



CSIC

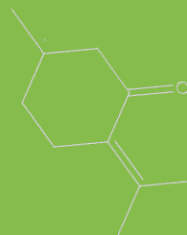
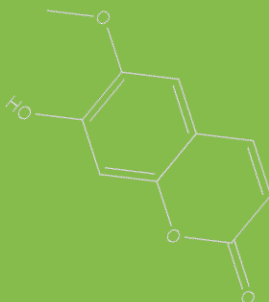
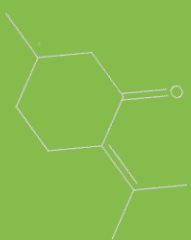
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Dinámica de compuestos alelopáticos en suelos agrícolas en relación con su aprovechamiento como plaguicidas naturales



Jose Antonio Galán Pérez
Sevilla, 2022



Dinámica de compuestos alelopáticos en suelos agrícolas en relación con su aprovechamiento como plaguicidas naturales

Firmado por GALAN PEREZ
JOSE ANTONIO - **** el
día 16/09/2022
con un certificado emitido
por AC FNMT Usuarios

Memoria que presenta

Jose Antonio Galán Pérez

*para optar al título de Doctor por la
Universidad de Sevilla*

Dinámica de compuestos alelopáticos en suelos agrícolas en relación con su aprovechamiento como plaguicidas naturales

Visado en Sevilla, a 16 de septiembre de 2022

LOS DIRECTORES

Dra. Beatriz María Gámiz Ruiz
Investigadora Postdoctoral del CSIC

Dr. Rafael Celis García
Investigador Científico del CSIC

EL TUTOR

Firmado por FLORIDO
FERNANDEZ MARIA DEL

Dra. María del Carmen Florido Fernández
Profesora Contratada Doctora de la Universidad de Sevilla



DOCTORA Dña. ROSARIO VAZ PARDAL, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA, MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Dinámica de compuestos alelopáticos en suelos agrícolas en relación con su aprovechamiento como plaguicidas naturales”, presentada por D. Jose Antonio Galán Pérez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el marco del Programa de Doctorado en Recursos Naturales y Medio Ambiente del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola.

VAZ
PARDAL
MARIA
ROSARIO - 



PROFESOR DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Dinámica de compuestos alelopáticos en suelos agrícolas en relación con su aprovechamiento como plaguicidas naturales”, presentada por D. Jose Antonio Galán Pérez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), bajo la dirección de los Drs. Dña. Beatriz María Gámiz Ruiz y D. Rafael Celis García, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

FERNANDEZ LUQUE
JOSE ENRIQUE - DNI

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de los Proyectos AGL2017-82141-R y PID2020-112563RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación, durante el disfrute de un contrato predoctoral (PRE2018-083293) asociado al primero de los proyectos y cofinanciado con fondos FSE de la Unión Europea.

Agradecimientos

Sería injusto adentrarse en las profundidades de esta Tesis sin tener presente al finito número de personas, pero infinito de hechos que, de un modo u otro, han contribuido a la consecución de esta Tesis.

En este sentido, quiero dar las gracias a mis Directores de Tesis: el Dr. Rafael Celis García, por su inestimable ayuda, capacidad de trabajo, amabilidad, guía, paciencia, enseñanzas, y un largo etc. Ha sido un placer poder trabajar con una persona tan brillante. Con él sólo se puede aprender, gracias. Y a la Dra. Beatriz Gámiz Ruiz, son tantos los motivos para estarte agradecido que no sé ni empezar. En el ámbito laboral son más que evidentes, gracias por guiarme, por ser paciente conmigo, por darme confianza, por ser un ejemplo de trabajo, constancia y tesón. Eres una gran persona. Espero que pronto consigas todo lo que mereces. Gracias.

Al Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla, particularmente a la Dra. M^a del Carmen Florido Fernández, Tutora de esta Tesis, por su interés y entera disposición para la realización de la misma.

A los Catedráticos del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla: la Dra. Susana Redondo Gómez y el Dr. Enrique Mateos Naranjo, por animarme a optar como candidato a esta Beca de Doctorado y su interés constante por su avance.

A la Dra. Ana Segura Carnicero, de la Estación Experimental del Zaidín, por la concesión de una Beca de la RED de Suelos, la cual me permitió realizar una estancia breve en el CEBAS. Al Dr. Carlos García Izquierdo por su cálida acogida y su preocupación por mí durante esta estancia, así como a todo el Grupo de Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos, plagado de buenas personas que me acogieron y me ayudaron durante la misma. Gracias.

A la Dra. Ivana Pavlovic del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Córdoba por haberme proporcionado las hidrotalcitas empleadas en esta Tesis Doctoral.

Al IRNAS por su acogida, particularmente a todo el Grupo de Agroquímica Ambiental del IRNAS, mis compañeros que me acogieron como uno más, desde el principio, sin reservas:

A la Dra. Lucía Cox por haberme adoptado en su laboratorio, su trato, deferencia hacia mí. A Gracia, por su disponibilidad siempre, al Dr. Miguel Real por sus conversaciones de madrugón en aquella época de entrar tan temprano. A la Dra. María Jesús Calderón por su paciencia para enseñarme todo lo que sé sobre HPLC y ayudarme a solucionar todos los problemas asociados, que no han sido pocos. A la Dra. Rocío López-Cabeza que, aunque su llegada ha sido la más reciente (en esta Tesis, porque en el grupo lleva mucho más que yo), ha supuesto una nueva compañera en el lado oscuro de la Fuerza, gracias por tu disposición en los estadios finales de la Tesis, y por supuesto, a Pilar Velarde (Pili), un confidente, dentro y fuera del laboratorio, no hay palabras que te pueda dedicar que puedan expresar la gratitud y afecto que te tengo, a ti, a Jesús, tus hijos, y todos los tuyos. A Layla, Fran, Marta Gil, Marta Velasco, Miguel, Alba Cuecas, Alba Lara, Alicia, María, Carlos, Javi, Kike, Josan, Pablo y Antonio. Aunque no os he conocido demasiado a ninguno, habéis sido importantes al final, cuando el estrés más apremiaba.

A mis amigos de la facultad, a los que reencontré de casualidad de nuevo durante el doctorado: Álvaro, María, Josemi y Manolo, y los amigos que en momentos tristes no me quisieron perder. Gracias, Chema. A los míos, mis amigos de siempre, a los que quiero y siempre me reciben cuando retorno: Ale, Ester, Sergio (Paco), Jesús (Muguito), Gabri, Jesús, Rocío, Elías, Marchena, Antonio, Lata, Marien e Iván. A los miembros de Piso Topex, Ezekie y Marco, por estar ahí desde siempre y en esta complicada última etapa, por ser dos personas tan maravillosas y sabias. Os quiero mucho. A Blanca, por todos estos años, por haber crecido juntos, siempre serás mi amiga. A mi compañero, amigo y hermano M. Yuste, realmente no puedo plasmar lo que has sido y eres en mi vida.

A mi familia,

A Jose Manuel por su predisposición, alegría y belleza humana, a mi hermana M^a del Mar, por ser ejemplo, por creer en mí más que nadie y estar siempre cuidándome. Y a su familia perruna Duna y Lela por amor incondicional.

A la Dra. Campos, por aparecer. *“Un mago nunca llega tarde, Frodo Bolsón. Ni pronto. Llega exactamente cuándo se lo propone”*. Por traer a Groggu con sus mordisquitos con ronroneo.

A mis padres, por su sacrificio constante, por su confianza plena, por brindarme de todas las oportunidades que he necesitado, porque siempre han estado ahí en mis peores momentos. Por tanto, por todo. Espero que estéis orgullosos.

En memoria de mi tía Carmen

La preocupación social por la elevada toxicidad y persistencia que presentan los plaguicidas sintéticos que se utilizan para controlar las plagas, malas hierbas y enfermedades de los cultivos está acrecentando el interés por la búsqueda de nuevas sustancias con menores efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana. El empleo de plaguicidas basados en compuestos naturales está recibiendo una gran atención y, dentro del amplio abanico de compuestos naturales existentes, aquellos para los que se han descrito propiedades alelopáticas constituyen una importante fuente de inspiración para su desarrollo. Pese a sus ventajas, el uso de compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales presenta algunas limitaciones, entre las que destacan la dificultad de trasladar el comportamiento observado para estos compuestos en condiciones de laboratorio a condiciones reales de campo y la de predecir su eficacia bajo escenarios agronómicos concretos de aplicación. En gran medida, estas dificultades son consecuencia de la escasa información de la que se dispone acerca de los factores que gobiernan la biodisponibilidad y persistencia de los compuestos alelopáticos una vez que alcanzan el suelo, como medio en el que deben ejercer su acción.

La presente Tesis Doctoral se planteó con el objetivo de mejorar el conocimiento relativo a los procesos de transferencia y transformación que pueden sufrir en el suelo dos compuestos representativos de importantes familias de alelopáticos, la hidroxycumarina **escopoletina** y el monoterpeno **pulegona**. Dos aspectos específicos que se tuvieron en cuenta fueron el estudio del posible comportamiento enantioselectivo para pulegona, por presentar un centro quiral en su estructura, y el empleo de materiales adsorbentes en estrategias de estabilización de los compuestos que pudieran llevar a mejorar su eficacia como herbicidas naturales.

La memoria se presenta siguiendo el formato de compendio de publicaciones sobre la base de los cuatro artículos publicados a partir de los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral. Los Capítulos I-IV incluyen una introducción que justifica la unidad temática de los artículos publicados, los objetivos planteados y un resumen global de los resultados alcanzados. En el Capítulo V se recopilan las cuatro publicaciones resultantes del trabajo y en el Capítulo VI se establecen las conclusiones finales del mismo.

Además de poner de manifiesto la importancia de considerar el papel que el suelo puede ejercer en la biodisponibilidad de los compuestos alelopáticos y, por tanto, en la funcionalidad de estos, los resultados de esta Tesis también identifican posibles estrategias dirigidas a mejorar su actividad como alternativas fitosanitarias respetuosas con el medio ambiente, a partir de superar algunas de las limitaciones que a menudo se asocian a su uso con dicha finalidad.

Índice

Capítulo I: Introducción.	1
I.1. Problemática del uso de los plaguicidas en la actualidad.	3
I.2. Uso de compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales.	11
I.2.1. Compuestos naturales para la protección de cultivos.	11
I.2.2. Alelopatía.	13
I.2.3. Clasificación de los compuestos alelopáticos.	17
I.2.3.1. Compuestos fenólicos.	17
I.2.3.2. Terpenoides.	21
I.2.3.3. Compuestos alelopáticos con átomos de N.	25
I.2.4. Ventajas y limitaciones del uso de compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales.	26
I.3. Dinámica de los compuestos alelopáticos en el suelo.	31
I.3.1. Procesos de transferencia o transporte.	32
I.3.1.1. Adsorción-desorción.	32
I.3.1.2. Lixiviación.	44
I.3.1.3. Otros procesos de transporte.	49
I.3.2. Procesos de transformación.	50
I.3.2.1. Degradación abiótica.	51
I.3.2.2. Degradación biótica.	52
I.3.2.3. Enantiomerización.	57

I.4. Estrategias de modulación del comportamiento de los compuestos alelopáticos en el suelo: uso de arcillas y de enmiendas orgánicas como adsorbentes.	59
I.4.1. Uso de compuestos laminares como adsorbentes.	61
I.4.1.1. Filosilicatos.	62
I.4.1.2. Hidróxidos dobles laminares.	69
I.4.1.3. Granulación de compuestos laminares para su aplicación como adsorbentes.	73
I.4.2. Uso de enmiendas orgánicas como adsorbentes.	75
I.4.2.1. El alperujo como enmienda agrícola.	76
I.4.2.2. El biochar de alperujo.	77
I.4.2.3. Efectos de la adición de alperujo en la dinámica de los plaguicidas y compuestos alelopáticos.	78
Capítulo II. Objetivos.	81
Capítulo III. Resumen de resultados y discusión.	85
III.1. Efecto de las propiedades del suelo en la biodisponibilidad de escopoletina y en la expresión de su actividad fitotóxica.	87
III.2. Uso de enmiendas orgánicas y materiales laminares como moduladores de la adsorción, persistencia y bioactividad de escopoletina en el suelo.	90
III.3. Gránulos de organoarcilla como adsorbente de escopoletina y su aplicación como soportes del compuesto alelopático para protegerlo de una rápida degradación en el suelo.	93
III.4. Caracterización enantioselectiva de la adsorción, disipación y fitotoxicidad del monoterpeno pulegona en suelos agrícolas.	97

Capítulo IV. Bibliografía.	101
Capítulo V. Publicaciones.	131
V.1. Artículo I.	133
V.2. Artículo II.	161
V.3. Artículo III.	177
V.4. Artículo IV.	195
Capítulo VI: Conclusiones.	221

Capítulo I

Introducción



I.1. Problemática del uso de los plaguicidas en la actualidad

Según las Naciones Unidas, el crecimiento de la población mundial generará un aumento de casi mil millones de personas en los próximos diez años y de dos mil millones en los próximos treinta (Fig. 1A). Debido a las diferencias económicas y sociales, el ritmo de crecimiento variará de una región a otra. África y Asia, por ejemplo, abarcarán la mayor parte del crecimiento poblacional (Fig. 1B), por lo que desempeñarán un papel esencial en cuanto a las dimensiones y la distribución de la población mundial en las décadas venideras.

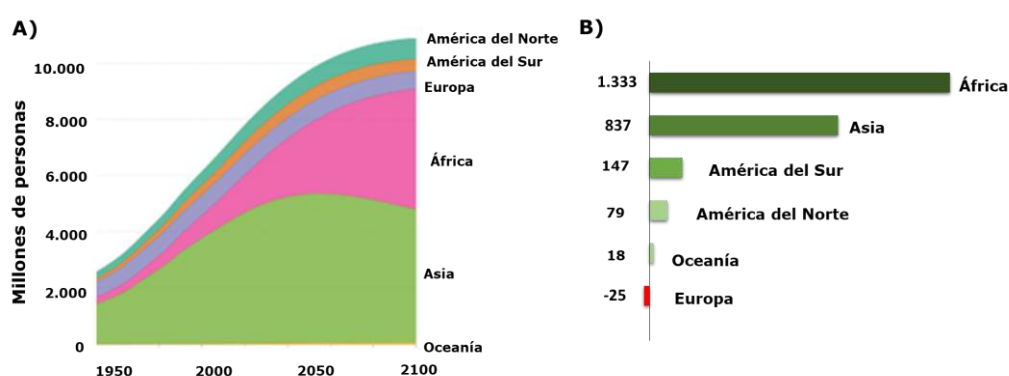


Figura 1: A) Evolución y proyección futura de la población mundial por continentes (adaptación de AEPLA, 2019); B) Crecimiento esperado de la población mundial por continentes en términos absolutos (millones de personas) en el intervalo comprendido entre 2015 y 2050 (adaptación de AEPLA, 2019).

La Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que, para poder abastecer a los casi diez mil millones de personas que poblarán el planeta en el año 2050, se necesitará aumentar la producción de alimentos en un 70% (AEPLA, 2019). Este aumento sin precedentes de la demanda de alimentos a nivel mundial va a suponer un gran reto para el sector agrícola, ya que, teniendo en cuenta que la superficie de cultivo es limitada, tendrá que alcanzarse mayoritariamente a través del crecimiento de la productividad, y no, como ha ocurrido en el pasado, a través de un aumento de la superficie de cultivo (AEPLA, 2019). En este sentido, se prevé que únicamente el 20% del aumento de la producción del futuro provendrá del incremento de la tierra de cultivo, mientras que el 80% restante tendrá que conseguirse a través de mejoras en la productividad (FAO, 2019).

Para aumentar la productividad de los cultivos y afrontar el crecimiento demográfico, el uso de productos fitosanitarios basados en plaguicidas sintéticos constituye una herramienta fundamental. Existen estimaciones que indican que, sin el uso de estas sustancias, las pérdidas en las cosechas oscilarían entre un 32% para cereales y un 78% para frutas (Cai, 2008). Los productos fitosanitarios, definidos como formulados de plaguicidas utilizados para proteger los vegetales y sus productos de organismos nocivos, contribuyen a aumentar los rendimientos en la agricultura y a asegurar una buena calidad de los alimentos (FAO & ITPS, 2017; MITECO, 2019). Entre los diferentes tipos de plaguicidas existentes destacan los fungicidas, insecticidas, herbicidas, molusquicidas, rodenticidas, nematocidas y reguladores del crecimiento (MAPA, 2021).

Según datos de la FAO (2019), el consumo mundial de plaguicidas por unidad de superficie cultivada ha ido creciendo desde 1990, en el que el consumo medio fue de 1.55 kg/ha, hasta alcanzar los 2.69 kg/ha en 2019, lo que supone un crecimiento del 43%. No obstante, si se analizan los datos por continentes, se obtienen resultados muy dispares. Por ejemplo, América aumentó el empleo de plaguicidas por superficie cultivada un 56%, alcanzando los 3.7 kg/ha en 2019, que es un valor muy superior a la media mundial. Un caso antagonista es el del continente africano, cuyo consumo en 2019 solo llegó a los 0.39 kg/ha. A nivel europeo, ha existido un aumento progresivo del consumo en los últimos 30 años, aunque se haya estabilizado en la última década en torno a los 1.66 kg/ha (Fig. 2). España se desmarca ligeramente de esta tendencia, pasando de emplear 1.96 kg/ha en 1990 a 3.66 kg/ha en 2019, lo que supone un crecimiento del 47% (Fig. 2). Este valor es muy superior al de Europa (19%), pero muy cercano a las cifras mundiales (46%). De las 75397 toneladas de materias activas comercializadas en España durante 2019, el grupo de los fungicidas y bactericidas fue el más empleado (44%), seguido por los herbicidas (23%), molusquicidas (22%) y, más de lejos, por los insecticidas (11%) y reguladores del crecimiento (0.2%) (Fig. 3). La importancia de la agricultura en España la sitúa como el país con mayor producción y diversidad agrícola de la Unión Europea, colocando a la producción primaria como uno de los sectores estratégicos de la economía, no sólo por su propia importancia como sector, sino por la relación y el efecto que genera sobre sectores estrechamente vinculados, con los que, conjuntamente, conforma una de las primeras industrias del país.

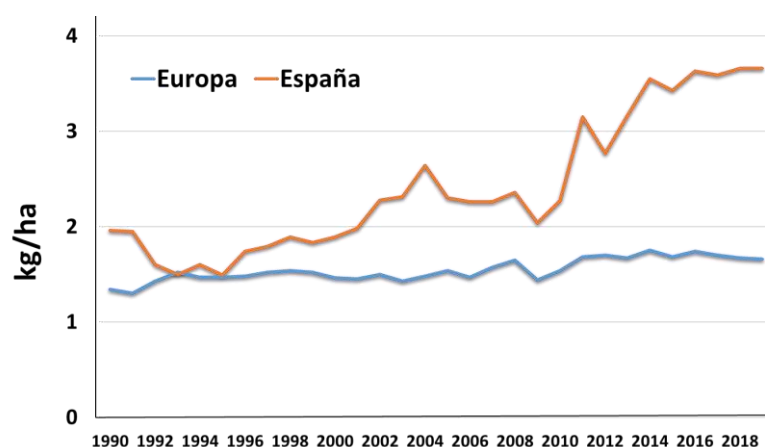


Figura 2: Uso de plaguicidas (kg) por superficie de cultivo (ha) en Europa y España desde 1990 hasta 2019 (adaptado de FAOSTAT, 2022).

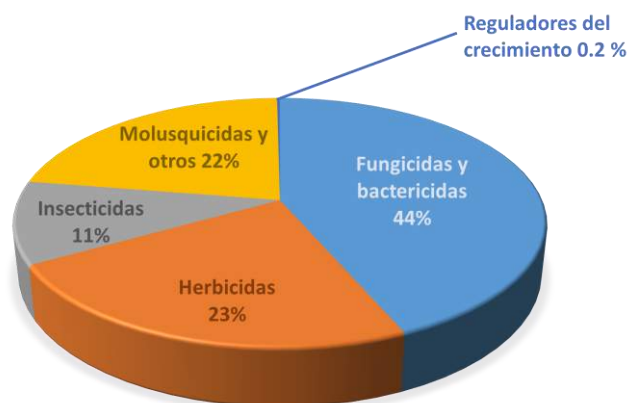


Figura 3: Cantidades relativas de fitosanitarios comercializados por los titulares autorizados en España durante el año 2019 para los principales grupos de sustancias activas (MAPA, 2021).

Aunque, desde su introducción a mediados del siglo pasado, la importancia de los plaguicidas sintéticos como herramientas para aumentar la productividad de los cultivos ha sido incuestionable, su uso no ha estado exento de controversia, principalmente por los riesgos que la presencia de sus residuos en alimentos y compartimentos ambientales, como suelos, aguas y sedimentos, puede entrañar para los seres humanos, animales y el medio ambiente.

Hay que señalar que no existen muchos estudios de monitorización de residuos de plaguicidas en suelos y no existen límites establecidos en la legislación europea para catalogar un suelo como contaminado por plaguicidas. A nivel internacional, Silva et al. (2019) demostraron la presencia generalizada de plaguicidas en 317 muestras de suelos agrícolas de toda la Unión Europea. En el estudio se demostró que más del 80% de los suelos analizados contenían residuos de plaguicidas, encontrándose residuos de un único compuesto en el 25% de las muestras y residuos de dos o más plaguicidas diferentes en el 58% de las mismas (Fig. 4).

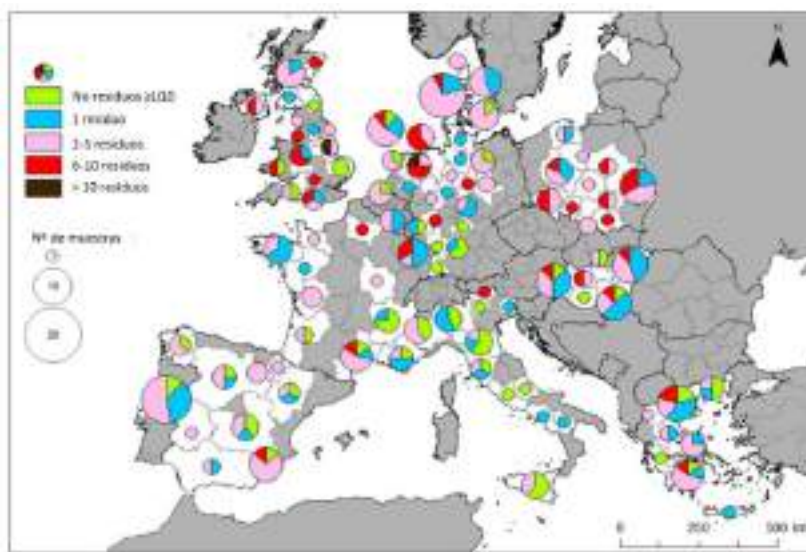


Figura 4: Número de residuos de plaguicidas encontrados por Silva et al. (2019) en suelos de la Unión Europea. Los diagramas representan la proporción de muestras con 0, 1 o múltiples residuos (2-5, 6-10, >10). El tamaño de los diagramas se corresponde con el número de muestras analizadas (adaptado de Silva et al., 2019).

Recientemente, Pelosi et al. (2021) estudiaron la presencia de plaguicidas de uso más común en suelos y en lombrices de tierra presentes en los mismos, considerando a estas como organismos beneficiosos para la salud de los suelos y que no son objetivo de los plaguicidas aplicados. En el estudio, analizaron 31 plaguicidas de distintas familias en 180 suelos de zonas de cultivos en Francia. Lo que encontraron fue la presencia de al menos uno de los plaguicidas en todos los suelos analizados y en el 92% de las lombrices muestreadas ($n= 155$), no solo procedentes de zonas directamente tratadas con los plaguicidas sino también de zonas no

tratadas, como setos, pastizales y cereales de agricultura ecológica. Detectaron también mezclas de al menos un insecticida, un herbicida y un fungicida en un 90% de los suelos y en el 54% de las lombrices, a niveles que podrían entrañar riesgo de toxicidad crónica en estos organismos beneficiosos. Los autores concluyeron que sus resultados podrían suponer alteraciones de la biodiversidad, dificultad de recuperación y efectos perjudiciales en las funciones de los ecosistemas estudiados.

