "Root communication among desert shrubs". *Ecology* 88: 874-876.
64. **Mahall, B. and Callaway, R.** (1992). "Root communication mechanisms and intracommunity distributions of two Mojave Desert shrubs *Ecology*". *Ecology* 73: 2145-2151.
65. **Muller, C.H.** (1969). "Allelopathy as a factor in ecological process". *Plant Ecology* 18 (1): 348-357.
66. **Fuerst, E. and Putman, A.** (1983). "Separating the competitive and allelopathic components of interference: theoretical principles". *Journal of Chemical Ecology* 9: 937-944.
67. **Thijs, H., Shann, J. and Weidenhamer, J.** (1994). "The effect of phytotoxins on competitive outcome in a model system". *Ecology* 75: 1959-1964.
68. **Harper, J.** (1977). "Population biology of plants". Academic Press: 892.
69. **Connell, J.** (1990). "Apparent versus "real" competition in plants ". *Perspectives on plant competition*. Grace JB and Tilman D (Eds), San Diego, California: 17.
70. **Williamson, G.** (1990). "Allelopathy, Koch's postulates, and the neck riddle". *Perspectives on plant competition*. and Tilman D. Grace J, San Diego, California: 144-162.
71. **Nilsson, M.** (1994). "Separation of allelopathy and resource competition by the boreal dwarf shrub". *Empetrum hermaphroditum Oecologia* 98: 1-7.
72. **Ridenour, W. and Callaway, R.** (2001). "The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass". *Oecologia* 126: 444-450.
73. **Inderjit, D.K. and Dakshini, K.** (1988). "Allelopathic interference of chickweed, *Stellaria media* with seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*)". *Journal of Botanic* 76: 1317-1321.
74. **Harper, J.** (1975). "Allelopathy ". *Quarterly Review Biology* 50: 493-495.
75. **Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M.** (2003). "Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions". *Science* 301 (5638): 1377-1380.
76. **Copaja, S.V., Nicol, D. and Wratten, S.D.** (1999). "Accumulation of hydroxamic acids during wheat germination". *Phytochemistry* 50 (1): 17-24.

77. **Collantes, H., Gianoli, E. and Niemeyer, H.** (1999). "Defoliation affects chemical defenses in all plant parts of rye seedlings". *Journal of Chemical Ecology* 25: 491-499.
78. **Rice, C., Park, Y., Abdul-Baki, A. and Teasdale, J.** (2005). "Hydroxamic Acid Content and Toxicity of Rye at Selected Growth Stages". *Journal of Chemical Ecology* 31: 1887-1905.
79. **Stochmal, A., Kus, J., Martyniuk, S. and Oleszek, W.** (2006). "Concentration of Benzoxazinoids in roots of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) varieties". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1016-1022.
80. **Mogensen, B.B., Krongaard, T., Mathiassen, S.K. and Kudsk, P.** (2006). "Quantification of benzoxazinone derivatives in wheat (*Triticum aestivum*) varieties grown under contrasting conditions in Denmark". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 1023-1030.
81. **Villagrasa, M., Guillamon, M., Labandeira, A., Taberner, A., Eljarrat, E., et al.** (2006). "Benzoxazinoid allelochemicals in wheat: Distribution among foliage, roots, and seeds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 1009-1015.
82. **Villagrasa, M., Guillamon, M., Eljarrat, E. and Barcelo, D.** (2008). "Development of a pressurized liquid extraction-solid phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of benzoxazolinones and their degradation products in agricultural soil.". *Journal Chromatography A* 1179 (2): 190-197.
83. **Huang, Z., Haig, T., Wu, H., An, M. and Pratley, J.** (2003). "Correlation Between Phytotoxicity on Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*) and Production Dynamics of Allelochemicals Within Root Exudates of an Allelopathic Wheat". *Journal of Chemical Ecology* 29 (10): 2263-2279.
84. **Pérez, F. and Ormeño-Núñez, J.** (1991). "Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): possible role in allelopathy". *Journal of Chemical Ecology* 17: 1037-1043.
