



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 V.- CONCLUSIONS



V.- CONCLUSIONS GENERALS

Les pràctiques més comunes involucrades en la gestió i control de les males herbes en l'agricultura han depès i depenen de l'ús de plaguicides sintètics. La preocupació pública sobre la seguretat dels plaguicides ha generat suficient pressió per tal que es revalorí la seva toxicitat i el seu impacte sobre el medi ambient i es cerquin alternatives al tractament menys agressives. L'al·lelopatia es troba entre les possibles alternatives a l'ús de productes sintètics. Per tal de poder-ne dur a terme una valoració, és important conèixer quins són els compostos al·lelopàtics presents en els cultius. La present tesi és una contribució al desenvolupament de metodologies d'anàlisi per a la determinació de diferents compostos al·lelopàtics presents en mostres de blat i els seus productes de degradació en el sòl. Malgrat hi havia treballs existents en els que diferents compostos al·lelopàtics eren analitzats, pocs d'ells presentaven el procediment de validació del mètode emprat. D'aquesta manera els protocols desenvolupats durant el transcurs d'aquesta tesi han permès ampliar el coneixement sobre l'anàlisi d'aquests compostos i la seva presència i distribució en la planta i el sòl de cultius de blat. Les principals conclusions derivades d'aquest treball han estat:

Pel que respecte a les metodologies desenvolupades:

- 1.** S'ha dut a terme el desenvolupament i validació d'una nova metodologia, basada en l'extracció per PLE seguit d'una etapa de neteja de l'extracte per SPE i l'anàlisi per LC-ESI-MS en la determinació simultània dels àcids hidroxàmics, aglucones i benzoxazolinones en plantes de blat. L'estabilitat d'aquests compostos és un punt important a tenir en compte alhora de desenvolupar la metodologia, essent de vital importància en l'anàlisi d'aquests compostos. La metodologia presentada millora en termes de sensibilitat, selectivitat i relativa simplicitat envers a les diferents metodologies descrites fins al moment, basades principalment en l'extracció per ultrasons i anàlisi a través de la LC-UV. S'han obtingut recuperacions del 61% al 108% en les matrius de fulla i arrel amb un RSD per sota del 15%. Els límits de detecció per els compostos analitzats es troben en el rang de 1 a 27 µg/g pes sec.

- 2.** S'ha desenvolupat una metodologia similar per a l'anàlisi simultani de les benzoxazolinones, aminophenoxazinones i àcids malonàmics en matrius de sòl agrícola basada en una extracció per PLE seguit d'una etapa de purificació de l'extracte per SPE. En un primer estadi l'anàlisi es va dur a terme usant LC-ESI-MS, no obstant, la sensibilitat aportada per aquesta metodologia no va ser suficient essent necessari el desenvolupament d'una metodologia basada en la LC-MS/MS. S'han obtingut recuperacions del 50% al 100% amb RSD per sota del 15%. Els límits de detecció obtinguts varien de 2.4 ng/g a 21ng/g pes sec depenent del compost analitzat.

- 3.** L'efecte de matriu pot donar lloc a errors en la quantificació dels analits d'interès, així com pot afectar a la capacitat de detecció, a la precisió i exactitud dels mètodes desenvolupats. S'han avaluat diferents metodologies per fer front a aquest efecte. Donat que no disposàvem de patrons dels diferents compostos deuterats, el mètode de la dilució de l'extracte resulta ser el més apropiat en l'anàlisi d'aquests compostos. S'han avaluat els efectes de matriu de les benzoxazinones en fulla i arrel de blat i el de les aminofenoxazinones en el sòl. Es van dur a terme diferents dilucions dels extractes amb la finalitat d'estudiar l'evolució en la supressió de la senyal. Un factor de dilució de 10 per a la matriu fulla i sòl i un de 5 per a l'arrel és suficient per eliminar o minimitzar aquest efecte, permetent dur a terme la quantificació amb els estàndards preparats sense matriu.

Pel que respecte als resultats de l'aplicació dels mètodes desenvolupats a l'anàlisi de les plantes de blat i sòl agrícola:

- 4.** La baixa estabilitat dels analits d'estudi fa que tant la conservació de les mostres just després de la seva col·lecta, com les condicions dutes a terme durant la seva preparació per a l'anàlisi, siguin un punt important per tal d'evitar la degradació de les benzoxazinones. D'aquesta manera s'ha vist que conservar les mostres a -20°C tan bon punt feta la col·lecta permet la determinació dels compostos glucosats, a diferència de les que no han estat congelades.