A nivel nacional, existen varios trabajos de monitorización de plaguicidas que reflejan la presencia de estas sustancias en suelos agrícolas de nuestro país. Plaza-Bolaños et al. (2012) encontraron residuos de los insecticidas DDT y endosulfano en suelos de la provincia de Almería a niveles similares a los encontrados por otros autores en suelos europeos. Pose-Juan et al. (2015) detectaron residuos de los fungicidas metalaxil (11.5 µg/kg) y triadimenol (26.1 µg/kg), los herbicidas fluometurón (174.6 µg/kg) y terbutilazina (403.3 µg/kg) y el insecticida metoxifenoazida (4.61 µg/kg) en suelos de La Rioja dedicados al cultivo de viñedos. Masiá et al. (2015) identificaron al insecticida clorpirifós como el plaguicida presente con mayor frecuencia y en mayor concentración (65.3 µg/kg) en suelos de la cuenca del Turia. Otros plaguicidas encontrados en el estudio fueron tiabendazol, imazalil, diazinón, piriproxifeno, hexitiazox, carbofurano, isoproturón, terbutilazina y terbumetona.

Las aguas superficiales y subterráneas son otros de los compartimentos ambientales particularmente susceptibles a la contaminación por plaguicidas. Terrado et al. (2010), por ejemplo, evaluó las principales fuentes de contaminación por compuestos orgánicos de suelos, aguas y sedimentos de la cuenca del río Ebro e identificaron a la agricultura como la principal fuente de contaminación difusa para las aguas superficiales y subterráneas. Hermosín et al. (2013) llevaron a cabo una monitorización a largo plazo de las concentraciones de varios herbicidas aplicados en el olivar y algunos de sus metabolitos más representativos en aguas superficiales y subterráneas de Andalucía (Fig. 5). Encontraron que las concentraciones medias anuales en aguas superficiales de los compuestos que se analizaron estuvieron en muchos casos por encima de los límites establecidos por la UE para el agua potable (0.1 µg/l para plaguicidas individuales y 0.5 µg/l para el total de plaguicidas), aunque mostraron una disminución en su concentración con el paso del tiempo. También observaron que las concentraciones de los herbicidas en aguas subterráneas eran menores que en las aguas superficiales y demostraron una relación directa entre las concentraciones de los herbicidas analizados y los procesos de escorrentía hacia aguas superficiales y lixiviación hacia aguas

subterráneas asociados a los periodos de lluvias intensas acaecidas durante el estudio. La concentración de herbicidas encontrada en las aguas también guardó relación con la solubilidad, la vida media y la dosis empleada de los herbicidas aplicados a los cultivos de olivar.



Figura 5: Puntos de muestreo seleccionados por Hermosín et al. (2013) para la monitorización a largo plazo de herbicidas presentes en aguas superficiales y subterráneas de Andalucía.

La aplicación repetida de los plaguicidas y su acumulación en el suelo también comprenden otros problemas como la resistencia gradual de plagas y sus consiguientes efectos adversos en la biodiversidad (Villaverde et al., 2016) y las funciones propias del suelo (FAO & ITPS, 2017; FAO, 2019). Por ejemplo, la creciente dificultad para llevar al mercado nuevos plaguicidas, con una media de 11 años y un coste medio de unos 250 millones de euros (AEPLA, 2019), ha generado la proliferación de malas hierbas resistentes a los herbicidas actuales, lo que supone una importante limitación en relación al rendimiento de los cultivos (Heap & Duke, 2018). La Fig. 6 muestra el aumento cronológico en el número de especies de malas hierbas resistentes a herbicidas sintéticos por mecanismos de acción, observándose que los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), que incluyen las sulfonilureas, imidazolinonas y triazolopirimidinas, son para los que se conocen más casos de resistencia en

la actualidad. En España podemos encontrar que el 31% de los productos fitosanitarios en uso tienen una antigüedad de más de 20 años en el mercado, lo que contribuye a la aparición de problemas de resistencia (AEPLA, 2019).

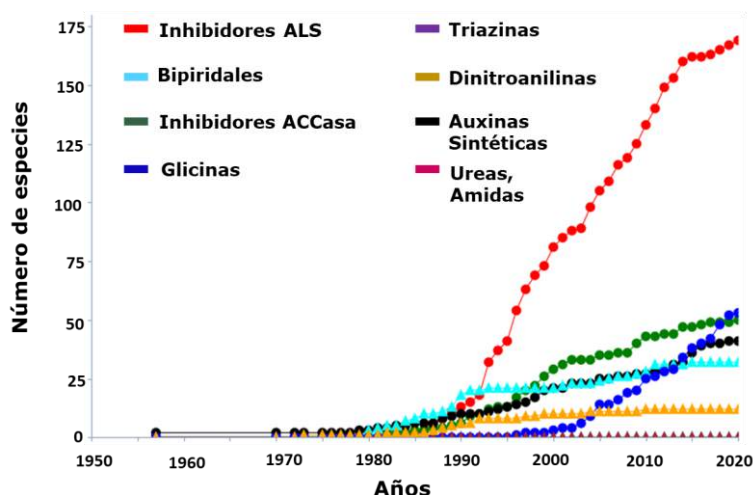


Figura 6: Aumento cronológico de las malas hierbas resistentes a herbicidas a nivel mundial (adaptado de Heap, 2022).

La demanda social de reducir los efectos perjudiciales que el uso de plaguicidas puede causar sobre el medio ambiente y la salud humana quedó plasmada en los objetivos europeos marcados en “Horizonte 2020” para el periodo de 2018-2020 dentro del Reto Social 2, entre los que se incluyó el reducir la actual dependencia que muestra la agricultura respecto a los plaguicidas sintéticos a través de la introducción de estrategias y productos alternativos con menores efectos adversos sobre organismos no objetivos, los recursos naturales y el medio ambiente (Unión Europea, 2022a). Este objetivo sigue presente en el nuevo programa marco de investigación e innovación de la Unión Europea para el periodo 2021-2027, “Horizonte Europa”, dentro de sus prioridades para una producción primaria sostenible (Unión Europea, 2022b), demostrando que el interés por encontrar alternativas a los plaguicidas sintéticos, más respetuosas con el medio ambiente y la salud humana, sigue siendo una prioridad internacional.

A nivel legislativo, la problemática relacionada con el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura quedó reflejada en la aprobación del reglamento (CE) No. 1107/2009 relativo a

la comercialización de productos fitosanitarios (Comisión Europea, 2009). Dicho Reglamento entró en vigor en 2011, derogando las directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE, con la finalidad de aumentar el nivel de protección sanitaria y medioambiental, contribuir a una mayor protección de la producción agrícola y ampliar y consolidar el mercado único de productos fitosanitarios. Esta y otras normativas complementarias han endurecido las condiciones de autorización, comercialización y aplicación de los productos fitosanitarios, reduciendo el número de plaguicidas sintéticos disponibles y estimulando el empleo de estrategias alternativas para la protección de los cultivos, así como el uso de sustancias con menor riesgo. Concretamente, el reglamento (CE) No 1107/2009 incentiva el registro de “sustancias de bajo riesgo” y de “sustancias básicas”, facilitando los trámites para su aprobación y ampliando los periodos de autorización respecto a aquellas sustancias que no cumplen los criterios para clasificarlas como tales (Czaja et al., 2015; Villaverde et al., 2016).

En este contexto, en los últimos años se ha intensificado la investigación relacionada con la búsqueda de nuevas clases de compuestos que satisfagan la demanda de plaguicidas con nuevos mecanismos y sitios de acción y bajo impacto sobre la salud humana y el medio ambiente. Entre estos compuestos destacan los producidos por organismos naturales, muchos de los cuales presentan potencial para ser utilizados directamente como plaguicidas naturales o como fuente de inspiración para el desarrollo de nuevos plaguicidas sintéticos de bajo riesgo consistentes en versiones mínimamente modificadas de sustancias naturales (Dayan & Duke, 2014; Sparks et al., 2017). Aunque existen evidencias de que los primeros usos de compuestos naturales como plaguicidas se remontan a tiempos muy antiguos, la presión por reducir los efectos adversos asociados al empleo de plaguicidas sintéticos convencionales en la agricultura, unida a un mayor conocimiento de los mecanismos y compuestos que rigen las interacciones entre organismos en la naturaleza, ha acrecentado el interés por explotar las propiedades de este tipo de sustancias para la protección de los cultivos (Macías et al., 2007; Belz, 2007; Isman, 2008; Cantrell et al., 2012; Soltys et al., 2013). En el marco de la actual legislación europea, muchas de estas sustancias podrían beneficiarse de las ventajas asociadas a su posible designación como “sustancias de bajo riesgo” o “sustancias básicas”, lo que supone un estímulo para su registro y comercialización (Czaja et al., 2015).

I.2. Uso de compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales

I.2.1. Compuestos naturales para la protección de cultivos

Las restricciones legislativas introducidas desde 2011 respecto a la comercialización y el uso de productos fitosanitarios han provocado la retirada de un gran número de plaguicidas sintéticos. Este hecho, unido al aumento de plagas resistentes a los plaguicidas actuales y al interés social por los denominados “productos ECO” (Czaja et al., 2015), ha provocado que el mercado actual de fitosanitarios se esté encaminando hacia la búsqueda de nuevas sustancias que cumplan con los requisitos de ser más respetuosas con el medio ambiente y representar un menor riesgo para la salud humana. En este contexto surge como posible solución el uso de *plaguicidas naturales* o *bioplaguicidas*, términos que hacen referencia a aquellos plaguicidas consistentes en compuestos naturales u organismos vivos (Czaja et al., 2015; Villaverde et al., 2016). Conviene destacar, no obstante, que, aunque el uso del término bioplaguicida ha ido en aumento en los últimos años, no existe un consenso a nivel legislativo en cuanto a su definición. La USEPA, por ejemplo, los define como aquellos plaguicidas derivados de animales, plantas, bacterias y algunos minerales, mientras que en la UE no existe una definición específica. En el contexto de la presente Tesis Doctoral, el término plaguicida natural hará referencia a aquellos plaguicidas basados en compuestos naturales, más que a organismos vivos.

La legislación europea suele enmarcar a los plaguicidas naturales como sustancias básicas o de bajo riesgo, para las cuales no es necesario establecer niveles máximos de residuos en alimentos debido a que sus efectos perjudiciales para el consumidor se consideran despreciables. Las sustancias que cumplen este requisito se recogen en el Anexo IV del Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo (Unión Europea, 2005; Czaja et al., 2015). Se estima que los riesgos toxicológicos asociados a los plaguicidas naturales son, por lo general, menores que los que representan los plaguicidas sintéticos debido a que la mayoría de ellos poseen una elevada selectividad/especificidad y sus efectos sobre organismos no diana son mucho menores. No obstante, el hecho de que una sustancia sea de origen natural no le exime de la obligación de pasar una evaluación exhaustiva antes de aprobar su uso como plaguicida y de catalogarla como sustancia de bajo riesgo. No todas las sustancias naturales son inocuas para los seres humanos y el medio ambiente y, de hecho, algunos de los compuestos con una mayor toxicidad en mamíferos, como la aflatoxina o la palitoxina, son de origen natural (Sparks & Duke, 2021).

A pesar de que los plaguicidas naturales todavía representan un porcentaje menor en el mercado que los plaguicidas convencionales (Robin & Marchand, 2019; Sparks & Duke, 2021) (Fig. 7), su tasa de crecimiento anual supera el de los plaguicidas sintéticos y su desarrollo está en plena expansión. Como ejemplo, la Fig. 8 muestra los nuevos ingredientes activos registrados por la USEPA entre los años 1997 y 2010 en función de su origen. Se observa que el 36% de las nuevas sustancias registradas son compuestos naturales. Les siguen los plaguicidas de origen sintético con un 31%, los de origen biológico (organismos vivos o grandes biomoléculas producidos por los mismos) con un 27% y finalmente los plaguicidas sintéticos pero derivados de compuestos naturales, con un 6%. La suma de las nuevas sustancias registradas basadas en compuestos naturales y de origen biológico representan un 63% del total, lo que pone de manifiesto la importancia que está recibiendo en los últimos años el desarrollo de este tipo de sustancias (Cantrell et al., 2012).

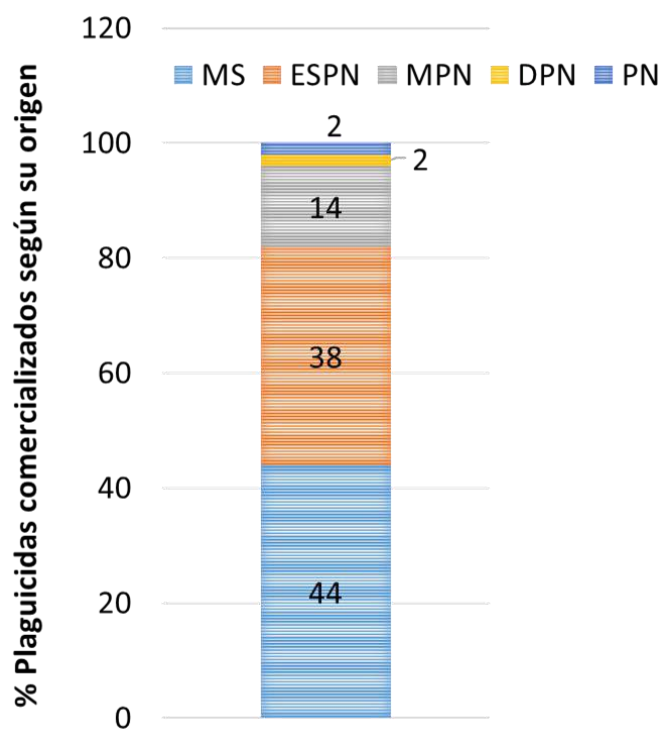


Figura 7: Mercado de plaguicidas consistentes en compuestos sintéticos y naturales: moléculas sintéticas (MS), equivalentes sintéticos de productos naturales (ESPN), mímicos de productos naturales (MPN), derivados de productos naturales (DPN) y productos naturales (PN) (datos de 2014, según Sparks & Duke, 2021). No se incluyen los plaguicidas de origen biológico.

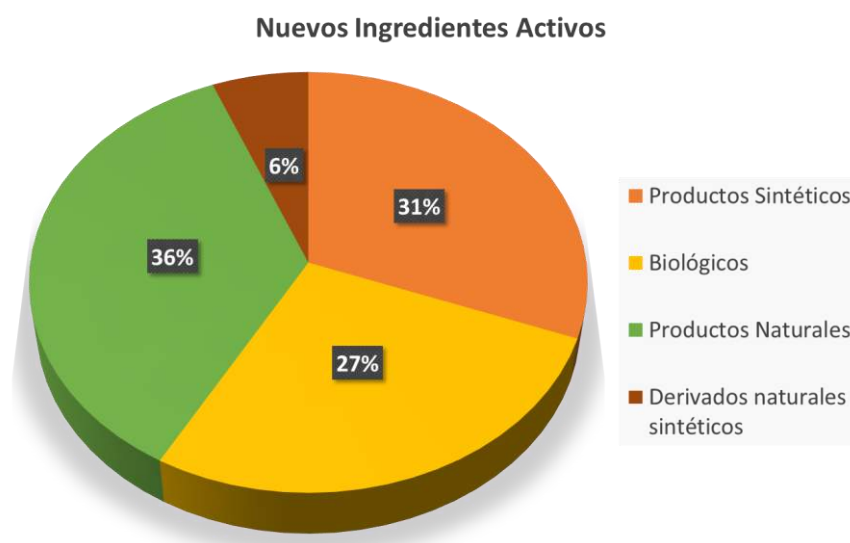


Figura 8: Nuevos ingredientes activos de plaguicidas registrados por la USEPA desde 1997 a 2010 en función de su origen (adaptado de Cantrell et al., 2012).

I.2.2. Alelopatía

En los ecosistemas naturales y agrícolas, muchos metabolitos secundarios liberados por plantas, microorganismos, virus y hongos pueden afectar positiva o negativamente al crecimiento y desarrollo de organismos vecinos a través del fenómeno conocido como *alelopatía* (Molisch, 1937; Rice, 1984; IAS, 1996). Aunque se trata de un fenómeno ya descrito desde tiempos remotos por autores como Teofrasto (371-287 a.C.) o Plinio “el Viejo” (ca. 23-79 d.C.), el concepto actual de alelopatía se ha desarrollado a raíz de la intensificación de su estudio a partir de los años setenta y de su mejor comprensión a partir de mediados los noventa, cuando comenzaron a estar disponibles técnicas avanzadas para la extracción, purificación, caracterización estructural y estudio de la bioactividad de compuestos orgánicos (Weston, 2005).

Aunque inicialmente la alelopatía despertó interés como un proceso ecológico natural básico determinante de la abundancia y distribución de especies vegetales y de las interacciones entre cultivos y otras plantas (Cheng & Cheng, 2015; Macías et al., 2019; Bachheti et al., 2019), hoy en día también está recibiendo una gran atención por la posibilidad

de usarla en el ámbito aplicado del manejo de plagas (Macías et al., 2019; Lorenzo et al., 2020). En este sentido, una de sus aplicaciones más prometedoras recae en el descubrimiento de compuestos alelopáticos que puedan actuar como plaguicidas naturales y reemplazar a los análogos sintéticos (Fig. 9). Un aspecto que favorece esta aplicación es la continua mejora de la instrumentación dirigida a la identificación de compuestos químicos en matrices complejas y que ha reducido el tiempo y los esfuerzos necesarios para aislar compuestos bioactivos, disparando en los últimos años el número de nuevas moléculas propuestas como posibles agentes alelopáticos y, por consiguiente, como potenciales plaguicidas naturales (Duke et al., 2002; de Albuquerque et al., 2011).

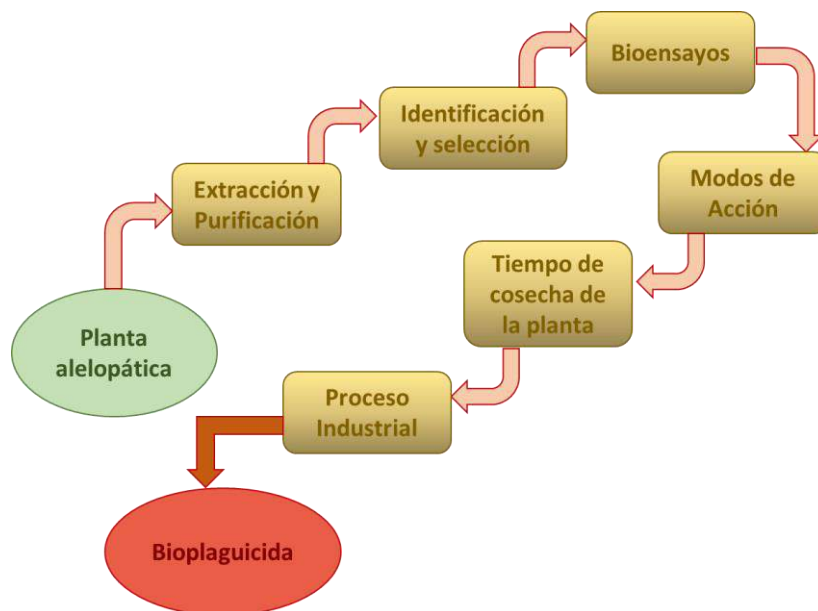


Figura 9: Procedimiento para producir un bioplaguicida comercializable (adaptación de Scavo & Mauromicale, 2021).

Además de su uso como materias activas (inalteradas o levemente modificadas), los compuestos alelopáticos también pueden utilizarse para la protección de los cultivos a través de su liberación a partir de plantas alelopáticas o de la adición al suelo de residuos de estas (Cheng & Cheng, 2015). Se considera que estas aplicaciones podrían permitir, en un contexto de control integrado de plagas, reducir las grandes cantidades de plaguicidas sintéticos

convencionales que se utilizan actualmente en la agricultura y, con ello, los efectos adversos relacionados con la elevada toxicidad y desarrollos de resistencias asociadas a los mismos (Duke et al., 2002; de Albuquerque, 2011). El fenómeno de la alelopatía se puede explotar en distintos sistemas de cultivo, pero sus efectos pueden jugar un papel particularmente beneficioso en la agricultura ecológica y de conservación, donde el control de plagas resulta más problemático (Scavo & Mauromicale, 2021). A continuación, se describen brevemente las principales formas de aprovechamiento de la alelopatía basadas en la liberación “in situ” de agentes alelopáticos, las cuales han sido recientemente revisadas por Jabran et al. (2015):

Establecimiento de cultivos alelopáticos: En los últimos años se viene consensuando que para que un cultivo sea considerado como alelopático ha de cumplir las siguientes características: i) afectar a la vegetación a su alrededor, ii) afectar al crecimiento del mismo u otros cultivos que se establezcan de forma sucesiva, iii) causar problemas de fatiga o agotamiento del suelo y iv) sintetizar y liberar compuestos alelopáticos bioactivos responsables de los efectos anteriores (Scavo & Mauromicale, 2021). En la actualidad se conocen un gran número de especies de plantas que poseen propiedades alelopáticas. Aunque la mayoría de ellas son malas hierbas, también se han identificado cultivos herbáceos y leñosos con efectos alelopáticos tanto en otros cultivos como en malas hierbas. La mayoría de los cultivos alelopáticos que se conocen pertenecen a las familias *Asteraceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae* y *Fabaceae* (Scavo & Mauromicale, 2021). En algunas regiones del mundo ya se está considerando la capacidad alelopática supresora de malas hierbas y otras plagas como una característica importante a la hora de seleccionar una variedad de cultivo determinada (Kong et al., 2011; Worthington & Reberg-Horton, 2013).

Rotación de cultivos: Plantar diferentes cultivos de forma secuencial en el mismo terreno es una estrategia agrícola tradicional que puede conllevar beneficios relacionados con el control de plagas, reducción de problemas de agotamiento del suelo, reducción del lixiviado de nutrientes, etc. A través de la liberación de agentes alelopáticos por un cultivo previo, la rotación de cultivos *per se* puede disminuir la proliferación de malas hierbas en el cultivo posterior y su uso combinado con otras estrategias de control de plagas puede favorecer incluso más dicho control (Garrison et al., 2014; Jabran et al., 2015). De acuerdo con Baker & Mohler (2015), la rotación de cultivos fue uno de los métodos más empleados por los agricultores de Nueva York para controlar las malas hierbas en cultivos ecológicos.

Intercalación de cultivos: Este método consiste en cultivar simultáneamente dos cultivos compatibles con el objetivo de conseguir mayores rendimientos tanto en producción como económicos. La intercalación de cultivos conlleva una mejora de la eficiencia en el uso de recursos, tales como la extensión de tierra, nutrientes, agua y luz (Jabran et al., 2015), pero además se puede usar como un método respetuoso con el medioambiente para el control de malas hierbas a través de un aprovechamiento de los procesos alelopáticos (Makoi & Ndakidemi, 2012). Un ejemplo lo encontramos en Saudy (2015), que observó cómo el intercalado de maíz con alubias ayudó a disminuir la incidencia de malas hierbas [*Echinochloa colona* (L.) Link., *Portulaca oleracea* L., *Chorchorus olitorius* L., y *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.], aproximadamente en un 50%, aparte de mejorar la eficiencia del uso de la tierra.