85. **Mathiassen, S.K., Kudsk, P. and Mogensen, B.B.** (2006). "Herbicidal effects of soil-incorporated wheat". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 1058-1063.
86. **Zikmundova, M., Drandarov, K., Bigler, L., Hesse, A. and Werner, C.** (2002). "Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*". *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10): 4863-4870.

87. **Fomsgaard, I.S., Mortensen, A.G., Coja, T., Idinger, J. and Blümel, S.** (2006). "Transformation of benzoxazinones and derivatives and microbial activity in the test environment of soil ecotoxicological tests on *Poecilus cupreus* and *Folsomia candida*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1086-1092.
88. **Macias, F.A., Oliveros-Bastidas, A., Marin, D., Castellano, D., Simonet, A.M., et al.** (2005). "Degradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of (2R)-2-O-beta-D-glucopyranosyl-4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA-Glc) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from gramineae". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (3): 554-561.
89. **Sanchez-Moreiras, A. and Reigosa, M.** (2005). "Whole Plant Response of Lettuce after Root Exposure to BOA (2(3H)-Benzoxazolinone)". *Journal of Chemical Ecology* 31: 2689-2703.
90. **Macías, F.A.** (2005). "Structure-activity relationship of benzoxazinones and related compounds with respect to the growth inhibition and alpha-amylase activity in cress seedlings". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 538-548.
91. **Martyniuk, S., Stochmal, A., Macias, F., Marin, D. and Oleszek, W.** (2006). "Effects of some benzoxazinoids on in vitro growth of *Cephalosporium gramineum* and other fungi pathogenic to cereals and on *Cephalosporium stripe* of winter wheat". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1036-1039.
92. **Belz, R. and Hurle, K.** (2004). "A Novel Laboratory Screening Bioassay for Crop Seedling Allelopathy". *Journal of Chemical Ecology* 30: 175-198.
93. **Belz, R. and Hurle, K.** (2005). "Differential Exudation of Two Benzoxazinoids - One of the Determining Factors for Seedling Allelopathy of Triticeae Species". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 250-261.
94. **Wolfender, J., Ndjoko, K. and Hostettmann, K.** (2003). "Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites". *Journal of Chromatography A* 1000: 437-455.
95. **Eljarrat, E., Guillamon, M., Seuma, J., Bugel, B., Formsgaard, I., Oleszek, W., Stochmal, A. Shakaliene, O., Barcelo, D** (2004). "First European inter-laboratory study on benzoxazinone derivatives in plants: phase I.". *Journal of Chromatography A* 1047: 69-76.
96. **Duke, S.O., Dayan, F., Romagni, J. and Rimando, A.** (2000). "Natural products as sources of herbicides: current status and future trends". *Weed Research* 40: 99-111.

97. **Stonar, R. and Miller-Wideman, M.** (1995). "Herbicides and plant growth regulations". In: *Agrochemicals from Natural Product*. Marcel Dekkert, C. (Ed) Godfrey, New York. 6:285-310.
98. **Fischer, N., Weidenhamer, J., Riopel, J., Quijano, L. and Menelaou, M.** (1990). "Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study". *Phytochemistry* 29: 2479-2483.
99. **Elakovich, S.** (1988). "In Biological Active Natural products: Potential use in Agriculture". ACS Symposium Series 380. American Chemical Society, Cutler H. (Ed), Washington.
100. **Zobel, A.** (1999). "Principes and Practices in Plant Ecology: Allelochemicals interactions". D.K. and Foy Inderjit, C. (Eds), Florida: 589.
101. **Netzly, D., Riopel, J., Eljeta, G. and Butler, L.** (1988). "Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudates of sorghum (*Sorghum bicolor*)". *Weed Science* 36: 441-446.
102. **Vyvyan, J.R.** (2002). "Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals". *Tetrahedron* 58 (9): 1631-1646.
103. **Seydel, J.** (1984) "QSAR and strategies in the design of bioactive compounds: ". Fifth European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships. Bad Segeberg.
104. **Patani, G. and Lavoie, E.** (1996). "Bioisosterism: A rational approach in drug design". *Chemical review* 96: 3147-3176.