- 5.** És conegut que els metabòlits secundaris poden ser alliberats al medi a través de diferents mecanismes tals com la volatilització, lixiviació, descomposició de les plantes en el sòl i exsudat des de les arrels. Tots aquests mecanismes impliquen que aquests

compostos es poden trobar presents en qualsevol part de la planta. L'aplicació del mètode desenvolupat en l'estudi de les benzoxazinones en les plantes de blat ha mostrat la seva distribució en les fulles, arrels i llavors en les diferents varietats de blat cultivades sota diferents condicions agrícoles. L'anàlisi de les llavors germinades ha mostrat que aquesta és una matriu a tenir en compte en l'avaluació del contingut total d'al·leloquímics en la planta.

- 6.** Els compostos metoxilats (Dimboa-Glc, HMBOA, DIMBOA i MBOA) són els que es troben a majors concentracions respecte els seus homòlegs no metoxilats. MBOA és el compost detectat a majors concentracions en les mostres que no van ser congelades en el moment de la collita amb nivells de fins a 233 mg/kg pes sec en la fulla i de fins a 309 mg/kg pes sec en l'arrel, mentre que en les mostres preservades a -20°C és l'aglucona DIMBOA el metabòlit detectat en major concentració amb nivells de fins a 3026 mg/kg pes sec en la fulla i de 786 mg/kg pes sec en l'arrel.
- 7.** Els nivells totals d'al·leloquímics són majors en la fulla que en l'arrel en els primers estadis de creixement. No obstant, aquestes diferències són menors a mida que creix la planta. En general, la disminució dels nivells en la fulla d'un estadi a un altre és més pronunciat que en l'arrel, on la seva concentració es manté més constant al llarg del temps. És conegut que les benzoxazinones són principalment exsudades des de les arrels de manera que aquesta seria una possible explicació al fenomen observat.
- 8.** En general, les mostres cultivades sota l'agricultura convencional presenten majors nivells de compostos que les cultivades sota l'agricultura orgànica, possiblement degut a l'ús de plaguicides sintètics en el control de les males herbes que indueixen un estrès a la planta provocant que generin major quantitat d'aquests metabòlits.
- 9.** De les diferents varietats de blat estudiades, la varietat Stakkado (SA) és la que presenta un contingut total de compostos al·lelopàtics major que la resta de varietats.
- 10.** L'anàlisi estadístic aplicat a les dades obtingudes en les mostres de la segona campanya ha mostrat que els factors estadi, cultiu i matriu tenen una influència significativa sobre la concentració total d'al·leloquímics en la planta. S'han observat diferències significatives en la concentració total d'al·leloquímics entre els diferents estadis de creixement, entre la fulla i arrel i entre l'agricultura orgànica i convencional. A més a més

s'observa una interacció significativa entre els estadis i la matriu, el que ens indica i corrobora que depenent de l'estadi de creixement el nivell total d'al·leloquímics no és el mateix en la fulla o arrel.

- 11.** S'ha determinat per primera vegada en mostres de camp els metabòlits de degradació de les benzoxazinones en sòl agrícola a nivells de l'ordre de ng/g pes sec, el que ha permès corroborar els resultats obtinguts amb els estudis de degradació duts a terme a nivell de laboratori.
- 12.** De la mateixa manera que les benzoxazinones en la planta, el cultiu convencional és el que presenta major nivell de compostos en el sòl. A diferència del que s'observa en la planta, el contingut total de compostos de degradació en el sòl augmenta del primer al segon estadi en les mostres del cultiu convencional, mentre que per a les mostres de l'agricultura orgànica no s'observa un tendència clara. El nivell total d'al·leloquímics en el cultiu convencional varia entre varietats, essent la varietat Stakkado (SA) la que presenta majors nivells de compostos en el primer estadi de creixement, mentre que en el segon és la varietat Astron (AS).
- 13.** El càlcul teòric dels nivells d'APO i AMPO en el sòl a partir dels nivells en la planta són del mateix ordre als trobats experimentalment.
- 14.** Per a les varietats Astron (AS) i Ritmo (RI) a partir de les quals s'ha dut a terme l'estimació dels nivells d'APO i AMPO en el sòl, tot i que presenten nivells totals en la planta del mateix ordre, s'observen diferències en el percentatge d'alliberament dels compostos de la planta cap al sòl, possiblement degut a que la microflora associada a les arrels en el sòl és diferent i la que es troba present en el sòl de la varietat Astron té major capacitat per metabolitzar els compostos precursors en la planta. De la mateixa manera els compostos precursors de l'APO són alliberats en major proporció que els seus homòlegs metoxilats per donar lloc a l'AMPO, fet que es podria explicar per la major fitotoxicitat que presenta l'APO envers l'AMPO.