Cultivos de cobertura: Los cultivos de cobertura se implantan con la intención de mantener la sostenibilidad de un agro-ecosistema. Tienen numerosas ventajas, como mejorar la fertilidad y calidad de los suelos y disminuir el número de malas hierbas y patógenos de plantas (Jabran et al., 2015). Algunos sistemas de cultivo, principalmente los orgánicos, dependen en gran parte de cultivos de cobertura para el control de las malas hierbas (Mirsky et al., 2013). Altieri et al. (2011) observaron un efecto beneficioso de los cultivos de cobertura en la producción y control de malas hierbas en sistemas ecológicos a través de una combinación de efectos físicos, alelopáticos y sobre la calidad general del suelo. Se ha observado que, para el control de malas hierbas, el establecimiento de una mezcla de varios cultivos de cobertura puede resultar más efectivo que el establecimiento de un único cultivo individual, por producir una mayor variedad de compuestos alelopáticos que pueden actuar de forma sinérgica (Jabran et al., 2015).

Empleo de restos vegetales como abonos verdes: La incorporación al suelo de restos vegetales procedentes de plantas alelopáticas ha demostrado ser una estrategia que puede disminuir el número de malas hierbas a través de la liberación de compuestos alelopáticos que tiene lugar durante la descomposición de los restos vegetales (Jabran et al., 2015). Dhima et al. (2006), por ejemplo, observaron que la aplicación de restos de cebada a un cultivo de maíz redujo la incidencia de *S. verticillata* y *E. cruz-galli* hasta en un 80% a la vez que aumentó el rendimiento del cultivo en un 45%. Al igual que en el caso de los cultivos de cobertura, la aplicación simultánea de restos vegetales procedentes de diversas plantas alelopáticas puede

mejorar el control de malas hierbas a través de un efecto sinérgico de los compuestos liberados (Khaliq et al., 2010).

I.2.3. Clasificación de los compuestos alelopáticos

Hasta la fecha, se han caracterizado muchos compuestos alelopáticos con diferente estructura química y actividad biológica. La primera clasificación se realizó basándose en su origen biosintético e incluye a los compuestos alelopáticos más citados, siendo por tanto la clasificación más empleada (Macías et al., 2007). A continuación, se describen las principales familias de compuestos alelopáticos según esta clasificación.

I.2.3.1. Compuestos fenólicos

Constituyen un amplio grupo de compuestos alelopáticos con distintos grados de complejidad estructural, destacando los compuestos fenólicos simples, los flavonoides, las cumarinas y las quinonas. Recientemente, también se han incluido en este grupo distintos compuestos aromáticos derivados de líquenes, como los dépsidos y depsidonas (Macías et al., 2007).

Compuestos fenólicos simples: Estos compuestos se caracterizan por su diversidad estructural y variabilidad intraespecífica. Generalmente, son sintetizados en plantas por la vía de las pentosas fosfato a través de la ruta del ácido shikímico. Las principales funciones de estos compuestos en las plantas son la de atracción de polinizadores y protección frente a herbívoros (Li et al., 2010), habiéndose también descrito para ellos tanto actividad herbicida como fungicida (Sobolev et al., 2006; Santana et al., 2009). De manera general, los estudios de fitotoxicidad de compuestos fenólicos simples se han centrado en ensayos con compuestos previamente conocidos y especies estándar, donde la especie *Lactuca sativa* ha sido la más utilizada. Los fragmentos de acetofenona tales como la 4-hidroxiacetofenona y la 2,4-dihidroxiacetofenona parecen contribuir de forma significativa a la actividad de los fenoles, aunque el esqueleto fenólico no es el único fragmento responsable de la actividad, tal y como describen Yang et al. (2016) al evidenciar la mayor toxicidad de *S*-(+)-isosclerona comparado con (-)-regiolona.

De acuerdo con Macías et al. (2019), el potencial de los compuestos fenólicos simples para el control de malas hierbas ha sido sobreestimado por los investigadores. Esto se debe a

que, por su estructura simple y facilidad de análisis (Fig. 10), las investigaciones se han centrado en ellos, abandonando otros productos naturales que requieren una detección más compleja (Macías et al., 2019).

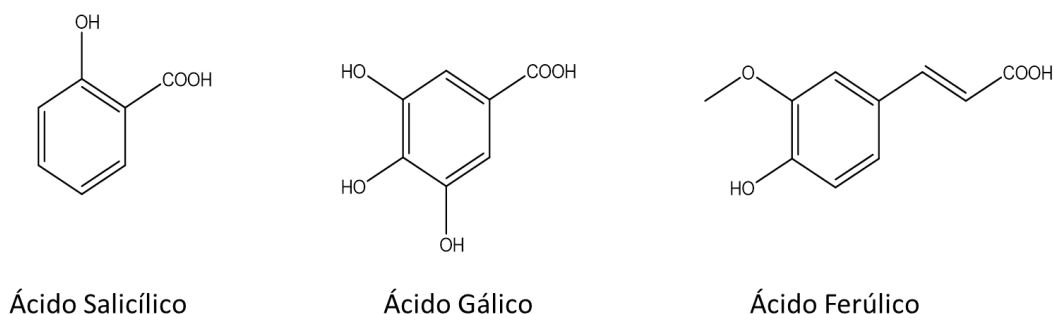


Figura 10: Algunos ejemplos de compuestos fenólicos simples.

Flavonoides: El término flavonoide se usa para describir una amplia colección de productos naturales que poseen un esqueleto C₆-C₃-C₆, o más específicamente, una función de fenilbenzopirano (Weston & Mathesius, 2013). Normalmente, se presentan en la naturaleza como glicósidos solubles en agua que se acumulan en las vacuolas de las células vegetales. En las plantas, sirven como pigmentos para atraer a organismos polinizadores y actúan como defensa química contra insectos y microorganismos patógenos (Tsao & McCallum, 2010). Algunos flavonoides son beneficiosos para la salud humana, como los derivados glicosídicos de la quercetina y el kaempferol (Fig. 11), que tienen propiedades antioxidantes (Chludil et al., 2008; Tsao & McCallum, 2010).

Los flavonoides han sido ampliamente estudiados, mostrando un gran potencial como posibles herbicidas. Su actividad resulta comparable a la de otros compuestos naturales como los terpenoides, pero tienen la ventaja estructural que les proporciona el encontrarse en forma de glicósidos, lo que contribuye a aumentar su solubilidad en agua (Calle et al., 2016). Entre sus limitaciones más importantes se encuentra su elevada reactividad en el suelo, donde con facilidad sufren reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y acetilación que pueden reducir considerablemente su bioactividad.

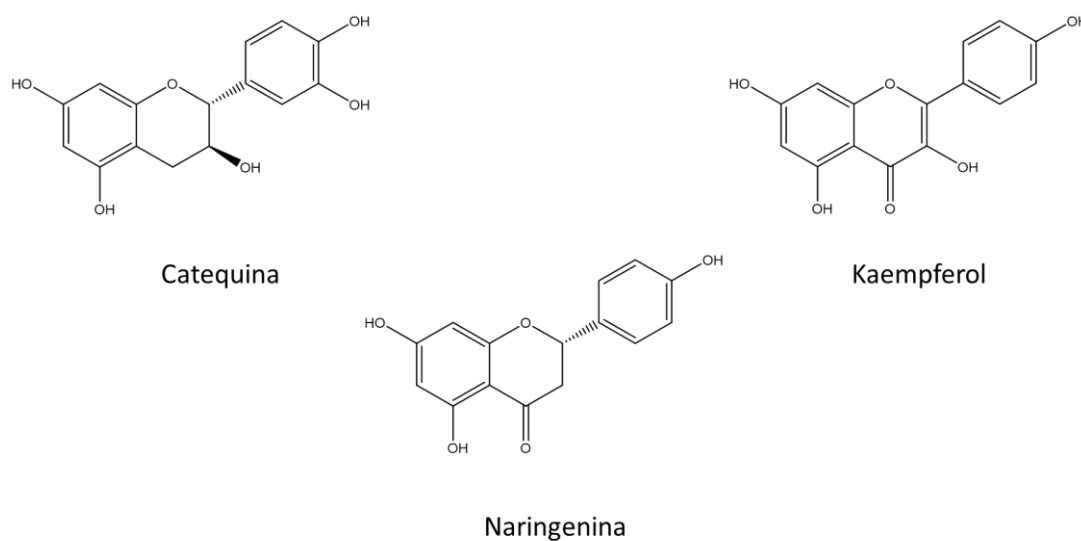


Figura 11: Ejemplos representativos de la familia de los flavonoides.

Cumarinas: Las cumarinas constituyen un grupo importante de compuestos alelopáticos de la familia de los polifenoles (Niro et al., 2016; Real et al., 2019). Están ampliamente distribuidas en las *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae* y *Fabaceae* y para ellas se han descrito propiedades relacionadas con su actividad herbicida, fungicida, insecticida, antibacteriana y nematocida (Razavi, 2011; Govea et al., 2020). Pan et al. (2015) examinaron varias cumarinas para relacionar su fitotoxicidad con su estructura y llegaron a la conclusión de que la presencia de un grupo hidroxilo en posición C7 contribuía significativamente a la bioactividad de las moléculas. En un estudio posterior, encontraron que la modificación del grupo hidroxilo en C7 de la 7-hidroxicumarina disminuía su fitotoxicidad y, sin embargo, mejoraba la actividad antifúngica del compuesto (Pan et al., 2017). El mecanismo fitotóxico de la 7-hidroxicumarina parecía implicar una vía de regulación mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inhibición de la fotosíntesis.

Los 7-hidroxiderivados, 7-hidroxicumarina (umbeliferona), 6,7-dihidroxicumarina (esculetina) y 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina), son las cumarinas más abundantes en la naturaleza (Jain & Joshi, 2012) (Fig. 12). La escopoletina, descrita por Robinson (1963) como la cumarina más común en plantas superiores, se ha encontrado en muchas especies de plantas mono y dicotiledóneas, así como en la rizosfera de los suelos (Winkler, 1967; Graña et al., 2017; Liu et al., 2018). Además de ser liberada a la rizosfera en respuesta a la limitación

de Fe (Clemens & Weber, 2016; Stringlis et al., 2019), también se ha sugerido su actividad alelopática (Baghestani et al., 1999; Serghini et al., 2001; Fernández-Aparicio et al., 2013; Liu et al., 2018; Ghimire et al., 2019). Graña et al. (2017), por ejemplo, demostraron que la escopoletina inducía fuertes efectos fitotóxicos en plántulas de *Arabidopsis thaliana* con una concentración inhibitoria media (IC_{50}) inferior a 50 μ M (9.6 mg/l). La escopoletina comprometió el desarrollo de las raíces al interferir en el ensamblaje de los microtúbulos y provocar la despolarización de la membrana mitocondrial y, en última instancia, la muerte celular, de manera similar a los herbicidas auxínicos, como el MCPA. Fernández-Aparicio et al. (2013) observaron un IC_{50} de escopoletina para el crecimiento radicular de la planta parásita *Orobanche crenata* de 11 mg/l, produciéndose un oscurecimiento de las células radiculares por necrosis que fue perceptible a concentraciones ≥ 7 mg/l. Estos resultados corroboraron estudios anteriores en los que se habían encontrado efectos inhibitorios de la escopoletina en diferentes cultivos y sobre distintas especies de malas hierbas (Einhellig et al., 1970; Fay & Duke, 1977; Baghestani et al., 1999).

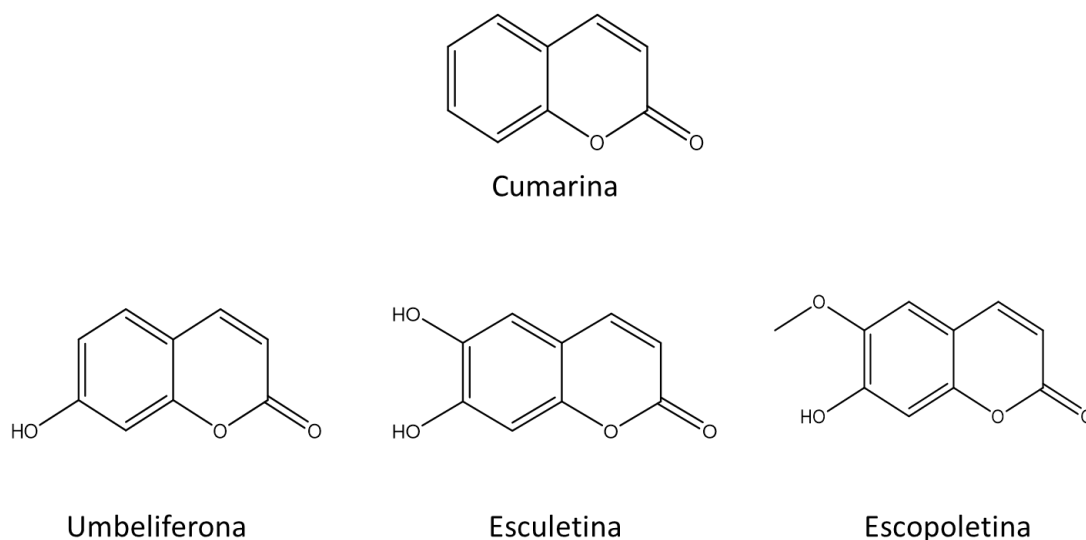


Figura 12: Cumarina y tres de las 7-hidroxycumarinas más abundantes.

Quinonas: Aunque estrictamente no son compuestos fenólicos, las quinonas a menudo se incluyen en este grupo por presentar cierta similitud estructural con los mismos. Las quinonas representan un grupo importante de compuestos alelopáticos principalmente debido a dos compuestos, la juglona y la sorgoleona (Fig. 13). La juglona fue el primer compuesto

para el que se verificó actividad alelopática, mientras que la sorgoleona, principal responsable de la actividad alelopática del sorgo, es uno de los compuestos alelopáticos más estudiados, habiéndose establecido tanto su ruta biosintética como los modos de acción responsables de su fitotoxicidad (Dayan et al., 2003, 2010). Li et al. (1993) propusieron, como mecanismo de acción para la juglona, la inhibición del consumo de oxígeno y su reactividad con los grupos tioles de la cisteína, glutatión y albúmina, demostrando una reducción de grupos SH en plántulas de cebada y alubia. La sorgoleona, por su parte, demostró ser fitotóxica a concentraciones en el rango micromolar a través de un mecanismo de inhibición del transporte de electrones en la fotosíntesis, similar al establecido para el herbicida sintético diurón (Nimbal et al., 1997).

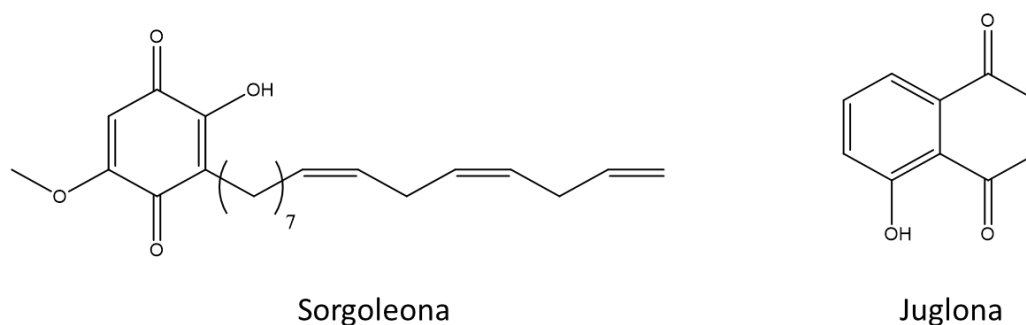


Figura 13: Estructura de las quinonas sorgoleona y juglona.

I.2.3.2. Terpenoides

Los terpenoides son metabolitos secundarios presentes en múltiples organismos y presentan un amplio abanico estructural y de actividad biológica. Su fuerte actividad alelopática, unida al avance en la instrumentación y metodología para su análisis y síntesis, ha despertado el interés en su desarrollo como posibles bioplaguicidas. Dentro de este grupo podemos encontrar monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y esteroides.

Monoterpenos: Los monoterpenos son hidrocarburos insaturados constituidos por diez átomos de carbono derivados de la unión de dos unidades de isopreno (Fig. 14). Conforman uno de los grupos más amplios e importantes de metabolitos secundarios dentro de los constituyentes volátiles de los aceites esenciales de flores y plantas aromáticas (Chaimovitsh et al., 2017). Son particularmente abundantes en familias como *Pinaceae* y *Umbelliferae*

(Abraham et al., 2000), pero también están presentes en otras plantas superiores y en algas (Amaral & Knowles, 1998). Se han descrito como responsables de las interacciones alelopáticas en algunas comunidades vegetales (Graña et al., 2013) y funcionan como defensa química contra insectos, hongos patógenos y herbívoros, fragancias atractivas para los polinizadores (Abraham et al., 2000) y como fitotoxinas para otras plantas (Weidenhamer et al., 1993). También se ha observado su actividad antimicrobiana contra ciertas bacterias (Amaral & Knowles, 1998).

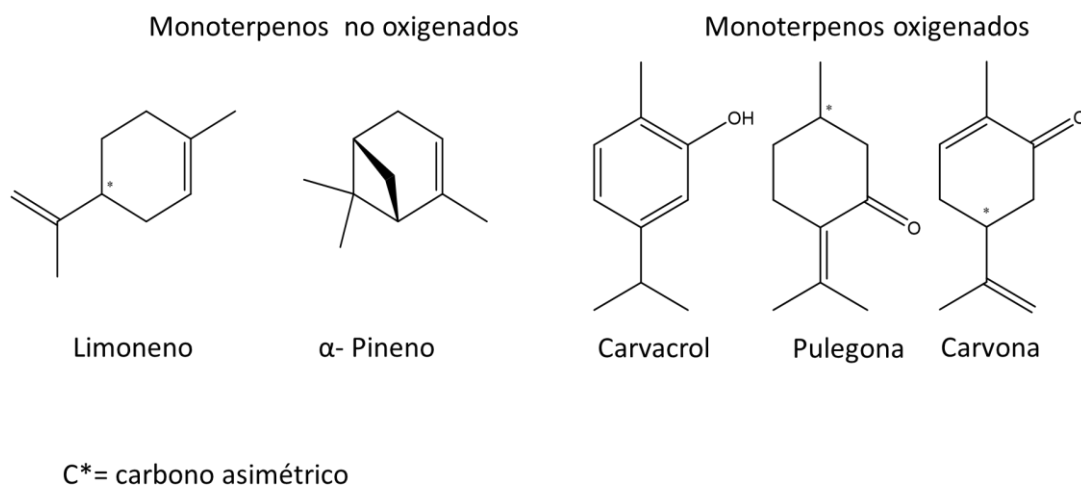


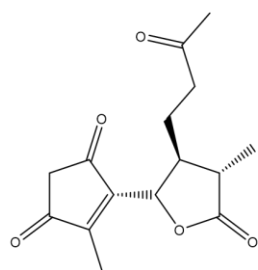
Figura 14: Algunos monoterpenos oxigenados y no oxigenados.

Las relaciones entre estructura y actividad de los monoterpenos no se conocen en profundidad. La información existente indica que parecen actuar sobre el aparato fotosintético produciendo altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), daños en los complejos antena, degradación de pigmentos debido a la peroxidación de lípidos y disminución de la eficacia del fotosistema II y del transporte de electrones. Sin embargo, no se han descrito sitios de acción específicos de forma inequívoca (Araniti et al., 2017; Macías et al., 2019). En un trabajo reciente sobre los modos de acción de (+)-limoneno y (+)-citronelal, Chaimovitch et al. (2017) señalan una alteración enantioselectiva en el ensamblaje de microtúbulos, en la funcionalidad de la F-actina (estructura responsable de la formación de microfilamentos proteicos necesarios para el citoesqueleto celular) y en la integridad de la membrana, demostrando la actividad enantioespecífica de estos compuestos. También se ha observado que los monoterpenos que contienen oxígeno en su estructura suelen presentar una mayor

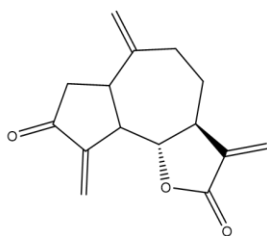
actividad fitotóxica que los monoterpenos hidrocarbonados, lo que podría estar relacionado con el hecho de que su mayor solubilidad en agua podría facilitar su absorción por las plantas (Weidenhamer et al., 1993; Chaimovitsh et al., 2017).

Sesquiterpenos: Se trata de terpenoides con 15 átomos de carbono que también abundan en los aceites esenciales y poseen un rango muy amplio de propiedades biológicas, como, por ejemplo, actividad antibacteriana, antifúngica e inhibidora del apetito de insectos u otros animales. En las plantas presentan un papel defensivo (Macías et al., 2009).

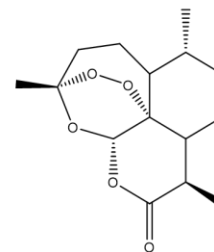
El subgrupo de sesquiterpenos formado por las lactonas sesquiterpénicas ha mostrado resultados particularmente prometedores como posibles herbicidas naturales. Macías et al. (2012) sintetizaron varias lactonas sesquiterpénica a través de un proceso fotoquímico de elevado rendimiento y evaluaron su actividad fitotóxica frente a las especies estándar *Lepidium sativum*, *Allium cepa*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*. La seco-guaianolida 1,10-dioxo-1,10-desoxi-1,10-seco-gorgonolida (Fig. 15) mostró una elevada actividad inhibiendo la germinación y/o el crecimiento de la raíz y el tallo de las especies ensayadas, llegando a ser incluso más fitotóxica que el herbicida sintético triasulfurón (Ortet et al., 2008; Macías et al., 2012).



1,10-dioxo-1,10-desoxi-1,10-seco-gorgonolida



Deshidrozaluzanina C



Artemisinina

Figura 15: Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas.

El mecanismo de acción de las lactonas sesquiterpénicas parece estar relacionado con la inducción de apoptosis, aunque también presentan actividad sobre importantes enzimas con grupos sulfhidrilo (Huang et al., 2010). Algunas lactonas sesquiterpénicas afectan a la membrana celular. Este es el caso de la deshidrozaluzanina C (Fig. 15), cuyo efecto a una concentración de 50 μ M fue incluso más pronunciado que el del herbicida sintético acifluorfen, que presenta un mecanismo de acción similar (Galindo et al., 1999).

Las principales limitaciones que presentan los sesquiterpenos para su uso como herbicidas naturales son la dificultad de obtenerlos en grandes cantidades y su escasa biodisponibilidad en el suelo. Las lactonas sesquiterpénicas, por ejemplo, a menudo exhiben una fuerte actividad herbicida en el laboratorio, pero funcionan mal en el campo debido a que presentan vidas medias muy bajas. Este fue el caso de la artemisinina (Fig. 15) que, aplicada a dosis superiores a 1 kg/ha, no consiguió proporcionar un control adecuado de malas hierbas (Duke et al., 2000).

Diterpenos, triterpenos y esteroides: Los diterpenos y triterpenos son terpenoides de 20 y 30 átomos de carbono, respectivamente. La mayoría se encuentran en la naturaleza en forma cíclica, los diterpenos en forma polioxigenada y los triterpenos formando sistemas de 1 a 5 anillos presentes fundamentalmente en las mitocondrias, microsomas y cloroplastos de las células (Cheng et al., 2010). Su principal función en las plantas es la de protección contra insectos, hongos y bacterias (Heftmann, 1975; Nes & Heftmann, 1981). Además, los triterpenos cíclicos pueden dar lugar a esteroides y saponinas, que también tienen importantes funciones biológicas.

Entre los diterpenos más estudiados destacan las momilactonas (Fig. 16), importantes compuestos alelopáticos producidos por *Oryza sativa* (Kato-Noguchi & Peters, 2013). En el caso de los triterpenos, algunos autores se han centrado en la actividad de sus derivados ácidos, por presentar mayor actividad que los propios triterpenos frente a especies monocotiledóneas (Wang et al., 2014). Uno de los principales problemas asociados a los triterpenos y esteroides es su posible autotoxicidad sobre el cultivo de origen, favorecida por una elevada estabilidad y baja solubilidad en agua del compuesto, que facilitan su retención y acumulación en el suelo. Por ejemplo, el esteroide ergosta-5-en-3-ol (Fig. 16) causó una reducción en la longitud de la radícula y tallo propios de plantas de tabaco (Ren et al., 2015). A pesar de que existen numerosos estudios sobre estos compuestos, la limitada actividad que presentan unida a su

complejidad estructural y, por tanto, a su dificultad de obtención y análisis, reducen su potencial como bioherbicidas (Macías et al., 2019).