105. **Duchowicz, P., Mercader, A., Fernandez, F. and Castro, E.** (2008). "Prediction of aqueous toxicity for heterogeneous phenol derivatives by QSAR". *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 90: 97-107.
106. **Weston, L.A.** (1996). "Utilization Of Allelopathy For Weed Management In Agroecosystems". *Agronomy Journal* 88 (6): 860-866.
107. **Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D. and Haig, T.** (1999). "Crop cultivars with allelopathic capability". *Weed Research* 39 (3): 171-180.
108. **Chou, C.H.** (1999). "Roles of Allelopathy in Plant Biodiversity and Sustainable Agriculture". *Critical Reviews in Plant Sciences* 18 (5): 609-636.
109. **Macias Francisco, A.** (1994). "Allelopathy in the Search for Natural Herbicide Models". *Allelopathy*. American Chemical Society, 582:310-329.

110. **Springob, K. and Kutchan, T.M.** (2009). "Introduction to the different Classes of Natural Products". *Plant-derived Natural Products*. Springer, Osbourn and Lanzotti (Eds), London: 3-50.
111. **Virtanen, A.I. and Hietala, P.K.** (1955). "2(3)-benzoxazolinone antifusarium factor in rye seedling". *Acta Chemica Scandinavica* 9: 1543-1544.
112. **Virtanen, A.I., Hietala, P.K. and Wahlroos, O.** (1956). "An anti-fungal factor in maize and wheat plants". *Suomen Kemistilehti* B29: 143.
113. **Loomis, R.S., Beck, S.D. and Stauffer, J.F.** (1957). "The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübner), and its principal host plant. V. A. chemical study of host plant resistance". *Plant Physiology* 32: 379-385.
114. **Virtanen, A.I., Hietala, P.K. and Wahlroos, O.** (1957). "Antimicrobial substances in cereals and fodder plants". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 69: 486-500.
115. **Wahlroos, O. and Virtanen, I.** (1959). "The precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties.". *Acta Chemica Scandinavica* 13: 1096-1908.
116. **Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., et al.** (1997). "Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses". *Science* 277: 696-699.
117. **Melanson, D., Chilton, M.D., Masters-Moore, D. and Chilton, W.S.** (1997). "A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of bxbx maize". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 13345-13350.
118. **Frey, M., Stettner, C., Pare, P.W., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., et al.** (2000). "An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize". *Proceedings of the National Academy of Sciences* (97): 14801-14806.
119. **Gierl, A. and Frey, M.** (2001). "Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize". *Planta* (213): 493-498.
120. **Hofman, J. and Hofmanova, O.** (1969). "1.4-benzoxazine derivatives in plants". *European Journal Biochemistry* 8: 109.
121. **Massardo, F., Zúñigab, G.E., Ptrezc, L.M. and Corcuera, L.J.** (1994). "Effects of hydroxamic acids on electron transport and their cellular location in corn". *Phytochemistry* 35 (4): 873-876.
122. **Argandona, V.H., Niemeyer, H.M. and Corcuera, L.J.** (1981). "Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by the aphid *schizaphis-graminum*". *Phytochemistry* 20 (4): 673-676.

123. **Pérez, F.J. and J., O.N.** (1991). "Differences in hydroxamic acid content in roots and roots exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale secale* L.). Possible role in allelopathy". *Journal of Chemical Ecology* 17: 1037-1043.
124. **Wu, H.W., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M.** (2000). "Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*". *Journal of Chemical Ecology* 26 (9): 2141-2154.
125. **Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M.** (2001). "Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in shoot tissues". *Journal of Chemical Ecology* 27 (1): 125-135.
126. **Nair, M., C.J., W. and Putnam, A.R.** (1990). "2,2'-Oxo-1,1'-azobenzene, a microbial transformed allelochemical from 2,3'-benzoxazoline". *Journal of Chemical Ecology* 16: 353-364.