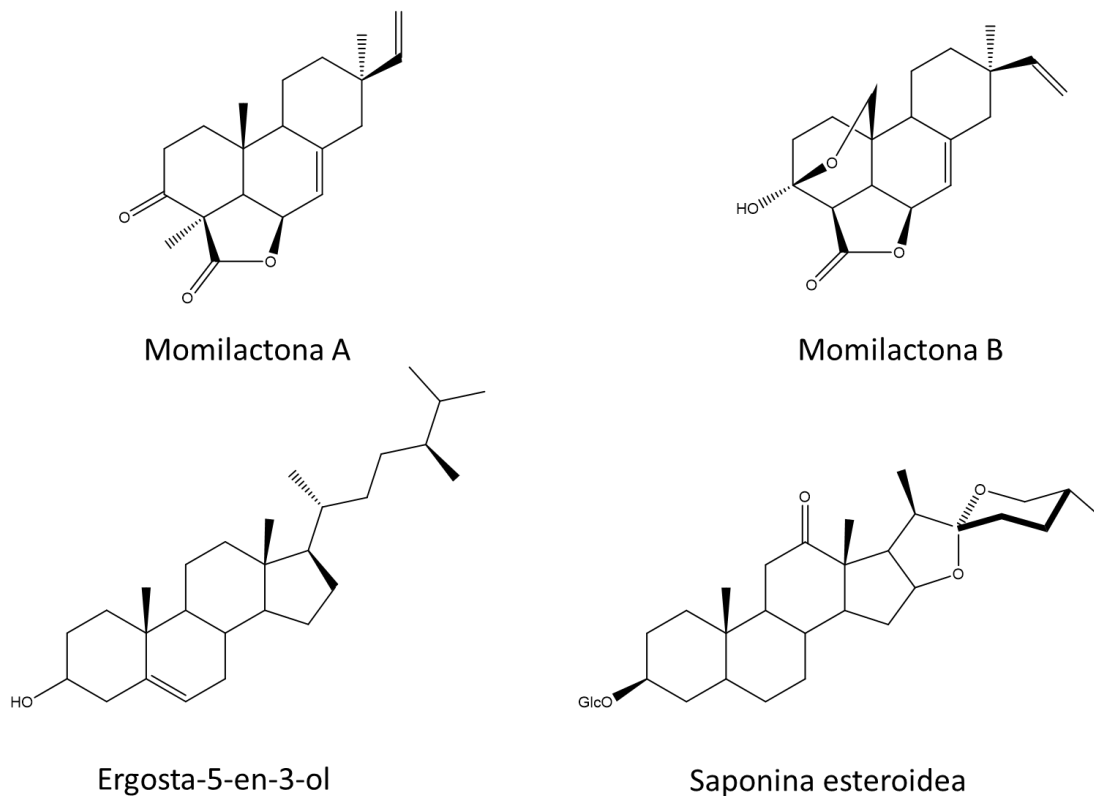


Figura 16: Ejemplos de diterpenos (momilactonas A y B), esteroide (ergosta-5-en-3-ol) y saponina esteroidea con cadena glucosídica en C-3.

I.2.3.3. Compuestos alelopáticos con átomos de N

Entre los compuestos alelopáticos que contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su estructura, los alcaloides, con al menos un átomo de N con carácter básico, constituyen el grupo más importante (Fig. 17). La mayoría de los alcaloides son derivados de aminoácidos, pero también pueden ser biosintetizados a partir de terpenoides, como en el caso de los alcaloides esteroides, o por la vía de los policétidos (Seupel et al., 2018; Ye et al., 2018), en cada caso usando un mecanismo distinto para incorporar el átomo de nitrógeno (Hotti & Rischer, 2017; Chen et al., 2018; Livshultz et al., 2018).

Cuando el alcaloide posee una cadena alifática, como es el caso de la sarmentina (Fig. 17), su modo de acción suele ser similar al de los ácidos grasos de cadena media, afectando a

la membrana celular y causando peroxidación. No obstante, para sarmentina se han propuesto mecanismos de acción adicionales como la inhibición del fotosistema II, al competir con la plastoquinona por sus sitios de unión (Dayan et al., 2015). Sin embargo, los mayores daños citotóxicos ocasionados por los alcaloides se dan sobre el ADN y ARN y enzimas asociadas, tales como las telomerasas, polimerasas o topoisomerasas (Sajitha et al., 2018; Filippin et al., 2018). Entre los alcaloides con mayor potencial como herbicidas naturales, los glucosinolatos, presentes en las *Brassicaceae*, constituyen uno de los grupos más importantes.

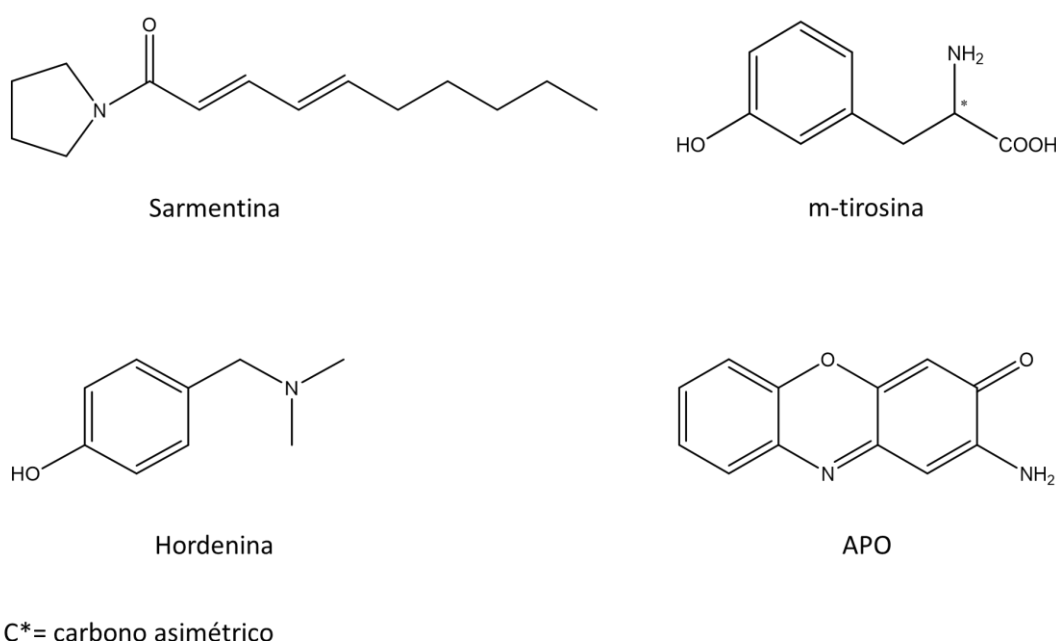


Figura 17: Algunos alcaloides con propiedades alelopáticas.

I.2.4. Ventajas y limitaciones del uso de compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales

Utilizar compuestos con actividad alelopática como plaguicidas naturales presenta una serie de ventajas, pero también ciertas limitaciones que deben tenerse en cuenta en el desarrollo e implementación de estas sustancias como alternativa eficaz para el manejo de plagas (Tabla I).

Las principales ventajas de los compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales se asocian a su composición química. Al contrario que en el caso de los plaguicidas sintéticos,

los compuestos alelopáticos se caracterizan por presentar un alto contenido en oxígeno y nitrógeno y un bajo contenido en halógenos (F, Cl, Br) y en anillos “no naturales” (Dayan et al., 2009; Soltys et al., 2013). Estas características favorecen la percepción de que la mayoría de los productos naturales son toxicológica y ambientalmente benignos (Dayan et al., 2012) y, además, contribuyen a hacerlos biodegradables, reduciendo su vida media en el medio ambiente. Su baja persistencia constituye una de las propiedades más atractivas a la hora de emplearlos. La rápida degradación por parte de los microorganismos reduce los problemas de contaminación, previniendo su llegada a aguas superficiales y subterráneas y reduciendo los residuos en el suelo y en alimentos. Todo ello disminuye los riesgos ecotoxicológicos y para la salud humana respecto a los plaguicidas sintéticos tradicionales (Villaverde et al., 2016). A raíz de estas características, los organismos reguladores tienden a facilitar el registro de estas sustancias como “sustancias básicas” o “de bajo riesgo”, lo que supone un estímulo para su comercialización (Unión Europea, 2017).

Tabla I. Principales ventajas e inconvenientes del uso de compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales.

Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Perfil toxicológico y ambiental. • Nuevos mecanismos de acción. • Las nuevas técnicas hacen más simple su análisis. • Buena aceptación pública. • Facilidad en su registro.
Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • Estructuras complejas que pueden encarecer la síntesis. • Pueden tener propiedades fisicoquímicas inadecuadas. • Su investigación y/o su fuente pueden tener un gran coste. • Su vida media en el medioambiente puede ser demasiado corta. • El público espera que su uso sea en bajas dosis.

Una ventaja adicional de los compuestos alelopáticos la constituye la variabilidad que suelen presentar en cuanto a los mecanismos de acción a través de los que actúan (Koch et al., 2005; Dayan et al., 2012) (Tabla II). En comparación con los plaguicidas sintéticos convencionales, los compuestos naturales a menudo presentan una mayor diversidad y

complejidad estructural, siendo frecuente que contengan centros quirales. Estas características les confieren una mayor especificidad asociada a nuevos sitios de acción que, en el desarrollo de nuevos plaguicidas, son muy demandados en la actualidad. Profundizar en los mecanismos de acción de los compuestos alelopáticos ayudará a explorar y comprender su papel ecológico y favorecerá el descubrimiento de plaguicidas con nuevos modos de acción. Esto último es relevante teniendo en cuenta el aumento de los problemas de resistencia a los plaguicidas sintéticos convencionales que se viene produciendo en las últimas décadas, motivado por el uso continuado de moléculas con los mismos mecanismos de acción. En el caso de los herbicidas sintéticos, por ejemplo, no se han lanzado al mercado materias activas con nuevos mecanismos de acción en las últimas décadas, existiendo una gran necesidad de combatir la resistencia generada por parte de las malas hierbas, además de compensar el descenso en el número de productos sintéticos autorizados que se ha producido en los últimos años (Cantrell et al., 2012).

Tabla II. Mecanismos de acción para procesos alelopáticos según Dayan et al. (2012).

Mecanismos de acción para procesos de aleopatía
Inhibición del fotosistema II y transporte de electrones.
Interrupción de la respiración y síntesis de ATP.
Producción de ROS.
Mecanismos alternativos sobre la síntesis de aminoácidos y crecimiento de la planta (auxinas y giberelinas).
Inhibición del fotosistema I.
Inhibición de la polimerización tubulina.
Acción sobre la ARN polimerasa

Junto a las ventajas mencionadas anteriormente, el uso de compuestos naturales como plaguicidas también tiene algunas limitaciones que han venido dificultando su desarrollo e implantación (Dayan et al., 2012). Una primera cuestión a tener en cuenta es que la creencia generalizada de que todo lo natural es saludable puede llevar a una posible subestimación de

su toxicidad frente a organismos no diana. Como se ha mencionado con anterioridad, no todas las sustancias naturales son inocuas para los seres humanos y el medio ambiente y, de hecho, algunos de los compuestos con una mayor toxicidad en mamíferos son de origen natural (Abbas et al., 1997; Dayan et al., 2012; Sparks & Duke, 2021). Esto obliga a una evaluación exhaustiva antes de aprobar el uso de compuestos naturales como plaguicidas y, en su caso, de catalogarlos como sustancias de bajo riesgo.

La escasa persistencia de los compuestos naturales en el medio ambiente constituye, junto a una de sus principales ventajas, su principal talón de Aquiles, pues una escasa vida media en el suelo puede llevar asociada una rápida pérdida de la eficacia biológica (Dayan et al., 2012; Chinchilla et al., 2015). Ante esta situación, se ha propuesto la modificación de compuestos naturales para dar lugar a plaguicidas más activos y selectivos, pero en ocasiones, variar ciertas propiedades fisicoquímicas para su correcta absorción y translocación puede ser contraproducente y no producir un efecto satisfactorio a una dosis económicamente viable (Dayan et al., 2009; Soltys et al., 2013). En relación con su estructura, la mayor diversidad y complejidad que caracteriza a los compuestos naturales, responsable de propiedades interesantes como una mayor especificidad asociada a nuevos sitios de acción, también los hace más difíciles de obtener o sintetizar (Duke et al., 2002).

Por último, la dificultad de trasladar el comportamiento de los compuestos naturales observado bajo condiciones de laboratorio a condiciones reales de campo y de predecir la eficacia de los mismos bajo escenarios agronómicos concretos de aplicación constituye un importante obstáculo para que su uso pueda extenderse (Bhadoria, 2011; Soltys et al., 2013; Cheng & Cheng, 2015). En gran medida, esta última dificultad es consecuencia de la escasa información existente acerca de los factores que gobiernan la biodisponibilidad y la persistencia de estos compuestos una vez que alcanzan el suelo, como medio en el que generalmente deben ejercer su acción (Inderjit, 2001; Kobayashi, 2004; Trezzi et al., 2016). Las discrepancias observadas en distintos estudios sobre su aplicación en escenarios diferentes han puesto de manifiesto la complejidad de los factores que gobiernan su biodisponibilidad en el suelo, los cuales, a fecha de hoy, no están bien establecidos. Esto se debe, en gran medida, a que la investigación sobre compuestos alelopáticos se ha centrado en la identificación y evaluación de su bioactividad en experimentos de laboratorio en ausencia de suelo, obviando el papel fundamental de este en la expresión de la actividad alelopática (Inderjit, 2001; Kobayashi, 2004; Kaur et al., 2009; Reigosa-Roger & Sánchez-Moreiras, 2010; Trezzi et al.,

2016). Muchos investigadores han expresado su preocupación acerca de la validez de extrapolar los resultados de los estudios de laboratorio realizados en ausencia de suelo a condiciones reales de campo (Bertin et al., 2009; Kaur et al., 2009; Hickman et al., 2021), remarcando que es crucial abordar el papel del suelo en la dinámica de estos compuestos para poder comprender su funcionalidad, así como para evaluar la viabilidad real de su posible aplicación como plaguicidas respetuosos con el medio ambiente (Macías et al., 2019; Bravetti et al., 2020).

I.3. Dinámica de los compuestos alelopáticos en el suelo

En la mayoría de las ocasiones, los compuestos alelopáticos liberados por las plantas entran en contacto con el suelo y sufren procesos de transporte y degradativos que influenciarán su acumulación y, por tanto, su actividad fitotóxica (Inderjit, 2001). Un conocimiento profundo sobre la interacción de los compuestos alelopáticos con el sistema suelo resulta, por tanto, fundamental para poder predecir su comportamiento final en el mismo (Fig. 18).

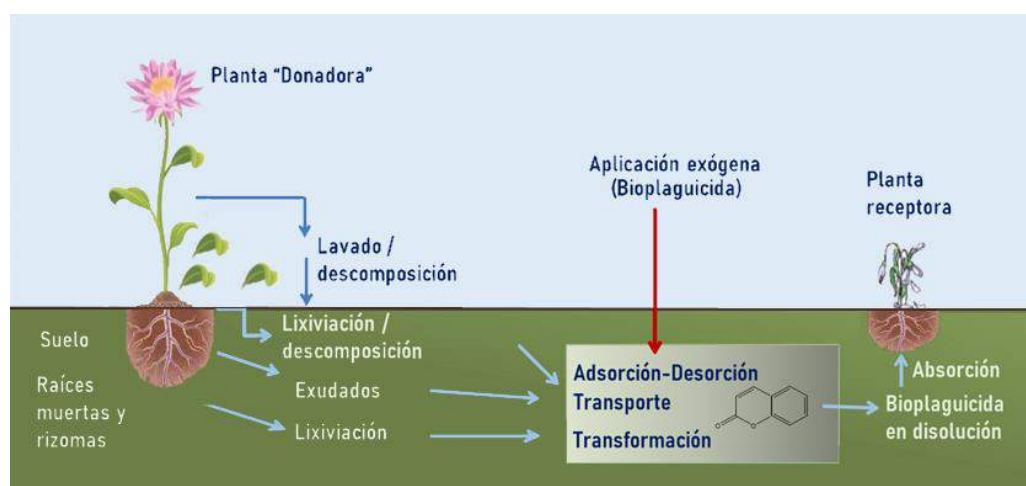


Figura 18: Procesos determinantes de la dinámica de los compuestos alelopáticos en los suelos (adaptado de Kobayashi, 2004).

La llegada de los compuestos alelopáticos al suelo de forma natural puede producirse por múltiples vías: 1) por exudación y deposición en la superficie de las hojas con posterior lavado por la lluvia; (2) por exudación de compuestos volátiles de las partes verdes vivas de las plantas; (3) por descomposición de residuos vegetales (por ejemplo, hojarasca o raíces muertas) y (4) por exudación de las raíces (de Albuquerque et al., 2011). Con posterioridad a estos pasos, el movimiento de los compuestos alelopáticos hasta el organismo receptor dependerá fundamentalmente de las condiciones edafoclimáticas y de las propiedades físico-químicas del compuesto, que marcarán su dinámica posterior a través de diversos procesos de transporte y transformación (Fig. 18).

La incidencia de los procesos de transporte y transformación puede ocasionar la pérdida de la bioactividad de los compuestos alelopáticos, dado que pueden desplazarlos

hacia lugares alejados del organismo receptor o transformarlos química o biológicamente a formas no activas. Los procesos de biodegradación juegan un papel primario en la actividad y destino de los compuestos alelopáticos en los suelos, ya que una característica distintiva de la mayoría de los compuestos alelopáticos es que son transformados rápidamente por los microorganismos del suelo (Bravetti et al., 2020). Frecuentemente, la transformación biológica da como resultado una rápida pérdida en la toxicidad o inactivación del compuesto alelopático, aunque ciertos procesos de transformación pueden activar compuestos no activos (Macías et al., 2007; Hiradate et al., 2010). La rápida degradación de las formas activas de los compuestos alelopáticos por los microorganismos del suelo representa un importante inconveniente para su aplicación como herbicidas, porque puede dar lugar a que el tiempo de residencia en el suelo sea insuficiente para desarrollar su actividad. En resumen, un conocimiento profundo de los procesos de transferencia y transformación que pueden sufrir los compuestos alelopáticos una vez que alcanzan el suelo resulta clave para poder predecir el comportamiento medioambiental de los mismos y potenciar su uso como plaguicidas naturales.

I.3.1. Procesos de transferencia o transporte

Los procesos de transferencia o transporte se caracterizan por movilizar al compuesto sin producir ninguna transformación en su estructura química. De entre todos los procesos de transporte destaca el de adsorción, dado que es el que controla la cantidad de compuesto en la disolución del suelo, que es la que estará disponible para sufrir otros procesos de transporte o para ser transformada. Además de por el proceso de adsorción, la transferencia o transporte de los compuestos alelopáticos en el suelo puede ocurrir por lixiviación, escorrentía, volatilización, absorción y difusión. A continuación, se describe cada uno de estos procesos, que son de aplicación no sólo a los compuestos alelopáticos sino a cualquier otro compuesto orgánico que pueda alcanzar el suelo.

I.3.1.1. Adsorción-desorción

La adsorción se produce cuando un compuesto (adsorbato) pasa de estar en disolución o en fase gaseosa a la superficie de un sólido (adsorbente) sin que exista un cambio en la estructura química del mismo. En el suelo, los más frecuentes son los procesos

de adsorción que tienen lugar entre la disolución del suelo y las partículas sólidas de este, limitándose la adsorción sólido-gas a escenarios de extrema aridez (Pignatello, 1989).

Existen distintos tipos de interacciones que son las responsables de la atracción entre los compuestos alelopáticos y los componentes del suelo (Kobayashi, 2004). En general, estas fuerzas son dependientes de las propiedades del adsorbato, así como de la superficie expuesta del sólido. Entre ellas predominan las interacciones de tipo van der Waals, iónicas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, enlaces covalentes, transferencias de carga y cambio de ligando (Fig. 19).



Figura 19: Mecanismos relacionados con la adsorción de plaguicidas en el suelo clasificados según la fuerza impulsora principal del proceso.

La desorción es el proceso inverso a la adsorción y se describe como el paso del adsorbato desde la superficie sólida del adsorbente a la disolución del suelo. Si la desorción se produce completamente con respecto a la cantidad de compuesto adsorbido, se dice que estamos ante una adsorción reversible (Wauchope & Myers, 1985; Monkiedje & Spiteller, 2002). Si, por el contrario, sólo es desorbible una fracción del total adsorbido estamos ante una desorción parcialmente irreversible (Cox et al., 1995; Celis & Koskinen, 1999; Fogg et al., 2003).

Los fenómenos de adsorción-desorción son considerados fundamentales para determinar la dinámica de un compuesto en el suelo, ya que los otros fenómenos de transporte y degradación dependen de la disponibilidad del compuesto, que vendrá dada por el grado de adsorción-desorción al que esté sometido.

Al igual que para los plaguicidas sintéticos, la adsorción de los compuestos alelopáticos a los constituyentes coloidales de los suelos, tanto minerales como orgánicos,

es un proceso clave a la hora de determinar su disponibilidad. De forma general, se considera que sólo la fracción del compuesto alelopático que queda en disolución está directamente disponible para ser absorbido por plantas diana (biodisponible), mientras la fracción adsorbida a los componentes del suelo no estará disponible para su absorción (Kobayashi, 2004; Kaur et al., 2009). No obstante, la reversibilidad de la fracción adsorbida puede convertirla en biodisponible a través del proceso de desorción y, por ello, la fracción adsorbida reversiblemente es denominada “potencialmente biodisponible” o “bioaccesible”. Finalmente, las fracciones adsorbidas de forma irreversible representan, junto con las pérdidas producidas por transporte y por procesos de transformación, las formas no bioaccesibles del compuesto alelopático (Semple et al., 2004; Kaur et al., 2009). Los experimentos realizados sin suelo en el laboratorio sobre la actividad de los compuestos alelopáticos tienden a sobreestimar la biodisponibilidad, al no considerar las fracciones adsorbidas, transformadas o transportadas que ocurren en los suelos (Fig. 20).

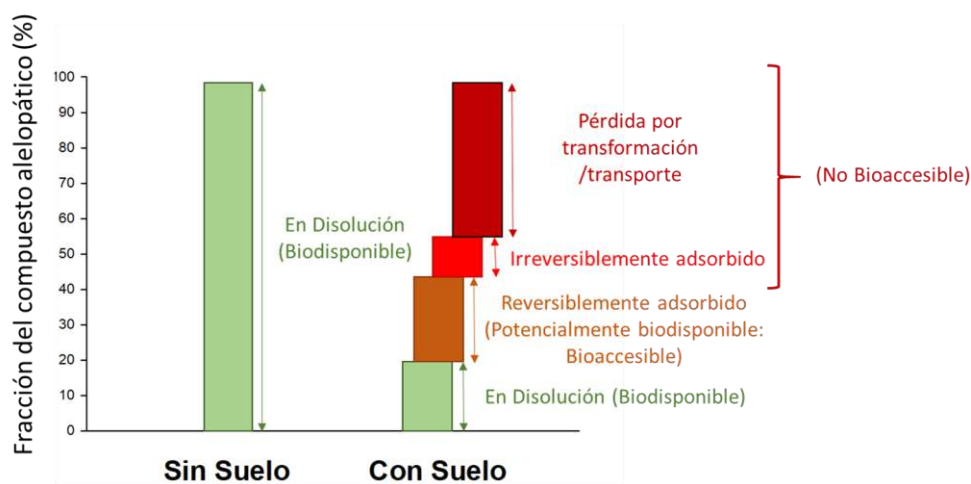


Figura 20: Representación esquemática de las diferencias en la biodisponibilidad de un compuesto alelopático hacia especies diana durante bioensayos llevados a cabo con suelo y sin suelo (basada en Kaur et al., 2009).

Muchos estudios han expuesto que compuestos alelopáticos que han presentado gran fitotoxicidad en agua o sustratos artificiales han mostrado una menor actividad, o incluso inactividad, en suelos naturales (Bertín et al., 2009; Hiradate et al., 2010; Travaini et al., 2016; Parepa & Bossdorf, 2016). Se ha discutido que la gran adsorción que se produce por los coloides del suelo sea la principal razón por la cual la actividad de los compuestos

alelopáticos no se exprese en algunos suelos (Trezzi et al., 2016). Sin embargo, también se ha señalado que la adsorción puede proteger a los compuestos alelopáticos de rápidas pérdidas por transporte y transformación, lo que podría prolongar su actividad (Kaur et al., 2009; Xiao et al., 2017). Por lo tanto, el potencial fitotóxico de los compuestos alelopáticos y su eficacia como herbicidas naturales estarán determinados en gran medida por su comportamiento ante los fenómenos de adsorción y desorción y por cómo estos influyen en los procesos de transporte y transformación (Fig. 21).

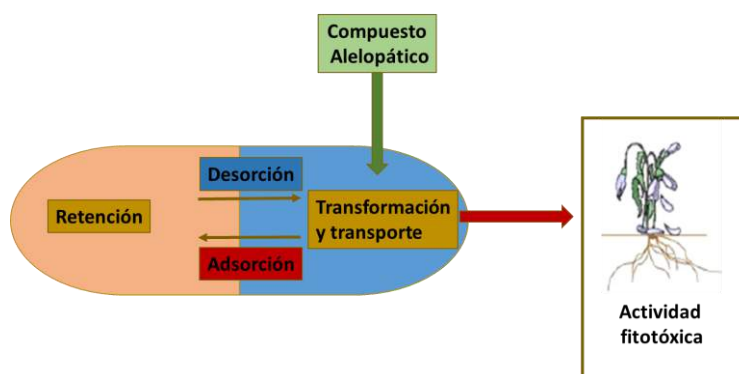
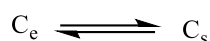


Figura 21: Diagrama esquemático que muestra los principales procesos que afectan a la biodisponibilidad de los compuestos alelopáticos en el suelo.

A título de ejemplo, Hiradate et al. (2010) comparó la actividad alelopática de la juglona en tres suelos (ceniza volcánica, aluvial y calcáreo) y encontró que su actividad se expresaba mucho más en el suelo calcáreo que en los otros dos suelos. De forma similar, la fitotoxicidad de compuestos alelopáticos fenólicos depende de la textura del suelo porque la adsorción sobre los minerales de la arcilla desempeña un papel importante en su polimerización oxidativa, que constituye un mecanismo que puede provocar su inactivación (Inderjit, 2001; Polubesova et al., 2010).

a) Medida de la adsorción- desorción

La adsorción-desorción es un proceso dinámico gobernado por la generación de equilibrios entre la cantidad de compuesto en disolución y la cantidad adsorbida. Este equilibrio se puede expresar como:



siendo C_e la concentración de soluto en disolución que está en equilibrio con el adsorbente, y C_s la cantidad adsorbida por unidad de masa de sólido.

Si se asume una dependencia lineal entre C_s y C_e , se puede calcular un coeficiente de distribución denominado K_d :

$$K_d = \frac{C_s}{C_e} \quad [1]$$

Para generar la ecuación 1, se supone una relación de proporcionalidad entre la concentración del compuesto en disolución o fase líquida y la concentración en el sólido o fase sólida. Esto suele ocurrir en los casos en los que la concentración de adsorbato en disolución es pequeña, para los que esta ecuación puede describir el comportamiento del equilibrio de forma precisa. Este coeficiente se emplea para comparar el grado de adsorción de distintos adsorbatos (compuestos alelopáticos) a un adsorbente (suelo) o de un mismo adsorbato (compuesto alelopático) a varios adsorbentes (suelos), para unas condiciones experimentales y concentraciones iniciales determinadas. Aunque en muchos casos se cumple la linealidad en esta relación, también es frecuente que el valor de K_d dependa de la concentración a la que se evalúe. Para estas ocasiones, es necesario obtener las denominadas *isotermas de adsorción*.

Para la obtención de las isotermas de adsorción, se pone en contacto una cantidad conocida del adsorbente con distintas disoluciones de concentración variable del compuesto estudiado a una determinada temperatura. La representación de la cantidad de compuesto adsorbido por unidad de masa del adsorbente (C_s) frente a su concentración en la disolución de equilibrio (C_e) da como resultado la isoterma de adsorción. Giles et al. (1960) definieron cuatro tipos generales de isotermas (Fig. 22) en función de la pendiente inicial de la curva, según las cuales se puede describir el mecanismo de adsorción y obtener información sobre la naturaleza del adsorbato y el adsorbente.

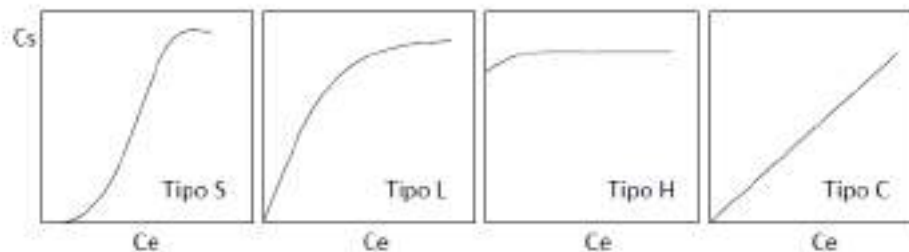


Figura 22: Los distintos tipos de isothermas de adsorción según Giles et al. (1960).

Existen distintas ecuaciones o modelos matemáticos capaces de relacionar la cantidad de soluto adsorbido (C_s) con la concentración acuosa en equilibrio (C_e) obtenidas experimentalmente. Una de las más empleadas es la ecuación empírica de Freundlich:

$$C_s = K_f C_e^{N_f} \quad [2]$$

Para facilitar la modelización se suele utilizar la forma linealizada de esta ecuación:

$$\log C_s = \log K_f + N_f \log C_e \quad [3]$$

En ambos casos, C_s es la cantidad de soluto adsorbida cuando se alcanza el equilibrio de la adsorción a una concentración de equilibrio C_e y K_f y N_f son constantes que se obtienen al ajustar linealmente los datos de la expresión logarítmica $\log C_s$ vs $\log C_e$. N_f se corresponde con la pendiente de la representación lineal de $\log C_s$ vs $\log C_e$ y se considera una medida de la intensidad de la adsorción. Asimismo, los valores de N_f están relacionados con el tipo de isoterma de adsorción:

Si $N_f = 1$; Tipo C

Si $N_f > 1$; Tipo S

Si $N_f < 1$; Tipo L

La constante K_f coincide con la cantidad de soluto adsorbida para la concentración $C_e = 1$, por lo que a veces se usa para comparar la adsorción en distintos sistemas soluto-adsorbente, siempre y cuando los ensayos se hayan llevado a cabo bajo las mismas condiciones experimentales (Bowman & Sans, 1985), los valores de N_f sean parecidos (Hance, 1967) y el valor de $C_e = 1$ esté dentro, o próximo, al intervalo de las concentraciones usadas experimentalmente (Hermosín & Cornejo, 1987).

• Desorción

La desorción es el proceso inverso a la adsorción. Las moléculas de compuesto adsorbido vuelven a la disolución debido a un cambio en la C_e , que puede producirse por fenómenos degradativos o de transporte que originen un cambio en el equilibrio moléculas adsorbidas-moléculas en disolución. Este proceso de “liberación” es fundamental en la dinámica y movilidad de los compuestos alelopáticos en el suelo, ya que determina su biodisponibilidad (Tharayil et al., 2006).

La desorción se evalúa normalmente en el laboratorio a través del método de diluciones sucesivas, mediante el cual, tras llevar a cabo la adsorción, se retira parte de la disolución en equilibrio y se adiciona una nueva disolución sin compuesto para volver a reestablecer el equilibrio. Si la isoterma de desorción difiere de la de adsorción, nos encontramos ante un fenómeno denominado *histéresis*, que proporciona información sobre la reversibilidad de la adsorción. Se puede medir por distintos índices, aunque uno de los más comunes es el coeficiente de histéresis (H), expresado como:

$$H = \frac{N_{f-des}}{N_{f-ads}} \quad [4]$$

siendo N_{f-des} y N_{f-ads} los coeficientes de Freundlich para la desorción y adsorción, respectivamente. Este coeficiente se presenta en un intervalo de 0 a 1, significando el valor 0 que el proceso es completamente irreversible y 1 que es un proceso completamente reversible, esto es, que las isotermas de adsorción y desorción coinciden (O'Connor et al., 1980; Barriuso et al., 1994).

La histéresis puede tener causas muy diversas. En algunos casos puede ser debida a artefactos experimentales como, por ejemplo, no haberse alcanzado el equilibrio durante la adsorción, el arrastre de partículas de adsorbente en la retirada del sobrenadante, pérdidas del compuesto por volatilización o degradación, así como por alteración del sistema (pH, fuerza iónica, etc.) al realizar los procesos de dilución (Koskinen & Harper, 1990; Gu et al., 1994). En otros casos, la histéresis se debe a la deformación de los poros del adsorbente, que modifica la ruta del soluto en relación a la adsorción (Washington et al., 2003), la generación de precipitados o una adsorción irreversible o desorción muy lenta, no observable a nivel experimental (Karickhoff, 1980; Celis & Koskinen, 1999).

b) Factores que afectan a la adsorción-desorción

• Naturaleza química del compuesto

Las características fisicoquímicas del adsorbato son fundamentales en los procesos de adsorción-desorción. La estructura (grupos funcionales y su posición, insaturaciones, etc.), carga (que determinará la naturaleza catiónica o aniónica del compuesto) y tamaño molecular, junto con su solubilidad en agua marcan las interacciones entre el compuesto y el adsorbente. En los compuestos alelopáticos abundan los grupos funcionales con átomos de oxígeno y nitrógeno, que confieren polaridad a la molécula y determinan, en gran medida, sus mecanismos de interacción.

• Composición coloidal del suelo

Los componentes coloidales del suelo son los minerales de la arcilla, los óxidos metálicos y la materia orgánica. Como característica principal común de todos ellos, destaca que presentan una gran superficie específica, como resultado de su pequeño tamaño de partícula (inferior a 2 μm), y una elevada reactividad superficial. Se puede distinguir entre los coloides de origen orgánico e inorgánico.

La fracción orgánica de los coloides del suelo la componen dos grupos de sustancias, no húmicas y húmicas. Las primeras están constituidas por glúcidos, proteínas, lípidos, ácidos orgánicos y otros compuestos de bajo peso molecular procedentes de diferentes restos vegetales y animales y que son fácilmente degradables por los microorganismos (Khan,

1980). Por otro lado, las sustancias húmicas están compuestas por ácidos fúlvicos (solubles en agua), ácidos húmicos (soluble en agua sólo a pH alcalino) y humina (insoluble a todos los pH), todos ellos estructuralmente relacionados (Pignatello, 2012). La fracción coloidal orgánica es la principal responsable de la adsorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos sin carga, existiendo una correlación entre la adsorción de estos compuestos y la cantidad de materia orgánica del suelo. Por tanto, la adsorción de compuestos orgánicos no polares a suelos y sedimentos depende linealmente del contenido en carbono orgánico, produciéndose un reparto entre la fase acuosa y la orgánica (Chiou, 2002; Boyd et al., 2011). No obstante, debido a la heterogeneidad de la materia orgánica, también puede existir selectividad en la adsorción de compuestos orgánicos, por la existencia de determinadas propiedades como la presencia de grupos funcionales específicos, estructura o configuración, polaridad o aromaticidad (Celis et al., 2006; Pignatello, 2012).

Los componentes inorgánicos comprenden mayoritariamente a los filosilicatos y a los óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos metálicos, principalmente de Fe, Al, y Si. Normalmente, se emplea el término “arcilla” para hacer referencia a aquellos componentes inorgánicos de tamaño $< 2 \mu\text{m}$, mientras que el término “minerales de la arcilla” designa a un tipo de minerales que se encuentran en la fracción del suelo con tamaño menor a $2 \mu\text{m}$ (Moore & Reynolds, 1987).

En la siguiente sección (I.4) se detalla más minuciosamente la estructura de los filosilicatos. Brevemente, se describen como compuestos que constan de unidades tetraédricas Si-O enlazadas a unidades octaédricas Al-(O, OH) ó Mg-(O, OH) formando capas cuyo apilamiento origina la estructura global del mineral. Son buenos adsorbentes para compuestos orgánicos catiónicos y polares como consecuencia de sus superficies hidrofílicas cargadas negativamente.

Los óxidos metálicos se forman por empaquetamiento cúbico o hexagonal de aniones hidroxilo y óxido con cationes metálicos (Fe^{3+} , Al^{3+} , Mn^{4+}) ocupando las posiciones octaédricas. Los óxidos metálicos presentan una elevada superficie específica y reactividad superficial y se les considera buenos adsorbentes para compuestos orgánicos (principalmente aniónicos) (Hingston et al., 1972; Filius et al., 1997; Celis et al., 1999b). Es importante resaltar que las características superficiales de carga de los óxidos metálicos son dependientes del pH del medio (Hingston et al., 1972).

Como consecuencia de las propiedades y características de los componentes del suelo más representativos (sustancias húmicas, filosilicatos y óxidos metálicos), las propiedades adsorbentes de estos componentes son susceptibles de modificarse, si en el suelo hay interacción entre ellos (Celis et al., 1999b; Illes & Tombacz 2004).

- Características de la disolución del suelo

Entre las características que presenta la disolución suelo, una de las más importantes y más influyente en los fenómenos de adsorción es el pH (Weber, 1982; Hermosín et al., 1987; Sarmah et al., 1998; Li et al., 2001). El pH de la disolución es el responsable de la carga superficial de los componentes del suelo que tienen carga variable, así como de la ionización de los compuestos con propiedades ácidas o básicas. El hecho de que los coloides presenten carga variable influye de forma directa sobre su capacidad de interaccionar con especies iónicas. Por ejemplo, los compuestos aniónicos, al disminuir el pH, aumentan su adsorción a los óxidos metálicos por un incremento de los centros con carga positiva en estos últimos. Por el contrario, los compuestos catiónicos disminuyen su adsorción a sustancias húmicas a pH bajos al producirse la protonación de los grupos carboxílicos de estas.

Otra característica de la disolución muy influyente en la adsorción es la fuerza iónica, especialmente en los fenómenos de adsorción por cambio iónico. En ellos, la competencia por los sitios de adsorción entre los iones de la disolución y el soluto hace que la adsorción se vea disminuida conforme mayor sea la fuerza iónica de la disolución (Watson et al., 1973). Se ha observado que, para moléculas neutras, una fuerza iónica superior a la unidad da como resultado una mayor adsorción, mientras que para valores por debajo de la unidad no existe una tendencia general (Calvet, 1989).

- Otros factores

Factores como la humedad del suelo, la temperatura y el tiempo de residencia del compuesto pueden jugar también un papel importante en los procesos de adsorción. Como norma general, al disminuir la humedad del suelo y la temperatura y al aumentar el tiempo de residencia suele aumentar la adsorción (Calvet., 1989).

c) Enantioselectividad del proceso de adsorción-desorción

Debido a las propiedades fisicoquímicas idénticas de los enantiómeros, a menudo se asume que, para compuestos quirales, los procesos ambientales abióticos, incluida la adsorción, no son enantioselectivos (Wong, 2006). En el caso de que se produjese una adsorción enantioselectiva en el suelo, otros procesos como la lixiviación, la escorrentía o la volatilización, se verían alterados, con la consiguiente contribución a la prevalencia de un enantiómero sobre el otro en los distintos compartimentos ambientales.

La enantioselectividad de los procesos se establece comparando la abundancia de un enantiómero (E_1) con la del otro (E_2) a través de la fracción enantiomérica o EF, usando la expresión recomendada por Harner et al. (2000):

$$EF = \frac{E_1}{E_1 + E_2} \quad [5]$$

donde E_1 y E_2 son las concentraciones de cada enantiómero. Los valores de EF oscilan entre 0 y 1, representando $EF = 0.5$ la mezcla racémica y $EF \neq 0.5$ el predominio de un enantiómero sobre el otro.

Muchos estudios han observado la ausencia de enantioselectividad en la adsorción en suelos de plaguicidas quirales como metalaxil (Celis et al., 2013; Gámiz et al., 2013; Sukul et al., 2013; Qin et al., 2014; López-Cabeza et al., 2016; Huang et al., 2017), benalaxil y furalaxil (Qin et al., 2014), tebuconazol (Gámiz et al., 2016b) o imazaquín (López-Cabeza et al., 2017). No obstante, a pesar de presentar un carácter no enantioselectivo, la adsorción puede afectar de forma indirecta a los residuos de compuestos quirales en el suelo. Celis et al. (2013), por ejemplo, demostraron que la mayor adsorción del fungicida metalaxil en suelos con elevados contenidos en arcilla podía reducir la disponibilidad de sus enantiómeros, restringiendo su biodegradación enantioselectiva, en comparación con suelos de textura más gruesa y que presentaron una menor adsorción. Los autores propusieron que la protección del plaguicida quiral era debida a la adsorción y atrapamiento en microporos, que derivó en un aumento de la persistencia del fungicida en su forma inicialmente racémica aplicada al suelo (Celis et al., 2013). Siguiendo en esta línea, existen pocos trabajos que hayan evaluado la enantioselectividad de la adsorción de compuestos alelopáticos y otros compuestos naturales quirales con potencial para ser utilizados como bioplaguicidas. Los

trabajos publicados para el ácido abscísico (Gámiz et al., 2016c; Gámiz et al., 2017a) o la carvona (Gámiz et al., 2018, 2019a) indicaron la ausencia de enantioselectividad en la adsorción, partiendo de disoluciones racémicas de estos compuestos en el estudio del proceso.

Para que se produzca enantioselectividad en la adsorción se requiere la existencia de un entorno quiral. En el suelo se da esta premisa, ya que algunos minerales y ciertas regiones de la materia orgánica son quirales y, por tanto, poseen potencial para interactuar de forma enantioselectiva con adsorbatos quirales (Pauzat et al., 2015). Existen varias razones que pueden explicar la aparente dificultad de observar procesos de adsorción enantioselectivos en los suelos. Las superficies aquirales del suelo, por ejemplo, pueden ser más abundantes que las quirales y, así, dificultar la observación de las interacciones enantioselectivas por los métodos experimentales convencionales (Celis et al., 2015; Gámiz et al., 2016a). Además, aunque los diferentes sitios de adsorción quirales en el suelo pueden causar una adsorción enantioselectiva a escala local o microscópica, debido a la heterogeneidad de los suelos, las diferencias pueden compensarse a escala global, dando lugar a una aparente falta de enantioselectividad (Gámiz et al., 2016a; Sanganyado et al., 2020). En esta línea, Celis et al. (2015) observaron adsorción enantioselectiva del fungicida metalaxil en un suelo agrícola mediterráneo, pero sólo cuando se partía de disoluciones no racémicas del fungicida. Específicamente en este caso, conforme a la forma de la isoterma (tipo S), se propuso que las disoluciones de metalaxil enriquecidas en el enantiómero R podrían haber inducido un comportamiento de adsorción enantioselectiva por el que el enantiómero R-metalaxil se adsorbía preferentemente debido a que las interacciones homoquirales R-R en el estado adsorbido eran más favorables que las interacciones heteroquirales R-S.

Hay que destacar que existe un importante artefacto experimental que puede influir en la identificación de la enantioselectividad de la adsorción, originado por la biodegradación preferente de un enantiómero sobre el otro durante la medida de la adsorción. En la técnica tradicional, la cantidad de compuesto adsorbido suele determinarse calculando la diferencia entre la cantidad añadida inicialmente y la que queda en la disolución tras el equilibrio. En consecuencia, la biodegradación preferente de un enantiómero sobre el otro durante la medida de la adsorción podría interpretarse erróneamente como adsorción enantioselectiva. La degradación durante la medida de adsorción-desorción se ha descrito tradicionalmente como una posible causa de histéresis, la cual puede llegar a ser especialmente relevante

cuando se trata de compuestos naturales, que suelen biodegradarse muy rápidamente en los suelos. Gámiz et al. (2018), por ejemplo, observaron histéresis en la adsorción-desorción del monoterpeno carvona en suelos arenosos pre-autoclavados, obteniendo índices termodinámicos de irreversibilidad, $TII = 1 - (N_{f-des}/N_{f-ads})$, como descriptores de la histéresis, de 0.38 para la R-carvona y 0.65 para la S-carvona. Estos valores indicaban que la histéresis era selectiva para los enantiómeros. Un análisis de las isothermas de adsorción-desorción reveló que la histéresis para la S-carvona era particularmente pronunciada en los últimos pasos de la desorción. Los autores demostraron que suponer una degradación del 10% durante la desorción era suficiente para explicar la histéresis observada para la S-carvona.

I.3.1.2. Lixiviación

La lixiviación es el proceso mediante el cual un compuesto se mueve a través del perfil del suelo por fenómenos de arrastre y disolución por parte del agua proveniente de las precipitaciones o del riego. Una de las consecuencias más importantes que se derivan de este proceso es la contaminación de acuíferos por la llegada de plaguicidas a través de su transporte vertical. El movimiento del compuesto desde su lugar original de aplicación dará lugar, por tanto, a una disminución en su efectividad.

a) Medida de la lixiviación

La forma de medirla en el laboratorio es a través de columnas de suelo a las que se aplica el compuesto de interés y, posteriormente, se eluye por la adición de agua a modo de precipitación o riego. El percolado se recoge y se analiza para obtener la cantidad de compuesto lixiviado. Tras esto, se extraen fragmentos del suelo de la columna a distinta profundidad y se les somete a un proceso de extracción, para determinar la cantidad de compuesto que haya podido quedar adsorbido al suelo. El análisis de los datos se lleva a cabo mediante la construcción de las denominadas curvas de elución, donde se representan la concentración de compuesto lixiviado frente al volumen de agua adicionada, pudiéndose obtener un modelo predictivo del comportamiento del compuesto ante unas condiciones semejantes de tipo de suelo y agua precipitada (Beck et al., 1993).

En condiciones de campo, los estudios de lixiviación se llevan a cabo mediante el empleo de lisímetros o barrenas. Estos estudios presentan la ventaja de realizar el ensayo bajo condiciones reales, pero también una mayor dificultad en su interpretación debido a la multitud de variables que intervienen en la obtención de resultados.

b) Factores que afectan a la lixiviación

• Adsorción a los coloides del suelo

El fenómeno de adsorción juega un papel relevante en la lixiviación dado que, a mayor adsorción a los coloides de un suelo, menor será la capacidad de un compuesto de moverse a través de su perfil. Por tanto, todos los factores que afectan a la adsorción incidirán en la lixiviación (naturaleza del compuesto, propiedades del suelo y de la disolución, etc.). Se sabe que la presencia de materia orgánica soluble (MOS) puede afectar a la lixiviación de los plaguicidas por los efectos que puede tener sobre la adsorción. Se ha descrito que la MOS puede actuar como puente favoreciendo la interacción del plaguicida con las partículas de suelo, competir con el plaguicida por los sitios de adsorción o interactuar con el plaguicida en disolución originando una asociación que favorecería la movilización del compuesto. Estos efectos pueden resultar un inconveniente a la hora de predecir y controlar el movimiento vertical de los plaguicidas (Celis et al., 1998a,b; Barriuso et al., 2011) y también el grado de exposición de los compuestos alelopáticos respecto al organismo receptor (Fig. 23).