127. **Chase, W.R., Nair, M.G. and Putnam, A.R.** (1991). "2,2'-Oxo-1,1'-Azobenzene - Selective Toxicity of Rye (*Secale-Cereale* L) Allelochemicals to Weed and Crop Species .2". *Journal of Chemical Ecology* 17 (1): 9-19.
128. **Chase, W.R., Nair, M.G., Putnam, A.R. and Mishra, S.K.** (1991). "2,2'-Oxo-1,1'-Azobenzene - Microbial Transformation of Rye (*Secale-Cereale* L) Allelochemical in Field Soils by *Acinetobacter-Calcoaceticus* .3". *Journal of Chemical Ecology* 17 (8): 1575-1584.
129. **Gagliardo, R.W. and Chilton, W.S.** (1992). "Soil transformation of 2(3H)-Benzoxazolone of Rye into Phytotoxic 2-Amino-3H-phenoxazin-3-one". *Journal of Chemical Ecology* 18 (10): 1683-1691.
130. **Friebe, A., Vilich, V., Hennig, L., Kluge, M. and Sicker, D.** (1998). "Detoxification of benzoxazolinone allelochemicals from wheat by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *G-graminis* var. *graminis*, *G-graminis* var. *avenae*, and *Fusarium culmorum*". *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7): 2386-2391.
131. **Zikmundova, M., Drandarov, K., Hesse, A. and Werner, C.** (2002). "Hydroxylated 2-amino-3H-phenoxazin-3-one derivatives as products of 2-hydroxy-3-one (HBOA). Biotransformation by *Chaetosphaeria* sp., and endophytic fungus from *Aphelandra tetragona*". *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 57: 660-665.
132. **Sene, M., Dore, T. and Pellissier, F.** (2000). "Effect of phenolic acids in soil under and between rows of a prior sorghum (*Sorghum bicolor*) crop on germination, emergence and seedling growth of peanut (*Arachis hypogea*)". *Journal of Chemical Ecology* 26: 625-637.

133. **Liebl, R.A. and Worsham, A.D.** (1983). "Inhibition of pitted morning glory (*Ipomea lacunose* L.) and certain other weed species by phytotoxic compound of wheat". *Journal of Chemical Ecology* 9: 1027-1043.
134. **Satoh, M.Y., Uasmi, Y. and Koizumi, H.** (1989). "Allelopathic effect of *Chenopodium album* and several plant species incorporated into medium". *Weed Research* 34 (4): 285-291.
135. **Kitou, M. and Yoshida, S.** (1993). "Difference of phytotoxicity between undecomposed and microbially decomposed plant residues". *Weed Research* 38: 43-46.
136. **Kitou, M. and Yoshida, S.** (1998). "Allelopathic effects of extracts of soil amended with some plant materials on germination and radicle elongation of lettuce". *Journal of Weed Science and Technology* (43): 1-9.
137. **Kitou, M. and Okuno, S.** (1999). "Allelopathic potential of phenolic compounds from coffee residue". *Journal of Weed Science and Technology* 44: 349-352.
138. **Laterra, P. and Bazzalo, M.E.** (1999). "Seed-to seed allelopathic effects between two invaders of burned Pampa grassland". *Weed Research* 39: 297-308.
139. **Harper, S.H.T. and Lynch, J., M** (1982). "The role of water-soluble components in phytotoxicity from decomposing straw". *Plant Soil* 65: 11-17.
140. **Pérez, F.J.** (1999). "Allelopathic effects of hydroxamic acids from cereals on *Avena Sativa* and *A.fatua*". *Phytochemistry* 29: 773-776.
141. **Blum, U., Gerig, T.M., Worsham, A.D., Holappa, L.D. and King, L.D.** (1992). "Allelopathic activity in wheat-conventional and wheat-no-till soils: Development of soil extract bioassays". *Journal of Chemical Ecology* 18: 2191.
142. **Macias, F.A., Oliveros-Bastidas, A., Marin, D., Castellano, D., Simonet, A.M., et al.** (2004). "Degradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from Gramineae". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (21): 6402-6413.
143. **Idinger, J., Coja, T. and Blümel, S.** (2006). "Effects of the benzoxazinoid DIMBO, selected degradation products, and, structure-related pesticides on soil organisms". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 1-13.
144. **Abbas, H.K. and Duke, S.O.** (1995). "Phytotoxins from Plant Pathogens as Potential Herbicides". *Toxin Reviews* 14: 523-543.

145. **Grayson, B.T., Williams, K.S., Freehauf, P.A., Pease, R.R., Ziesel, W.T., et al.** (1987). "The physical and chemical properties of the herbicide cinmethylin". *Pesticide Science* 21: 143-153.
146. **Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A. and Molinillo, J.** (2006). "Optimization of benzoxazinones as natural herbicides models by lipophilicity enhancement". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9357-9365.
147. **Macías, F.A., Siqueira, J., Chinchilla, N., Marín, D., Varela, R., et al.** (2006). "New herbicides models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9843-9851.
148. **Kebarle, P. and Tang, L.** (1993). "From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry". *Analytical Chemistry* 65 (22): A972-A986.
149. **Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L. and Chavez-Eng, C.M.** (1998). "Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations". *Analytical Chemistry* 70 (5): 882-889.
150. **Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., Wang, S., et al.** (2003). "Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (1): 97-103.
151. **Van Hout, M.W.J., Niederlander, H.a.G., De Zeeuw, R.A. and De Jong, G.J.** (2003). "Ion suppression in the determination of clenbuterol in urine by solid-phase extraction atmospheric pressure chemical ionisation ion-trap mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (3): 245-250.
152. **Dijkman, E., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Hogendoorn, E., Sancho, J.V., et al.** (2001). "Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection". *Journal of Chromatography A* 926 (1): 113-125.
153. **Ferguson, P.L., Iden, C.R. and Brownawell, B.J.** (2000). "Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry". *Analytical Chemistry* 72 (18): 4322-4330.
154. **Dicorcia, A., Crescenzi, C. and Lagana, A.** (1996). "Evaluation of a method based on liquid chromatography electrospray mass spectrometry for analyzing carbamate insecticides in fruits and vegetables". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (7): 1930-1938.

155. **King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. and Olah, T.** (2000). "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11 (11): 942-50.
156. **Kebarle, P.** (2000). "A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry". *Journal of Mass Spectrometry* 35: 804.
157. **Barceló, D. and Petrovic, M.** (2007). "Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (1): 2-11.
158. **Scism, A.J., Bemiller, J.N. and Caskey, A.L.** (1974). "Determination of 2,4-Dihydroxy-1,4(2H)-benzoxazin-3-one Glucosides in Corn (*Zea mays* L.)". *Analytical Biochemistry* 58: 1-13.
159. **Garcia, C., Garcia, S., Heinzen, H., Moyna, P. and Niemeyer, H.M.** (1998). "An efficient method for the quantification of hydroxamic acids from wheat by thin layer chromatography-densitometry". *Phytochemical analysis* 9: 278-282.
160. **Tang, C.S., Chang, S.H., Hoo, D. and Yanagihara, K.H.** (1975). "Gas chromatographic determination of 2(3)-benzoxazolinones from cereal plants". *Phytochemistry* 14: 2077-2079.
161. **Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Helgeson, J.P. and Upper, C.D.** (1978). "Decomposition of 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2h-1,4-Benzoxazin-3(4h)-One in Aqueous-Solutions". *Plant Physiology* 61 (5): 796-802.
162. **Bravo, H.R. and Niemeyer, H.M.** (1986). "A new product from the decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, a hydroxamic acid from cereals". *Heterocycles* 24: 335.
163. **Niemeyer, H.M., Pesel, E., Copaja, S.V., Bravo, H.R., Franke, S., et al.** (1989). "Changes in Hydroxamic Acid Levels of Wheat Plants Induced by Aphid Feeding". *Phytochemistry* 28 (2): 447-449.
164. **Gianoli, E., Hermann, M. and Niemeyer, H.M.** (1997). "Environmental effects on the accumulation of hydroxamic acids in wheat seedlings: the importance of plant growth rate". *Journal of Chemical Ecology* 23 (2): 543.