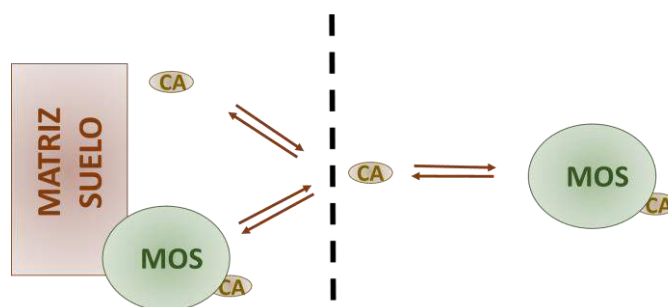


Figura 23: Representación esquemática de las posibles interacciones entre los compuestos alelopáticos (CA), la materia orgánica soluble (MOS) y el suelo.

- Estructura del suelo

La lixiviación ocurre bien a través de los macroporos del suelo, en los que predominan el transporte hidrodinámico y la difusión y en los que se pueden producir fenómenos de transporte preferencial, o bien a través de los microporos, donde prevalecen los procesos de difusión, adsorción y degradación y en los que la lixiviación se produce más lentamente (Cox et al., 1997a).

- Aporte de agua

A mayor cantidad de agua que recibe el suelo, tanto en términos de intensidad como de frecuencia, mayor será la cantidad de compuesto lavado (Wauchope, 1978). Según el aporte de agua, la lixiviación puede ocurrir en condiciones de flujo saturado, insaturado o saturado-insaturado.

- Prácticas culturales

El laboreo, así como la adición de enmiendas orgánicas, van a alterar la estructura del suelo y también su porosidad, además de su contenido en materia orgánica, influyendo en la movilidad de los compuestos (Cox et al., 1997a).

En el caso de compuestos alelopáticos, existen algunos trabajos que han abordado el movimiento de estos compuestos a lo largo del perfil del suelo. Li et al. (2013) estudiaron la lixiviación de 10 compuestos alelopáticos en un suelo y encontraron que la diferencia observada en el factor de movilidad (R_f) entre los distintos compuestos era resultado de una adsorción preferencial sobre los coloides del suelo. Los autores también encontraron relaciones positivas entre el factor de movilidad, R_f , y el pH, y negativas entre R_f y el contenido de materia orgánica del suelo. Como hecho interesante, observaron también que la adición de una mezcla de los compuestos llevaba a una mayor movilidad que cuando eran aplicados de forma individual, lo que podría contribuir a posibles efectos sinérgicos en la actividad alelopática de los compuestos.

Otras investigaciones sobre la lixiviación de compuestos alelopáticos han manifestado la influencia, además de la adsorción, de la rápida degradación de los mismos en el suelo.

Real et al. (2019) estudiaron la lixiviación de la hidroxycumarina umbeliferona en dos suelos, uno ácido y otro alcalino. Encontraron que el compuesto sólo se detectó en los lixiviados del suelo alcalino, con una cantidad total lixiviada del 14% del total aplicado. Esta cantidad tan baja se debió, probablemente, a su rápida degradación en la columna de suelo. En el suelo ácido, sólo se detectó umbeliferona en el interior de las columnas, lo que se atribuyó a una mayor adsorción en este suelo.

Por último, existen estudios que han demostrado la influencia de la lixiviación en la fitotoxicidad de algunos compuestos alelopáticos. Xiao et al. (2017) evaluaron la fitotoxicidad de los residuos de siete compuestos alelopáticos tras su lixiviación en columnas de suelo y encontraron que la concentración de los compuestos alelopáticos disminuía conforme se descendía en el perfil de la columna, como consecuencia de procesos de adsorción, degradación microbiana y transformación durante el tiempo de lixiviado. Realizando bioensayos con segmentos de las columnas, demostraron que la inhibición en la germinación de plantas sensibles decrecía conforme lo hacía la cantidad de compuesto alelopático presente.

c) *Enantioselectividad en el proceso de lixiviación*

La lixiviación de los enantiómeros de una molécula quiral va a estar íntimamente relacionada con los procesos de adsorción y degradación en el suelo. Si ocurren cambios en la fracción enantiomérica (EF) durante estos procesos, se verán reflejados en los residuos presentes en los lixiviados. Celis et al. (2013) describieron las curvas hipotéticas que pueden encontrarse para la lixiviación de mezclas racémicas de un plaguicida quiral en columnas de suelo, las cuales se ilustran en la Fig. 24.

Si los enantiómeros se adsorben y transforman en la misma medida, las curvas de lixiviación deben solapar (Fig. 24A). Sin embargo, la situación más habitual es la que se muestra en la Fig. 24B, donde los enantiómeros se adsorben en igual medida, pero uno de ellos se degrada más rápido que el otro durante el transporte vertical. Este comportamiento se ha observado tras la aplicación de mezclas racémicas de metalaxil, benalaxil y furalaxil en columnas de suelo (Celis et al., 2013; Qin et al., 2014). Las otras dos situaciones se darían cuando un enantiómero se retiene en mayor medida que el otro sin diferencias (Fig. 24C) o con diferencias en la degradación (Fig. 24D).

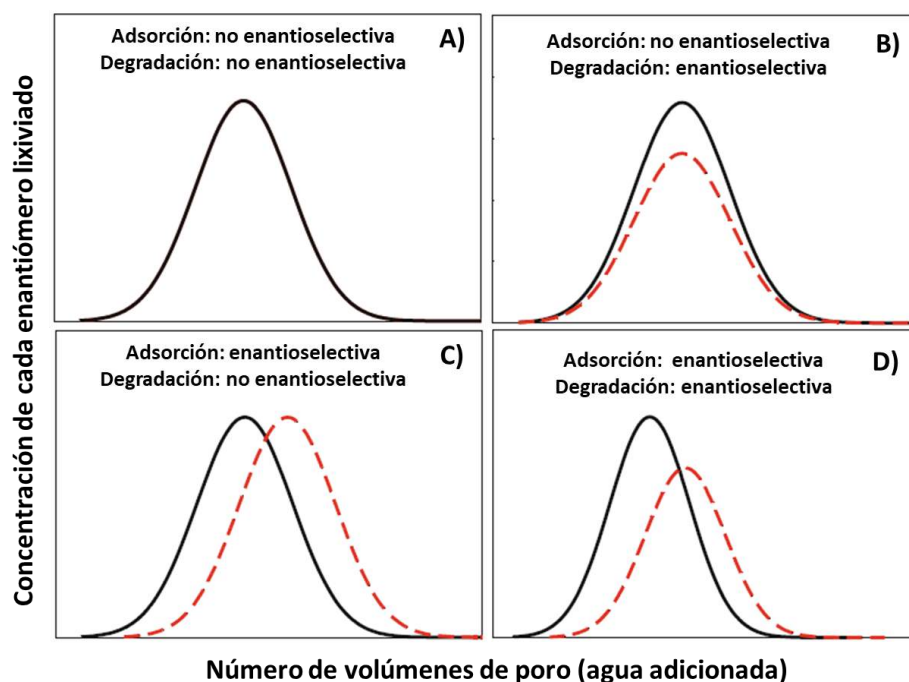


Figura 24: Curvas de lixiviación hipotéticas que podrían encontrarse para una mezcla racémica de un plaguicida quiral en columnas de suelo según Celis et al. (2013). Las líneas negras y rojas representan a cada enantiómero (adaptado de Gámiz et al., 2022).

La lixiviación de mezclas no racémicas de enantiómeros de plaguicidas quirales ha sido poco estudiada. Gámiz et al. (2016a) observaron un cambio en la fracción enantiomérica de una disolución enriquecida en el enantiómero R del fungicida metalaxil durante la lixiviación a través de columnas de suelo. Este comportamiento se atribuyó a la adsorción preferente del enantiómero R por la presencia de este mismo enantiómero ya adsorbido (Celis et al., 2015). Para ambos enantiómeros, la cantidad total lixiviada fue de superior al 95%, lo que aseguró que los procesos de degradación y enantiomerización tuvieron poca influencia en la enantioselectividad de la lixiviación. Este caso se corresponde con el mostrado en la Figura 24C.

Existen algunos estudios que ponen de manifiesto comportamientos enantioselectivos en el proceso de lixiviación de compuestos alelopáticos. Gámiz et al. (2016c), por ejemplo, encontraron que el movimiento de los enantiómeros del ácido abscísico (ABA) a través de columnas de suelo fue enantioselectivo, observando que los lixiviados de las columnas estaban enriquecidos en el enantiómero R-ABA. Esto se debió a la mayor persistencia de

este enantiómero en los suelos. Asimismo, la lixiviación se retrasó más en el suelo que mostró una mayor adsorción para ambos enantiómeros.

I.3.1.3. Otros procesos de transporte

Escorrentía. La escorrentía es el proceso por el cual se produce el transporte de agua y las sustancias presentes en la misma sobre la superficie del suelo, al superarse la capacidad de infiltración de este, bien sea por la llegada de agua de riego o de precipitación. Wauchope (1978) define un rango de solubilidad según el cual un soluto será transportado en disolución o por adsorción coloidal: a) si la solubilidad en agua es mayor a 2 mg/l el compuesto será mayoritariamente transportado en disolución, b) si la solubilidad es menor a 2 mg/l, el transporte mayoritario se dará mediante adsorción a los coloides del suelo en suspensión.

Lixiviación y escorrentía son procesos relacionados entre sí en lo que respecta a la influencia del aporte de agua por precipitación o por riego. La mayor diferencia entre estos procesos radica en el tipo de movimiento que experimentará el compuesto, siendo el transporte lateral hacia aguas superficiales el sentido de transporte en el proceso de escorrentía, frente al transporte vertical, a través de los poros del suelo, hacia aguas subterráneas, que es el que se experimenta en el proceso de lixiviación.

Volatilización. La volatilización es el proceso por el cual un compuesto pasa de la fase líquida a la gaseosa, facilitándose así su disipación por la atmósfera. Algunos factores climáticos muy relevantes en este proceso son la humedad del suelo, la temperatura y la velocidad del viento. Las propiedades de los plaguicidas que afectan a la volatilización (presión de vapor, constante de Henry, coeficiente de partición aire-octanol) son idénticas para los enantiómeros (López-Cabeza, 2017), así que cabe esperar que sea un proceso no enantioselectivo.

La volatilización es un proceso importante en el caso de compuestos alelopáticos presentes en aceites esenciales, como los monoterpenos. Estos son considerados como compuestos orgánicos volátiles (COV) de origen biogénico (Marmulla & Harder, 2014), por poseer una elevada presión de vapor y estructura específica que los hace muy volátiles (Ouédraogo et al., 2013). Los monoterpenos se consideran importantes agentes alelopáticos en climas cálidos y secos, donde pueden actuar en la fase de vapor (Vaughn & Spencer, 1993).

Difusión. La difusión es el fenómeno de transporte que se produce como consecuencia de la existencia de un gradiente de concentración, por el que las moléculas de soluto en la misma fase se transportan desde el punto de mayor concentración al de menor, hasta alcanzar un equilibrio o gradiente de concentración igual a cero. La difusión se ve afectada por la solubilidad del compuesto, su presión de vapor, la temperatura y la cantidad de agua y porosidad del suelo.

Absorción. Este es el mecanismo mediante el cual los compuestos alelopáticos se pueden incorporar desde el suelo a la planta al ser absorbidos por su sistema radicular. Se trata de un proceso muy supeditado a la adsorción del compuesto a los coloides del suelo (Kobayashi, 2004). Otra vía importante de absorción es la vía foliar, para el caso de plantas receptoras de compuestos orgánicos volátiles (COV), como los monoterpenos (Ouédraogo et al., 2013), que pueden ser absorbidos bien en forma de vapor o tras el condensado producido por el rocío. Los microorganismos del suelo también pueden absorber compuestos alelopáticos y utilizarlos como fuente de carbono o para la liberación y modificación de otros compuestos que tienen un papel ecológico (Marmulla & Harder, 2014).

La absorción es un proceso que puede ser enantioselectivo en las plantas y en microorganismos y nematodos (Zipper et al., 1998). Se produce por el transporte activo a través de las biomembranas, donde los enantiómeros de los compuestos quirales pueden interactuar de forma enantioselectiva con proteínas u otras moléculas quirales que actúan como transportadores (Zipper et al., 1998). En las plantas, los compuestos quirales presentes en la disolución del suelo llegan hasta el xilema desde el sistema radicular cruzando varias láminas de tejidos (Collins et al., 2006).

I.3.2. Procesos de transformación

Los procesos de transformación implican un cambio en la estructura química del compuesto y, por lo tanto, la formación de nuevos compuestos con una actividad biológica diferente respecto al original. Los procesos de transformación más importantes se pueden dividir en dos grupos, según su naturaleza: abióticos y bióticos. En el caso de compuestos quirales pueden darse, además, procesos de interconversión entre enantiómeros (enantiomericación).

I.3.2.1. Degradación abiótica

Los procesos de degradación química o abiótica ocurren principalmente a través de reacciones hidrolíticas, de sustitución y redox. Teniendo en cuenta el tipo de reacciones que las originan, los factores más determinantes serán el pH, el potencial redox, la temperatura, los elementos que componen la disolución y los coloides del suelo y la propia predisposición del compuesto a experimentar estas reacciones químicas en función de su estructura.

Se sabe que el fenómeno de adsorción a los coloides del suelo y a la materia orgánica soluble ayuda a proteger al compuesto de la degradación química, pero hay reacciones de degradación química que ocurren vía catalítica en la superficie de los coloides o de la MOS. En este caso la adsorción favorece la degradación.

Existen ejemplos donde la degradación química domina la transformación de los compuestos alelopáticos. Entre ellos están la degradación química de la benzoquinona por fenómenos oxidativos (Weidenhamer & Romeo, 2005) y los procesos de oxidación y polimerización experimentados por los compuestos fenólicos, que pueden estar catalizados por la superficie de los minerales de la arcilla (Blum et al., 1999; Clausen et al., 2001; Cecchi et al., 2004; Polubesova et al., 2010; Levy et al., 2020). Otro ejemplo lo constituyen los monoterpenos, que, como compuestos volátiles, experimentan en la atmósfera reacciones de oxidación y reaccionan con radicales hidroxilos, óxidos de nitrógeno, ozono, etc., dando lugar a una variedad de compuestos como carbonilos, alcoholes, ésteres o hidrocarburos halogenados (Marmulla & Harder, 2014).

Cuando la transformación química del compuesto está mediada por la luz ultravioleta se habla de *procesos fotodegradativos* (Horspool, 1976), que suelen implicar reacciones redox, hidrolíticas, de sustitución y de isomerización. La incidencia de la luz ultravioleta será un factor determinante en la fotodegradación, tanto en términos de duración como de intensidad de la radiación. Para que esta degradación sea efectiva, el compuesto ha de encontrarse en la superficie de las plantas, en sistemas acuáticos o en los primeros milímetros del suelo, que será el máximo de profundidad donde esta radiación es efectiva para degradar. Otros factores importantes serán la presencia de catalizadores fotoquímicos, el pH del suelo, la aireación del mismo, la fase en la que esté el compuesto (sólido, líquido y gas) y su estructura química y grado de adsorción.

Existe tanto fotodegradación directa, por acción directa de la radiación ultravioleta, como indirecta, en la que compuestos mediadores son capaces de absorber la radiación,

transmitiéndola al compuesto o generando especies reactivas intermedias con la capacidad de hacerlo. Los ácidos húmicos, por ejemplo, tienen esta capacidad de intervenir en procesos de fotodegradación indirecta (Mansour et al., 1989; Cox et al., 1996; Aguer & Richard, 1996; Ramezani et al., 2008).

Un ejemplo de fotodegradación de compuestos alelopáticos fue observado por Real et al. (2019) en el almacenamiento de la hidroxycumarina umbeliferona en disolución acuosa y extractos de suelo, con una degradación paulatina tras exposición a la radiación solar. Otro ejemplo de este tipo de degradación se da en los monoterpenos, para los que se han descrito reacciones de fotofragmentación (Ouédraogo et al., 2013; Marmulla & Harder, 2014).

En general, la degradación química se puede identificar mediante el uso de suelos esterilizados (Kaur et al., 2009; Gámiz et al., 2018), aunque en algunos casos no se da un único tipo de fenómeno degradativo (biótico/abiótico) sino una combinación de ambos (Gámiz et al., 2022).

Degradación abiótica en compuestos quirales. Generalmente, las reacciones abióticas que se producen en el suelo no son enantioselectivas y, en consecuencia, no producen una degradación preferencial de un enantiómero sobre el otro. A pesar de que se han realizado estudios en busca de enantioselectividad en procesos degradativos abióticos para compuestos quirales, los resultados han reflejado una misma velocidad de degradación para ambos enantiómeros (Ali & Aboul-Enein, 2004; Ramezani et al., 2008). Algunos trabajos han observado la importancia de los fenómenos bióticos y abióticos, actuando juntos, en la degradación de compuestos quirales. Por ejemplo, Liang et al. (2016) mostró la importancia de procesos tanto bióticos como abióticos en la degradación de S-metalaxil, mientras que en la de R-metalaxil predominaban los bióticos.

I.3.2.2. Degradación biótica

Se habla de biodegradación o biotransformación cuando el mecanismo que produce la transformación del plaguicida está mediado por microorganismos presentes en los suelos. Es el resultado de un proceso de asimilación y/o metabolización que da como productos bien compuestos inorgánicos del tipo NH_3 , CO_2 o H_2O bien metabolitos intermedios. El tipo de reacciones predominantes son de reducción, en ambientes anaeróbicos, y de oxidación e

hidrolíticas, en ambientes aeróbicos. La biodegradación va a estar influenciada por factores como:

- *Climáticos*: Los factores climáticos, especialmente la humedad y la temperatura, inciden en el crecimiento microbiano. Al aumentar estas, en general, se beneficia la proliferación microbiana.
- *Adsorción al suelo*: La adsorción puede proteger a los compuestos de su biodegradación. El grado de adsorción del compuesto al suelo determinará su presencia en la disolución y, por tanto, su disponibilidad para ser accesible a los microorganismos y ser biodegradado.
- *Contenido en materia orgánica del suelo*: Un contenido elevado de materia orgánica puede favorecer el fenómeno de adsorción, aumentando la protección del compuesto y de este modo retrasar su degradación. Asimismo, la materia orgánica también sirve de sustrato de crecimiento de los microorganismos, aumentando su población y, por ende, la capacidad biodegradativa del suelo.

Existen multitud de estudios que ponen de manifiesto la degradación microbiana como la principal causa de la rápida disipación de los compuestos alelopáticos en el suelo (Inderjit, 2001; Kobayashi, 2004; Tharayil et al., 2006; Li et al., 2013; Marmulla & Harder, 2014; Gámiz et al., 2016c, 2018, 2019b; Xiao et al., 2017; Karamanoli et al., 2018; Bravetti et al., 2020).

Kaur et al. (2009) demostraron la importancia de los microorganismos del suelo en la persistencia del compuesto alelopático m-tirosina. Usando suelos esterilizados y sin esterilizar, vieron cómo en los suelos esterilizados se manifestaba la fitotoxicidad del compuesto mientras que en los suelos no esterilizados esta se redujo debido a la actuación de los microorganismos edáficos.

Por otra parte, Gámiz et al. (2018) demostraron que la vía principal de degradación del monoterpeno carvona en el suelo estaba mediada por microorganismos. En el trabajo, evaluaron la disipación de carvona en suelos sin esterilizar y esterilizados una vez y tres veces de forma sucesiva. Observaron una mayor persistencia del compuesto tras varias esterilizaciones, mientras que una única esterilización no evitó completamente la degradación por parte de los microorganismos del suelo. En Gámiz et al. (2019b), los autores

evaluaron la persistencia y bioactividad del ácido salicílico (SA) en el suelo. Concluyeron que la disipación de SA estaba gobernada, mayoritariamente, por la actividad microbiana. La esterilización de los suelos con HgCl₂ llevó a un aumento de la persistencia del compuesto, junto con una disminución de la respiración del suelo, indicando que la eliminación del factor microbiano del suelo era la responsable del aumento en la persistencia del compuesto.

Karamanoli et al. (2018) encontraron variaciones en la composición de mezclas de aceites esenciales (monoterpenos) en suelos que sólo podían explicarse por la intervención de microorganismos, ya que no se correspondían con patrones degradativos previamente estudiados para aceites esenciales en condiciones abióticas. En estudios en campo con ácidos fenólicos, Bravetti et al. (2020) observaron que estos compuestos se degradaban en cuestión de horas en suelos agrícolas y explicaron su escasa vida media por la biodegradación por microorganismos, ya que está bien descrito que muchos compuestos fenólicos son usados por microorganismos como fuente de carbono, provocando una rápida desaparición de los mismos (Chen et al., 2011; Bravetti et al., 2020).

Algunos autores como Li et al. (2013) y Xiao et al. (2017) estudiaron los cambios estructurales que producían diversas familias de compuestos alelopáticos en las poblaciones microbianas del suelo mediante técnicas de extracción de los fosfolípidos de membrana (PLFAs), así como su impacto en la persistencia de los compuestos. Li et al. (2013) encontraron diferencias en las comunidades microbianas en 2 de las 10 aplicaciones de compuestos alelopáticos, concretamente de compuestos nitrogenados, y establecieron una relación entre la actividad del suelo, los compuestos alelopáticos, las comunidades microbianas y la movilidad de los compuestos en el suelo. Por su parte, Xiao et al. (2017) observaron que los procesos de lixiviación en suelos se veían muy afectados por la rápida degradación por parte de las diversas comunidades microbianas en los mismos y que las interacciones entre compuestos alelopáticos y dichas comunidades determinaban su biodisponibilidad.

Degradación biótica de compuestos quirales. La biodegradación de compuestos quirales en suelos es el resultado de la acción de enzimas y/o receptores biológicos de distintos microorganismos (Garrison, 2011). Los centros activos de esas macromoléculas son, habitualmente, quirales y, a pesar de la similitud química de los enantiómeros del

compuesto quiral, la constante de asociación centro activo-enantiómero es, normalmente, muy diferente (López-Cabeza, 2017). Este es el principal motivo por el que la biodegradación de plaguicidas quirales puede ser enantioselectiva y de por qué las formas enantioméricas pueden tener diferente bioactividad y toxicidad tanto sobre organismos diana como no diana (Gámiz et al., 2022).

Según Müller & Kohler (2004), los procesos de biotransformación enantioselectiva, que determinan la fracciones enantioméricas de plaguicidas quirales en el medio ambiente (Garrison, 2006; Basheer, 2017), se producen por las siguientes vías:

1. Dos enzimas enantioselectivas donde cada una de ellas transforma sólo a un enantiómero.
2. Ambos enantiómeros son transformados por la misma enzima a distintas velocidades de degradación.
3. Una enzima transforma secuencialmente a ambos enantiómeros; por ejemplo, la enzima inicialmente convierte a un enantiómero y eventualmente al otro, pero sólo cuando el primero ha sido completamente transformado.
4. Transformación de un enantiómero por una enzima e isomerización del otro por una isomerasa.

Se ha demostrado que los diferentes microorganismos presentes en los suelos, junto a las distintas propiedades físico-químicas y otros factores como la adsorción, son factores clave en la modificación de los procesos enantioselectivos (Qin et al., 2014). Las diferencias que se pueden encontrar en la biotransformación de compuestos quirales en diferentes suelos pueden depender de las diferentes comunidades microbianas o de los niveles de enzimas, según las propiedades y la ubicación del suelo, variables que deben abordarse para caracterizar el destino final de los plaguicidas quirales en el suelo (Celis et al., 2013; Buerge et al., 2019; Gámiz et al., 2022). Factores importantes que pueden afectar a la biotransformación de los plaguicidas quirales en el suelo son:

Adsorción: Aunque la adsorción es un proceso que se considera no enantioselectivo, puede influir indirectamente en la biotransformación enantioselectiva al controlar, en parte,

la disponibilidad de los compuestos quirales para los microorganismos degradadores del suelo (Semple et al., 2003; Arias-Estévez et al., 2008; Pignatello & Nason, 2020). Celis et al. (2013) demostraron que el R-metalaxil era degradado de forma preferencial en comparación con el enantiómero S en suelos alcalinos, pero el grado de biodegradación enantioselectiva para metalaxil fue dependiente del suelo. La mayor adsorción observada para el metalaxil en un suelo con alto contenido de arcilla redujo la disponibilidad de ambos enantiómeros, restringiendo su biotransformación en comparación con suelos de textura gruesa. Los autores apuntaron que la protección del plaguicida quiral frente a la biodegradación y el atrapamiento en los poros de pequeño tamaño se tradujo en una mayor persistencia y en residuos de metalaxil más racémicos en el suelo, existiendo un efecto indirecto de la adsorción en la quiralidad de los residuos.

El efecto indirecto de la adsorción en la biotransformación enantioselectiva de los plaguicidas quirales también se ha observado para compuestos naturales, como el ácido abscísico. El ácido abscísico mostró una mayor persistencia y una menor variación en su fracción enantiomérica en suelos que presentaban mayor afinidad por los enantiómeros de dicho compuesto (Gámiz et al., 2016c). No obstante, además de la adsorción, la participación de microorganismos específicos del suelo en el proceso de biodegradación podría haber contribuido también a estos resultados.

pH: Se ha demostrado que el pH es capaz de modificar la biodegradación de los compuestos quirales en suelos. Por ejemplo, Buerge et al. (2003) observaron que el S-metalaxil se degradaba más rápidamente que el R-metalaxil en suelos anaeróbicos y en suelos aeróbicos con $\text{pH} < 4$, mientras que el enantiómero R era degradado preferencialmente en suelos aeróbicos con $\text{pH} > 5$. Otros ejemplos se han encontrado con el herbicida beflubutamida, cuya biotransformación fue ligeramente enantioselectiva en suelos alcalinos, con una degradación más lenta para el enantiómero bioactivo, y mucho más enantioselectiva en suelos ácidos (Buerge et al., 2013). El pH del suelo también alteró la fracción enantiomérica de imazetapir durante su transformación en condiciones aeróbicas (Wu et al., 2017). En todos los suelos estudiados, el enantiómero R se degradó más rápidamente que el S, pero el grado de enantioselectividad fue dependiente del pH. Los autores atribuyeron esta observación a la baja adsorción y elevada biodisponibilidad de imazetapir a pH elevados de los suelos (Wu et al., 2017).

Para el compuesto alelopático carvona, se han obtenido evidencias del efecto del pH sobre las poblaciones microbianas y de su capacidad de modificar la enantioselectividad de la degradación del compuesto (Gámiz et al., 2018). La biodegradación de la mezcla racémica de carvona en un suelo ligeramente alcalino se produjo rápidamente, siendo el enantiómero S degradado con mayor rapidez que el R. Cuando se acidificó el mismo suelo con HCl hasta un pH de 5.5, la disipación de carvona se volvió más lenta y apenas enantioselectiva, con valores de EF residuales de carvona cercanos a 0.5 (Gámiz et al., 2018). Dado que la adsorción de carvona al suelo sin tratar y tratado con ácido fue similar, este comportamiento se atribuyó a las alteraciones de la actividad microbiana del suelo producidas por el cambio de pH (Gámiz et al., 2018).

Condiciones redox: Las condiciones redox constituyen un parámetro muy importante en la disipación de algunos compuestos quirales en el suelo. Por ejemplo, para ambientes aeróbicos y concentraciones relevantes a nivel medioambiental, se observó una degradación preferencial del enantiómero R del herbicida mecoprop (MCP); sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas y a altas concentraciones de MCP, fue el enantiómero S el que se degradó preferencialmente (Frková et al., 2016). Los autores encontraron tres tipos de comunidades microbianas que actuaban preferentemente en función de las condiciones ambientales (Frková et al., 2016).

Prácticas culturales: Las prácticas agrícolas, junto a las distintas formas de aplicación del compuesto quiral, pueden influir en la disponibilidad de los enantiómeros y también en la naturaleza y actividad de las poblaciones microbianas del suelo (Gámiz et al., 2013, 2016b, 2022; López-Cabeza et al., 2017).

I.3.2.3. Enantiomerización

La enantiomerización es el proceso mediante el cual un enantiómero se convierte en el otro. En general, la enantiomerización es un proceso muy energético que suele producirse en carbonos quirales que pueden formar grupos metino. No obstante, cuando la energía necesaria se puede obtener, por ejemplo, a través de la absorción de radiación ultravioleta, la enantiomerización también puede implicar roturas homolíticas de enlaces C—C (Katagi, 2012). La enantiomerización puede ocurrir por vía abiótica, donde predominan los procesos de hidrólisis, ácida o básica, y fotólisis, o por vía biótica, producida por la actividad enzimática de los microorganismos del suelo (Katagi, 2012).

La enantiomerización es un proceso que se debe considerar cuando se evalúa el comportamiento de un compuesto quiral en el suelo. Por ejemplo, si se produce la desaparición enantioselectiva de un compuesto, esta puede tener lugar no sólo como consecuencia de una degradación preferencial de uno de los enantiómeros, sino que puede deberse a la interconversión de un enantiómero en el otro (Müller & Buser, 1997; Romero et al., 2001). En el caso de los plaguicidas quirales, el conocimiento de este proceso resulta fundamental a la hora de valorar la posible sustitución de una mezcla racémica en favor del enantiómero puro biológicamente activo correspondiente, ya que el coste de dicha sustitución podría no estar justificado si el enantiómero puro racemiza rápidamente (Katagi, 2012).

I.4. Estrategias de modulación del comportamiento de los compuestos alelopáticos en el suelo: uso de arcillas y de enmiendas orgánicas como adsorbentes

Desde una perspectiva general, a pesar de representar una alternativa prometedora para un control sostenible de plagas, la aplicación de compuestos alelopáticos como herbicidas naturales todavía requiere esfuerzos dirigidos a solventar las limitaciones que a menudo se asocian al empleo de estos compuestos. Entre ellas destacan la escasa persistencia que suelen presentar una vez que alcanzan el suelo, que puede reducir rápidamente su eficacia biológica, y la inconsistencia que puede manifestar su actividad dependiendo del escenario concreto de aplicación. Por ello, el desarrollo de estrategias que permitan superar estas limitaciones se considera un objetivo que podría contribuir a estimular la comercialización y el uso de los compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales. Algunas de estas estrategias, que se abordan en la presente Tesis Doctoral, son las siguientes:

Selección de los escenarios de aplicación. Puesto que las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, así como las condiciones ambientales, afectan de forma decisiva a la bioactividad de los compuestos alelopáticos a través de su influencia en su adsorción y transformación, la selección de condiciones edafo-climáticas favorables podría constituir una forma inmediata de maximizar su eficacia. Como se ha mencionado con anterioridad, las propiedades del suelo que más afectan a la biodisponibilidad de los compuestos alelopáticos son su composición (contenido en arcilla y materia orgánica), estructura (tamaños de poros y su distribución), humedad, pH y actividad biológica (Scavo et al., 2019). Dependiendo de estas propiedades, el potencial alelopático de muchos compuestos puede expresarse selectivamente en unos suelos y no en otros. Hiradate et al. (2010), por ejemplo, observaron que la expresión de la fitotoxicidad de la juglona variaba en función del tipo de suelo. También se ha comprobado que la presencia de minerales de la arcilla en los suelos puede inactivar compuestos alelopáticos fenólicos al inducir reacciones de polimerización oxidativa (Inderjit, 2001; Polubesova et al., 2010). Dado que existe muy poca información acerca del comportamiento de la mayoría de los compuestos alelopáticos en el medio ambiente, resulta de gran importancia generar datos sobre la adsorción y transformación de estos compuestos en suelos con características distintas y bajo diferentes condiciones ambientales que ayuden a identificar los factores y mecanismos que gobiernan su biodisponibilidad y posibiliten la selección de las condiciones agroclimáticas más idóneas para la expresión de su fitotoxicidad.

Formulación. Los herbicidas se aplican a los cultivos como formulaciones que, además de la sustancia activa, contienen componentes adicionales introducidos para facilitar su aplicación o aumentar su eficacia. Estos componentes adicionales o adyuvantes mejoran la dispersión en agua del compuesto, prolongan su actividad o aumentan su absorción por la planta a combatir (Uddin et al., 2014). Varios estudios han puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar formulaciones adecuadas capaces de retrasar la rápida degradación microbiana que suelen sufrir los compuestos alelopáticos en el suelo, con el fin de aumentar su eficacia. Un ejemplo lo encontramos en Bertin et al. (2009), quienes observaron que las excelentes propiedades herbicidas del amino ácido no proteico m-tirosina se perdían completamente en sólo dos días por su rápida biodegradación en suelos. Los autores señalaron que una posible formulación que permitiese estabilizar el compuesto en el suelo podría ayudar a que la m-tirosina pudiera tener aplicación como herbicida natural. Travaini et al. (2016) obtuvieron resultados similares para las furanocromonas kelina y visnagina.

El desarrollo de formulaciones adecuadas que protejan al compuesto activo de rápidas pérdidas por transporte o degradación y permitan mantener concentraciones moderadas del mismo el tiempo suficiente para que ejerza su acción biológica es una estrategia que se ha propuesto para aumentar la eficacia y reducir el impacto ambiental de los plaguicidas sintéticos convencionales y que podría ser particularmente interesante para prolongar la eficacia de los plaguicidas naturales (Bertin et al., 2009; Gasic & Tanovic, 2013; Flores-Céspedes et al., 2015; Pang et al., 2016; Gámiz & Celis, 2021). Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el soporte o encapsulación del compuesto en matrices de diversa naturaleza. El nuevo fungicida antibotrófico comercial ARAW (Sipcam Iberia) a base de tres terpenos (eugenol, geraniol y timol) encapsulados en microesferas biológicas con capacidad para liberarlos de forma gradual, en consonancia con las condiciones que favorecen la aparición de algunas enfermedades sobre las que actúa la mezcla de terpenos (Ruiz-García et al., 2015; MAGRAMA, 2016), constituye un ejemplo de que existe un interés real por el desarrollo de plaguicidas naturales y por mejorar la sofisticación de las tecnologías de formulación con el fin de optimizar la eficacia de los mismos. Dado que los terpenos eugenol, geraniol y timol son sustancias incluidas en el Anexo IV del reglamento (CE) No. 396/2005, no requieren fijación de límites máximos de residuos (LMRs), lo que supone una ventaja para su registro y comercialización. En este sentido, el reciente auge en el diseño de materiales nanoestructurados, con una gran variedad de propiedades morfológicas y funcionales, abre un amplio abanico de posibilidades en cuanto a la utilización de este tipo

de materiales como soportes en la formulación de plaguicidas naturales (Forim et al., 2013; Kah & Hofmann, 2014; Benelli et al., 2017; Real et al., 2019). Hasta la fecha, no obstante, el uso de estos materiales para optimizar la actuación de los compuestos alelopáticos como herbicidas naturales está poco explorado.

Modificaciones del suelo. Se sabe que la modificación del suelo a través de la adición de enmiendas orgánicas e inorgánicas puede tener un gran impacto sobre la dinámica de los plaguicidas. Aunque, como práctica agrícola, el principal propósito de la adición de *enmiendas orgánicas* es aumentar la fertilidad de los suelos, a menudo esta práctica aumenta la adsorción y reduce la movilidad de los plaguicidas y puede acelerar o retrasar su biodegradación en función de las características físico-químicas del plaguicida, la naturaleza de la enmienda y el tipo de suelo (López-Piñeiro et al., 2013; García-Delgado et al., 2020). Las *enmiendas inorgánicas* y los complejos organoarcillosos también han demostrado su capacidad de alterar la movilidad y la persistencia de los plaguicidas en suelos, tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Rodríguez-Cruz et al., 2007; Gámiz et al., 2010, 2016b). Por lo tanto, la manipulación de los sistemas agrícolas mediante la adición de enmiendas a los suelos podría ser una estrategia útil para incrementar la bioactividad de los compuestos alelopáticos, por la influencia que puede ejercer en la adsorción y degradación de los mismos (Gámiz et al., 2019b).

I.4.1. Uso de compuestos laminares como adsorbentes

Los minerales de la arcilla, en particular los filosilicatos 2:1, y sus análogos sintéticos estructuralmente complementarios, los hidróxidos dobles laminares (HDL), han suscitado un gran interés como materiales adsorbentes para evitar o combatir la contaminación por compuestos orgánicos como los plaguicidas (Cornejo et al., 2008). Este hecho se debe principalmente a sus elevadas superficies específicas asociadas a su estructura en láminas, a la facilidad con que se obtienen o sintetizan y a la posibilidad de modificar sus superficies para aumentar su afinidad por compuestos específicos. Las distintas aplicaciones que se han propuesto en el campo de los plaguicidas abarcan desde su empleo como soportes para la liberación lenta de los mismos hasta su adición directa al suelo como barreras inmovilizantes o su uso como filtros para aguas contaminadas. En el contexto de esta Tesis Doctoral, es de esperar que también puedan tener aplicación en el ámbito relativo al uso de los compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales.

Tanto los filosilicatos como los hidróxidos dobles laminares presentan unas características estructurales comunes, ya que están constituidos por la combinación de láminas de tetraedros y/u octaedros de diferentes óxidos e hidróxidos metálicos. La composición y el empaquetamiento de las láminas determinará la naturaleza de los diferentes compuestos laminares. Si tenemos en cuenta la carga neta del material, estamos ante filosilicatos o las denominadas “arcillas naturales” si la carga es negativa, o ante hidróxidos dobles laminares (HDL) o compuestos tipo hidrotalcita si su carga laminar es positiva (Fig. 25).

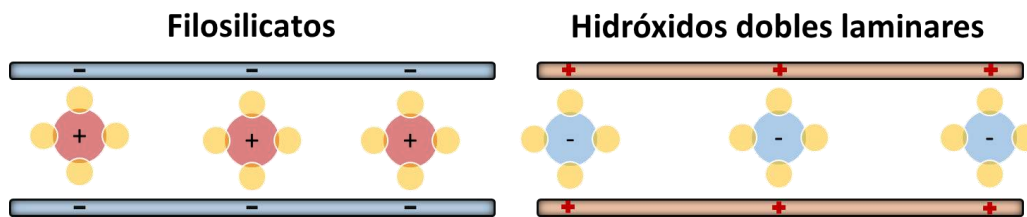


Figura 25: Representación esquemática de las estructuras de los filosilicatos e hidróxidos dobles laminares.

I.4.1.1. Filosilicatos

a) Estructura

Los filosilicatos forman parte del grupo conocido como minerales de la arcilla, que están presentes en suelos y sedimentos y que coexisten con otras fases, tanto cristalinas como amorfas (gibbsita, goetita, hematites...) (Guggenheim & Martin, 1995). Se generan por la meteorización de silicatos o se encuentran en yacimientos enriquecidos en alguno de ellos. Estos materiales juegan un papel clave en la agricultura porque su presencia en el suelo modifica ciertas propiedades fundamentales del mismo como la textura, la estructura, la capacidad de retención de agua y la fertilidad.

La estructura global de los filosilicatos consiste en unidades tetraédricas con Si y O y de unidades octaédricas con Mg y O/OH o Al y O/OH, formando capas bidimensionales que se apilan a su vez en láminas tridimensionales. Dependiendo de cómo se apilen las capas para formar las láminas, los filosilicatos se clasifican de la siguiente manera:

Filosilicatos 1:1. Las láminas tridimensionales del mineral se forman por la condensación de una capa octaédrica con una tetraédrica y se unen entre sí mediante enlaces de hidrógeno entre grupos OH y O de capas contiguas.

Filosilicatos 2:1. Las láminas tridimensionales se forman por la condensación de una capa octaédrica entre dos tetraédricas y se unen entre sí a través de fuerzas de van der Waals que se establecen entre los átomos de oxígeno de capas contiguas. Estos minerales se caracterizan por presentar, en la mayoría de los casos, carga negativa permanente en sus láminas debido a la sustitución isomórfica en la capa tetraédrica de un átomo de Si^{4+} por otro de similar tamaño y menor carga, como puede ser, por ejemplo, el Al^{3+} . A su vez, este fenómeno también puede producirse en la capa octaédrica, en la que el Al^{3+} puede ser reemplazado por Mg^{2+} provocando un desbalance en la carga. La carga negativa neta generada se compensa mediante la presencia de cationes inorgánicos, hidratados en menor o mayor grado, que se sitúan tanto en los bordes como entre las láminas del mineral. Los cationes inorgánicos pueden ser intercambiados por otros, con mayor o menor facilidad dependiendo de si la carga permanente se encuentra en la capa tetraédrica o en la octaédrica, de la carga neta de la celda unidad y de la naturaleza del catión.

Filosilicatos 2:1:1. La estructura de este grupo de minerales es similar a la de los minerales 2:1. En ellos, el balance de carga se mantiene gracias a la presencia en el espacio interlamina de grupos hidroxilo coordinados octaédricamente de forma similar a las capas octaédricas. Esta característica hace que su capacidad de intercambio catiónico y de expansión sean nulas, como les ocurre a las cloritas, que forman parte de este grupo (Karathanasis et al., 1983; Ezzaim et al., 1999).

En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en filosilicatos de estructura 2:1, concretamente del grupo de las esmectitas y subgrupo de las montmorillonitas, que son minerales en los que las posiciones octaédricas están ocupadas por cationes Al y sus sustituciones isomórficas. Su fórmula general es la siguiente: $(\text{Na}, \text{Ca})_{0.3}(\text{Al}, \text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$.

b) Características adsorbentes de las esmectitas

En la Figura 26 se muestran los principales centros de adsorción de las esmectitas. Los centros activos son determinados puntos estructurales que coinciden con los cationes de intercambio hidratados presentes en el espaciado interlamina y en los bordes del mineral, los

sitios de carga variable dependientes del pH, como son los grupos silanoles (Si-OH) y aluminoles (Al-OH) de los bordes de ruptura de los enlaces Si-O-Si y Al-O-Si, y los grupos siloxanos laminares de los planos basales externos o interlaminares. Estos últimos se sitúan entre los sitios cargados y poseen carácter hidrofóbico (Jaynes & Boyd, 1991).

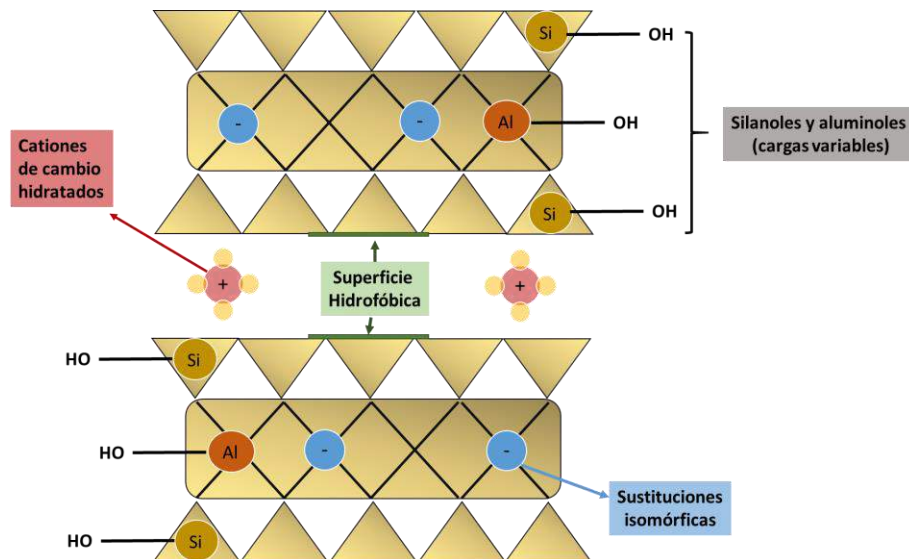


Figura 26: Centros activos de un mineral esmectítico en relación con la adsorción de compuestos orgánicos.

La interacción de estos centros activos con compuestos orgánicos depende en gran medida de la carga que presenten estos últimos. Así, los compuestos catiónicos y protonables se adsorben rápidamente, atraídos por la carga negativa permanente de las láminas, intercambiándose con el catión interlaminar o mediante la formación de puentes de H y enlaces polares (Hermosín & Pérez-Rodríguez, 1981; Cox et al., 1997b). Por el contrario, aquellos compuestos que son aniónicos o ácidos débiles presentan una baja afinidad por las superficies cargadas negativamente del mineral y, al ser repelidos por estas, su adsorción es muy baja o prácticamente nula (Celis et al., 1999a). En ocasiones, los bordes de las láminas de las esmectitas pueden estar cargados positivamente, normalmente a valores de pH inferiores a 5, representando sitios de adsorción para especies aniónicas, que también pueden interactuar con metales polivalentes que ocupen sitios de intercambio o, si se produce el ambiente adecuado, mediante fuerzas de van der Waals (Lagaly, 2001). No obstante, estos sitios no son predominantes y la adsorción suele quedar gobernada por la presencia de carga negativa en la

superficie. En cuanto a los compuestos neutros e hidrófobos, estos no suelen presentar una elevada afinidad por las esmectitas, como consecuencia de las características hidrofílicas de su superficie conferidas por los cationes de cambio hidratados (Jaynes & Vance, 1996), mientras que los compuestos neutros con carácter polar que presenten ciertos grupos funcionales (-OH, =O, -NH₂...) son adsorbidos por fuerzas polares (ion-dipolo o dipolo-dipolo) o enlaces de coordinación (López-Cabeza, 2017).

c) Propiedades adsorbentes de las esmectitas modificadas con cationes orgánicos

Como se ha expuesto previamente, las características de carga de las esmectitas hacen que sean materiales adecuados para la adsorción de especies catiónicas y polares, tanto inorgánicas como orgánicas. La presencia de cationes inorgánicos hidratados confiere un carácter hidrofílico a su superficie, reduciendo su afinidad hacia moléculas orgánicas neutras hidrofóbicas (Jaynes & Vance, 1996). De forma análoga, los compuestos aniónicos son repelidos por las superficies basales con carga negativa de las esmectitas y presentan una escasa afinidad por las mismas (Celis et al., 1999b). Sobre esta base, para mejorar las propiedades de adsorción de las esmectitas hacia estos compuestos, puede procederse a la modificación de las propiedades superficiales de la arcilla mediante la sustitución de los cationes inorgánicos presentes en el espacio interlamina por cationes orgánicos (Jordan, 1949; Akelah et al., 1994; Ruiz-Hitzky & Van Meerbeek, 2006). Estos cambios son posibles porque las esmectitas son filosilicatos de tipo expansibles, lo que les permite incorporar cationes incluso muy voluminosos dando lugar a las denominadas organoarcillas.

Los cationes orgánicos más empleados para la modificación de esmectitas y obtención de organoarcillas son los cationes alquilamonio cuaternarios, que suelen representarse como $[(\text{CH}_3)_n\text{NR}_{4-n}]^+$, siendo R un hidrocarburo aromático o alifático (Fig. 27) (Cornejo et al., 2008), aunque también se emplean otros compuestos, como especies poliméricas (Ruiz-Hitzky & Van Meerbeek, 2006; Gámiz et al., 2010; Celis et al., 2012).

Las organoarcillas, tradicionalmente, se han clasificado en dos tipos dependiendo del catión orgánico introducido en la interlámina y cuya disposición en este espacio depende principalmente de la combinación entre su tamaño y la densidad de carga de la arcilla. Por tanto, se distinguen:

Organoarcillas organofílicas: este tipo se corresponde con aquellas esmectitas en las que se introduce en su interlámina iones del tipo alquilamonio de gran tamaño, como por ejemplo el hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) o el dioctadecildimetilamonio (DODMA) (Fig. 27), que se adsorben fuertemente a los sitios de carga de las esmectitas interaccionando entre sí y no son desplazados fácilmente por la presencia de cationes metálicos a elevadas concentraciones (Jones, 1983). La presencia de estos cationes genera una fase hidrofóbica que actúa como un medio de partición cambiando la naturaleza hidrofílica de la esmectita y presentando gran potencial para la adsorción de compuestos orgánicos de carácter neutro o incluso ácido (Jaynes & Vance, 1996; Celis et al., 1999a; Aguer et al., 2000). Mediante difracción de rayos X se han determinado distintas configuraciones que pueden adoptar los cationes alquilamonio cuaternarios en la interlámina, destacando la monocapa, la bicapa, la estructura pseudoditrimolecular y la parafínica. Estas configuraciones se muestran en la Figura 28A (Lagaly, 1982; Phuekphong et al., 2020).