165. **Zuniga, G.E., Copaja, S.V., Bravo, H.R. and Argandona, V.H.** (1990). "Hydroxamic Acids Accumulation by Wheat Callus". *Phytochemistry* 29 (7): 2139-2141.
166. **Zuniga, G.E., Argandona, V.H., Niemeyer, H.M. and Corcuera, L.J.** (1983). "Hydroxamic Acid Content in Wild and Cultivated Gramineae". *Phytochemistry* 22 (12): 2665-2668.

167. **Wu, H.W., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M.** (1999). "Simultaneous determination of phenolic acids and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in wheat (*Triticum aestivum* L.) by gas chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 864 (2): 315-321.
168. **Lyons, P.C., Hipkind, J.D., Wood, K.V. and Nicholson, R.L.** (1988). "Separation and Quantification of Cyclic Hydroxamic Acids and Related-Compounds by High-Pressure Liquid-Chromatography". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (1): 57-60.
169. **Baumeler, A., Hesse, M. and Werner, C.** (2000). "Benzoxazinoids-cyclic hydroxamic acids, lactams and their corresponding glucosides in the genus *Aphelandra* (Acanthaceae)". *Phytochemistry* 53 (2): 213-222.
170. **Wu, H., Haig, T., Pratley, J. and Lemerle, D.** (2001). "Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Cultivar difference in the exudation of phenolic acids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3742.
171. **Finney, M., Danehower, D. and Burton, J.** (2005). "Gas chromatographic method for the analysis of allelopathic natural products in rye (*Secale cereale* L.)". *Journal Chromatography A* 1066: 249.
172. **Mayoral, A.M., Gutierrez, C., Ruiz, M.L. and Castanera, P.** (1994). "A High-Performance Liquid-Chromatography Method for Quantification of Diboia, Dimboa, and Mboa from Aqueous Extracts of Corn and Winter Cereal Plants". *Journal of Liquid Chromatography* 17 (12): 2651-2665.
173. **Xie, Y.S., Atkinson, A.J., Arnason, J.T., Morand, P. and Philogene, B.J.R.** (1991). "Separation and quantitation of 1,4-benzoxazin-3-ones and benzoxazolin-2-ones in maize root extract by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A* 543: 389-395.
174. **Cambier, V., Hance, T. and Hoffmann, E.** (1999). "Non-injured maize contains several 1,4-benzoxazin-3-one related compounds but only as glucoconjugates". *Phytochemical Analysis* 10 (3): 119-126.
175. **Pessi, A. and Scalorbi, D.** (1979). "High-performance liquid chromatography of naturally occurring benzoxazolinones". *Journal of Chromatography A* 177 (1): 162-165.
176. **Cambier, V., Hance, T. and De Hoffmann, E.** (2000). "Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize". *Phytochemistry* 53 (2): 223-229.
177. **Gutierrez, C., Guerrero, A., Castanera, P. and Torres, J.V.** (1982). "A high-performance liquid chromatographic method for quantitation of DIMBOA and

- MBOA in maize plant extract". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (6): 1258-1260.
178. **Peng, S. and Scott Chilton, W.** (1994). "Biosynthesis of dimboa in maize using deuterium oxide as a tracer". *Phytochemistry* 37 (1): 167-171.
179. **Cambier, V., Hance, T. and De Hoffmann, E.** (1999). "Non-injured maize contains several 1,4-benzoxazin-3-one related compounds but only as glucoconjugates". *Phytochemical Analysis* 10 (3): 119-126.
180. **Villagrasa, M., Guillamon, M., Eljarrat, E. and Barcelo, D.** (2006). "Determination of benzoxazinone derivatives in plants by combining pressurized liquid extraction-solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 1001-1008.
181. **Bonnington, L., Eljarrat, E., Guillamon, M., Eichhorn, P., Taberner, A., et al.** (2003). "Development of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of benzoxazinone derivatives in plants". *Analytical Chemistry* 75 (13): 3128-3136.
182. **Nakagawa, E., Amano, T., Hirai, N. and Iwamura, H.** (1995). "Non-induced Cyclic Hydroxamic Acids in Wheat During Juvenile Stage of Growth". *Phytochemistry* 38 (6): 1349-1354.
183. **Kehrmann, F.** (1906). "Ueber Oxydationsproducte von o-aminphenolen". *Chem. Ber.* 39: 134-138.
184. **Szvevény, Z., Milaeva, E. and Simandi, L.** (1991). "Kinetics of the oxidation of 2-aminophenol by dioxygen in the presence of tetrakis [(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) dodeca chloro ftalocyaninato]cobalt(II)". *J. Mol. Catal* 67: 251-258.
185. **Buckley, R.G., Charalambous, J. and Henrick, K.** (1982). "2-amino-7-methoxy-3H-phenoxazin-3-one". *Acta Crystallography* B38: 289-291.
186. **Charalambous, J., Kensett, M. and Jenkins, J.** (1977). "Deoxygenation of 2-nitrophenols and of their metal complexes with triphenylphosphine. Synthesis of phenazines dihydrophenazines, triphenyl(o-hydroxyphenylimino)phosphoranes and their metal complexes". *Journal of Chemical Society* 12: 400-401.
187. **Macias, F.A., Marin, D., Oliveros-Bastidas, A., Chinchilla, D., Simonet, A.M., et al.** (2006). "Isolation and synthesis of allelochemicals from gramineae: Benzoxazinones and related compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 991-1000.
188. **Prinz, S., Schauburger, D., Bauer, I.M., Knasmueller, S. and Kopp, B.** (2010). "Aneugenic 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 2,4-

- dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA) in sprouts of *Triticum aestivum* cultivars - A 'safety health food?'. *Food Chemistry* 121 (4): 973-979.
189. **Zhou, B., Kong, C.H., Wang, P. and Li, Y.H.** (2013). "Chemical constituents of the essential oils of wild oat and carbgrass and their effects on the growth and allelochemical production of wheat". *Weed Biology and Management* 13: 62-69.
190. **Elek, H., Smart, L., Martin, J., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., et al.** (2013). "The potential of hydroxamic acids in tetraploid and hexaploid wheat varieties as resistance factors against the bird-cherry oat aphid, *Rhopalosiphum padi*". *Annals of Applied Biology* 162 (1): 100-109.
191. **Rice, C.P., Guimei, C. and Teasdale, J.R.** (2012). "Concentrations and Allelopathic Effects of Benzoxazinoid Compounds in Soil Treated with Rye (*Secale cereale*) Cover Crop". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4471-4479.
192. **Hanhineva, K., Rogachev, I., Aura, A.M., Aharoni, A., Poutanen, K., et al.** (2011). "Qualitative Characterization of Benzoxazinoid Derivatives in Whole Grain Rye and Wheat by LC-MS Metabolite Profiling". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (3): 921-927.
193. **Matthews, S.B., Santra, M., Mensack, M.M., Wolfe, P., Byrne, P.F., et al.** (2012). "Metabolite Profiling of a Diverse Collection of Wheat Lines Using Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometry". *Plos One* 7 (8).
194. **Tanwir, F., Fredholm, M., Gregersen, P. and Fomsgaard, I.S.** (2013). "Comparison of the levels of bioactive benzoxazinoids in different wheat and rye fractions and the transformation of these compounds in homemade foods". *Food Chemistry* 141: 444-450.
195. **Chen, K.J., Zheng, Y.Q., Kong, C.H., Zhang, S.Z., Li, J., et al.** (2010). "2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 6-Methoxy-benzoxazolin-2-one (MBOA) Levels in the Wheat Rhizosphere and Their Effect on the Soil Microbial Community Structure". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (24): 12710-12716.
196. **Li, J., Liu, X.G., Dong, F.S., Xu, J., Guo, L.Q., et al.** (2013). "A Simple Method for the Isolation and Purification of 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-One (DIMBOA) from Maize (*Zea mays* L.) Seedlings". *Journal of Integrative Agriculture* 12 (1): 95-102.