Organoarcillas adsortivas: son aquellas en las que el catión orgánico se dispone como especies discretas en la interlámina del mineral arcilloso y, al contrario que en las organofílicas, no forman una fase de partición (Fig. 28B). En estas organoarcillas, los cationes orgánicos actúan como pilares no hidratados que abren las láminas de la arcilla exponiendo la abundante superficie de siloxano (Lee et al., 1990; Jaynes & Boyd, 1991; Brixie & Boyd, 1994). Ejemplos de cationes modificadores que dan lugar a organoarcillas de este tipo son el tetrametilamonio (TMA) y el feniltrimetilamonio (FTMA) (Fig. 27).

Por otro lado, las esmectitas también han sido modificadas selectivamente con cationes orgánicos, distintos a los alquilamonios cuaternarios tradicionales, con grupos funcionales apropiados para la adsorción selectiva de un determinado compuesto. Este es el caso de Cruz-Guzmán et al. (2004, 2005), quienes prepararon organoarcillas funcionalizadas usando los cationes L-carnitina, éster dimetilico de la L-cistina, éster etílico de la L-cisteína y tiamina (Fig. 29) y observaron que la capacidad adsorbente de las organoarcillas variaba según la naturaleza del catión introducido, lo que se atribuyó al grupo funcional del catión modificador y a efectos estéricos.

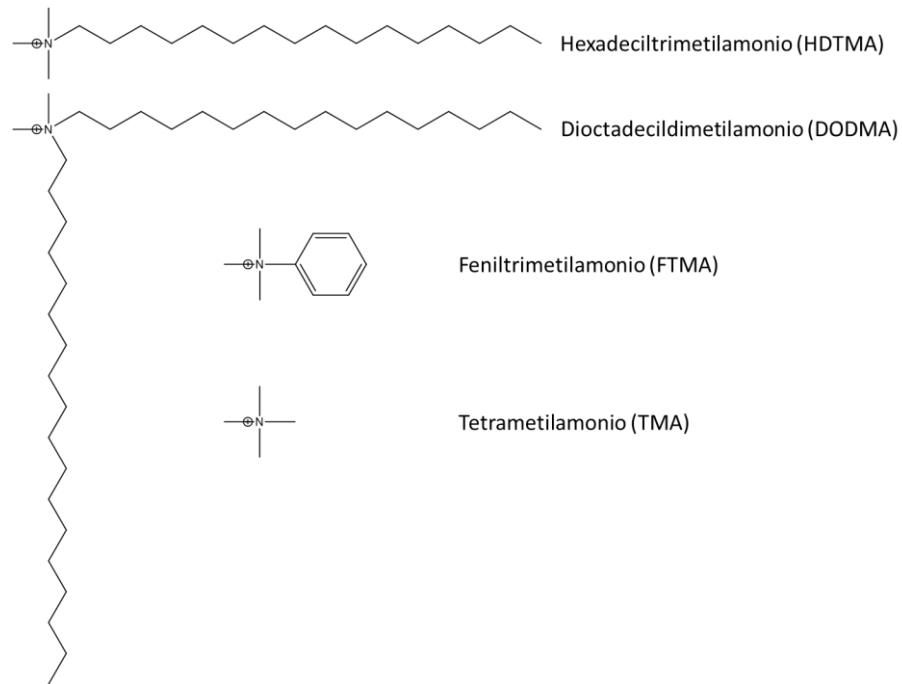


Figura 27: Cationes alquilamonios utilizados en la modificación de esmectitas.

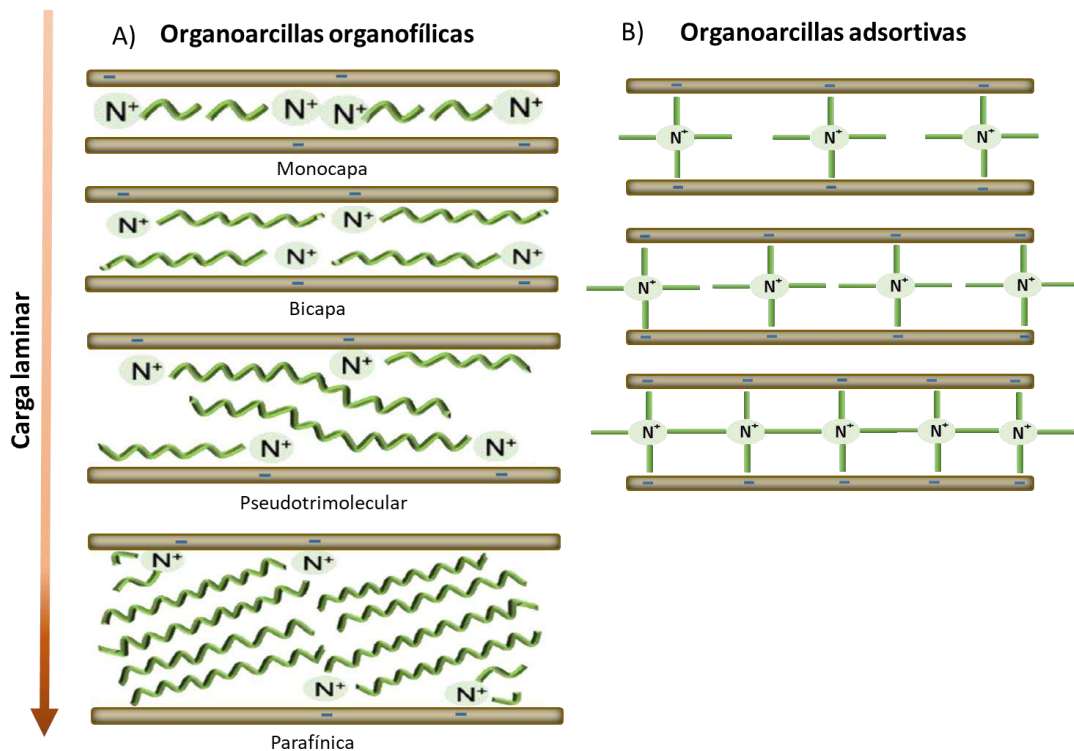


Figura 28: Posibles disposiciones de cationes orgánicos en la interlámina de una esmectita dependiendo de su tamaño y de la carga laminar del mineral (adaptado de Phuekphong et al., 2020).

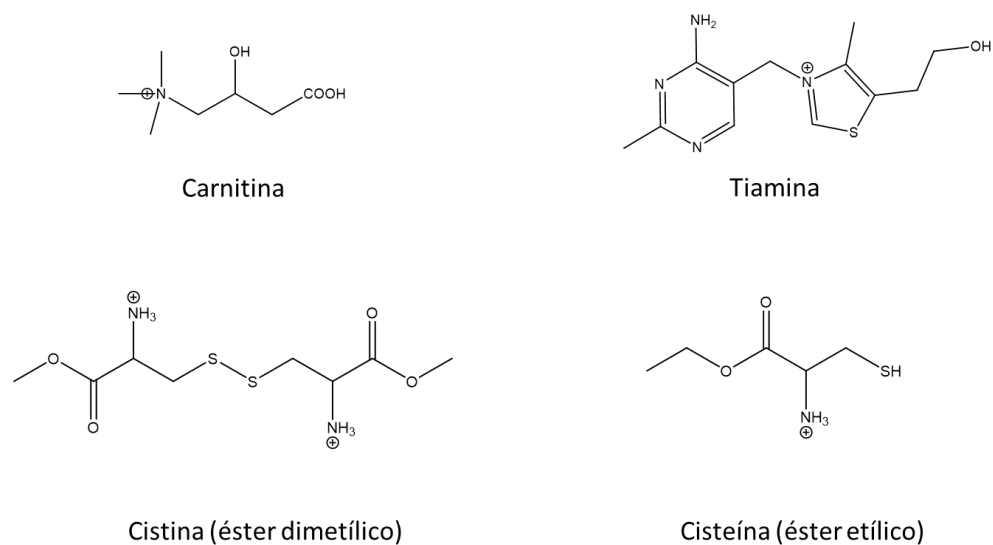


Figura 29: Cationes amonios naturales empleados en la modificación de esmectitas.

En cuanto a la interacción de arcillas y organoarcillas con compuestos naturales bioactivos, la mayoría de la literatura recoge la interacción de aceites esenciales con minerales de la arcilla con el fin de obtener nanocomposites con aplicación en ámbitos como el de la alimentación para el envasado de alimentos (Cheikh et al., 2022), el desarrollo de antifúngicos en construcción (Fernández et al., 2020) y también el control de plagas (de Oliveira et al., 2022).

La mayoría de los mecanismos de adsorción descritos entre los componentes de aceites esenciales, que en su mayoría son monoterpenos, y montmorillonitas tanto sin modificar como modificadas son los descritos hasta el momento e incluyen principalmente interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals. Así, Giannakas et al. (2017) combinaron análisis de FTIR y XRD para estudiar el mecanismo de adsorción de componentes de aceites esenciales a nanoarcillas. Los resultados revelaron que no existieron cambios en el espaciado basal en los difractogramas de rayos X. Sin embargo, los espectros de infrarrojos revelaron bandas características de los aceites esenciales que indicaron que estos compuestos orgánicos se adsorbieron en el mineral de la arcilla mediante enlaces de hidrógeno. La activación ácida de las montmorillonitas también ha sido una metodología estudiada para incrementar la afinidad hacia compuestos naturales. Nakhli et al. (2018) activaron una montmorillonita y una caolinita mediante tratamiento con H_2SO_4 ,

aumentando su afinidad por sabinena, que es el principal componente de los aceites esenciales de *Xylopiya aethiopyca*.

Un enfoque adicional es la preparación de arcillas modificadas con polímeros para ser funcionalizadas y que puedan actuar como portadores de compuestos bioactivos provenientes de plantas. Esta es una de las estrategias investigadas en el ámbito del envasado de alimentos (Cheikh et al., 2022), consiguiéndose ciertas ventajas como estabilizar estos compuestos bioactivos y lograr su liberación controlada al medio (Cheikh et al., 2022). Giannakas et al. (2020), por ejemplo, prepararon una montmorillonita modificada con el polímero quitosano que, al incorporar el extracto de aceite esencial de tomillo, formó un film con propiedades antioxidantes, prometedoras para ser usado en el envasado de alimentos.

I.4.1.2. Hidróxidos dobles laminares

a) Estructura

Los hidróxidos dobles laminares (HDL) son materiales con una estructura similar a la de los filosilicatos y que muestran propiedades útiles para una gran cantidad de aplicaciones. Se conocen también como compuestos tipo hidrotalcita por su similitud estructural con la hidrotalcita (HT), un mineral encontrado en la naturaleza con la fórmula $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$,

La estructura de la hidrotalcita resulta del apilamiento de láminas similares a las de brucita $[Mg(OH)_2]$, con la aparición de carga positiva debido a la sustitución isomórfica parcial de cationes Mg^{2+} por Al^{3+} , que es compensada por aniones carbonato (CO_3^{2-}) que se sitúan en la interlámina. Los HDL pueden describirse con la fórmula general: $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x(OH)_2]A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O$ donde $M^{II} = Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} \dots$; $M^{III} = Al^{3+}, Fe^{3+}, Cr^{3+} \dots$; $A^{n-} = CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, Cl^-, NO_3^- \dots$ y x varía entre 0.22 y 0.33 (Miyata, 1975). La facilidad con la que se pueden sintetizar variando su composición, su bajo coste, sus características superficiales y, sobre todo, su biocompatibilidad los convierte en materiales muy apreciados en diversos campos de actividad.

La estructura de los HDL permite varias técnicas de síntesis, pero existen tres métodos principales: (1) el método de coprecipitación, también conocido como síntesis directa, donde disoluciones de M^{II} y M^{III} con la relación M^{II}/M^{III} deseada se adicionan simultáneamente a una disolución aniónica agitando vigorosamente a $pH = 9-10$ (Reichle, 1986); (2) síntesis mediante

intercambio aniónico, donde las propiedades de intercambio aniónico que presentan los HDL permiten el reemplazo de los aniones originales de la interlámina por otros aniones de interés presentes en disolución acuosa. Esto da lugar a una gran variedad de HDL sintéticos, con aniones tanto inorgánicos como orgánicos, así como con complejos aniónicos y polioxometalatos (Rives & Ulibarri, 1999); y (3) el método de reconstrucción o rehidratación, basado en la propiedad de algunos HDL conocida como "efecto de memoria". Este término se refiere a la capacidad de los óxidos mixtos de tipo NaCl resultantes de la calcinación del HDL a una temperatura de 450-500°C de recuperar la estructura estratificada original de hidrotalcita a través de su rehidratación y adsorción de aniones de una disolución acuosa (Miyata, 1980).

b) Características adsorbentes de los hidróxidos dobles laminares

Las características estructurales de los HDL y sus productos calcinados, su capacidad de intercambio aniónico y las propiedades de reconstrucción descritas anteriormente permiten que estos compuestos se utilicen como adsorbentes de muchas especies aniónicas diferentes. Los HDL se caracterizan por tener una elevada superficie específica (100-300 m²/g) y presentan "efecto memoria", una distribución homogénea de los iones metálicos en los productos de calcinación, propiedades ácido-base según la composición metálica y una alta capacidad de intercambio aniónico (López-Cabeza, 2017). Casi no hay limitación en la naturaleza de los aniones usados para compensar la carga positiva de las láminas. Los dos mecanismos principales de adsorción para las especies aniónicas son el intercambio de aniones y la rehidratación del producto de calcinación, representados en la Figura 30. Por el contrario, la capacidad de adsorción de los HDL hacia cationes o para moléculas no-iónicas, hidrofóbicas y de baja polaridad suele ser muy limitada. Algunos procedimientos que se suelen utilizar para mejorar la capacidad adsorbente de los HDL son la activación con tratamientos ácidos o básicos, las reacciones de intercambio aniónico, el pilareado y los procedimientos físicos.

La adsorción de compuestos aniónicos a los HDL generalmente aumenta con la carga de la lámina del mineral y depende en gran medida de la naturaleza del anión interlaminar de partida, ya que los aniones inorgánicos monovalentes se reemplazan más fácilmente que los divalentes. Según Miyata (1983), la facilidad con la que algunos aniones inorgánicos se desplazan de la interlámina varía en el siguiente orden: $I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > SO_4^{2-} > CO_3^{2-}$. La fuerte afinidad del carbonato por la interlámina de los HDL es una propiedad importante de estos materiales, porque la presencia de carbonato en disolución acuosa es difícil de evitar

y puede competir fuertemente con otros aniones presentes en la disolución. Para salvar esta dificultad durante procesos de adsorción de aniones orgánicos, se recurre al método de reconstrucción del producto calcinado y/o a la realización de la síntesis burbujando un gas inerte como el N_2 para desplazar a los aniones carbonato de la disolución. Así, Pavlovic et al. (2005) obtuvieron que un HDL basado en Mg/Al-carbonato calcinado a $500\text{ }^\circ\text{C}$ (HT-500) fue un adsorbente efectivo de los herbicidas aniónicos 2,4-D, clopiralida y picloram. En ocasiones, los HDL pueden ser reciclados para obtener el material de partida mediante combustión del anión adsorbido y volver a usarse en ciclos sucesivos de calcinación-hidratación (Ulibarri et al., 1995).

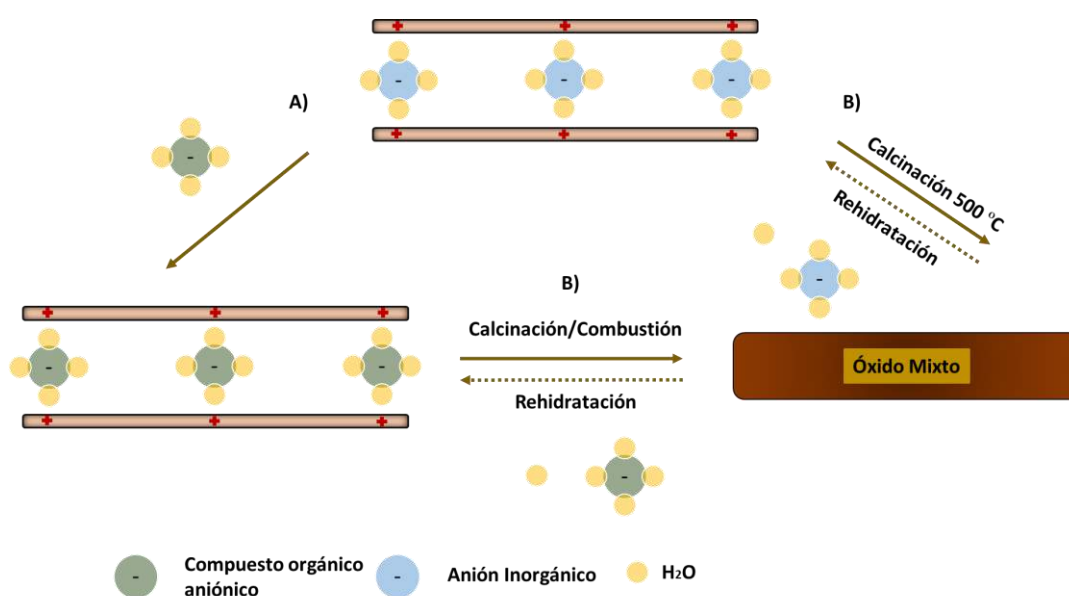


Figura 30: Representación de los distintos mecanismos que presentan los HDL para la adsorción de compuestos aniónicos: A) intercambio aniónico y B) calcinación/rehidratación (Cornejo et al., 2008).

c) Propiedades adsorbentes de los hidróxidos dobles laminares modificados con aniones orgánicos

La capacidad de adsorción de los HDL para compuestos hidrofóbicos no iónicos suele ser escasa. De manera similar a los filosilicatos, la intercalación de grandes aniones orgánicos en los HDL puede cambiar la naturaleza de su superficie de hidrofílica a hidrofóbica y aumentar su capacidad de adsorción de estos compuestos. Se han utilizado

muchos aniones orgánicos para modificar las propiedades de adsorción, pero los más utilizados han sido los tensioactivos dodecilsulfato (DDS) y dodecibencenosulfonato (DBS) (Meyn et al., 1990; Lagaly & Beneke, 1991; Pavlovic et al., 1997) (Fig. 31). La fuerte afinidad de estos surfactantes por la interlámina de los HDL y su tendencia a formar micelas dan como resultado la creación de un entorno hidrófobo.

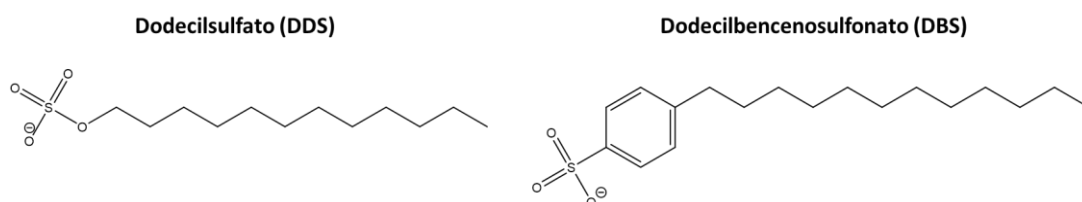


Figura 31: Estructura de los aniones orgánicos más empleados para modificar hidrotalcitas.

Los organo-HDL u organohidrotalcitas se pueden sintetizar fácilmente mediante síntesis directa, intercambio aniónico o por rehidratación del óxido mixto en presencia del surfactante aniónico. Debido a la gran densidad de carga superficial de los HDL, las moléculas del surfactante generalmente se orientan perpendicularmente a las láminas, aunque la síntesis y el secado pueden influir en su inclinación e incluso dar como resultado la formación de bicapas. Dependiendo del tamaño de las cadenas alquílicas del anión, los espaciados basales de los organo-HDL pueden variar entre 1.7 y 4.7 nm (Meyn et al., 1990; Clearfield et al., 1991).

Más recientemente, se ha buscado la incorporación de aniones que puedan resultar menos dañinos para el medio ambiente en el caso de que los HDL modificados puedan alcanzar suelos o ambientes acuáticos tras su aplicación. En este contexto, Celis et al. (2014) compararon la modificación de un HDL de Mg/Al-CO₃ con ácidos grasos con el mismo número de carbonos (C18) pero que contenían un número diferente de insaturaciones en su cadena (Fig. 32). Demostraron que la capacidad de adsorción de cada organo-HDL dependió del grado y tipo de insaturación. Los ácidos grasos cis-insaturados dieron lugar a organo-HDL con una menor afinidad por plaguicidas no iónicos que los trans-insaturados, al originar estructuras menos hidrofóbicas en el espacio interlamilar.

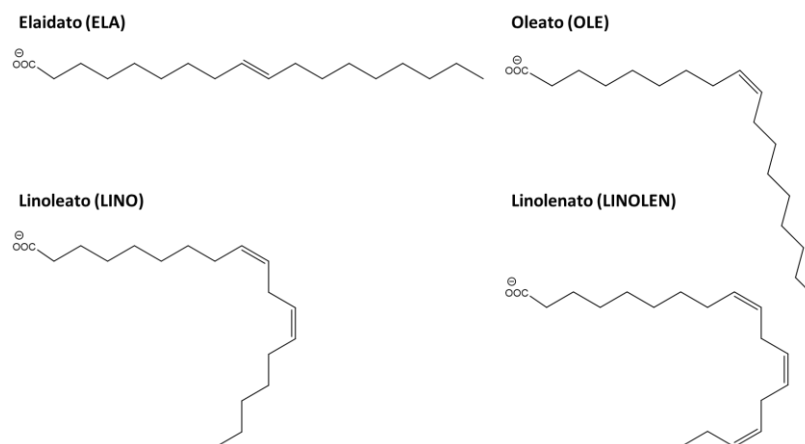


Figura 32: Ácidos grasos empleados para modificar hidrotalcitas.

En lo que se refiere a su interacción con compuestos bioactivos, los hidróxidos dobles laminares han sido menos estudiados que las esmectitas. Por ejemplo, Lobo-Sánchez et al. (2018) prepararon un HDL de Zn/Al con una relación 3:1 que mostró capacidad bactericida tras la adsorción de un extracto de aceite de eucalipto. De forma similar, Radwan et al. (2022) adsorbieron diferentes sustancias extraídas del aceite de hinojo en un HDL de Mg/Al y prepararon nanocomposites que presentaron buenas propiedades insecticidas a través de su desorción controlada.

1.4.1.3. Granulación de compuestos laminares para su aplicación como adsorbentes

Una de las formulaciones utilizadas para la aplicación al campo de plaguicidas es mediante su conformación en gránulos, que presenta ciertas ventajas frente al resto de formulados, como la de requerir una escasa manipulación al permitir su aplicación directa. La granulación, también conocida como aglomeración, peletización o formación de esferas, consiste en la agregación de partículas finas en una masa semipermanente de mayor tamaño. La granulación encuentra aplicaciones en una amplia gama de industrias, incluido el procesamiento de minerales, productos agrícolas, detergentes, productos farmacéuticos, productos alimenticios y productos químicos especiales.

El proceso de granulación húmeda se puede realizar de varias maneras, como rociar un aglutinante líquido sobre las partículas mientras se agitan en un tambor giratorio,

granuladores de lecho fluidizado, mezcladores de alto cizallamiento o dispositivos similares. El líquido une las partículas por la combinación de fuerzas capilares y viscosas hasta que se forman enlaces más permanentes por el secado posterior (Visavale et al., 2007). Normalmente, la granulación húmeda comprende los siguientes pasos (Iveson et al., 2001):

1. Humectación y nucleación, donde el aglutinante líquido se pone en contacto con el polvo seco. Esta es una etapa importante en el proceso de granulación, pues se espera que el aglutinante se distribuya uniformemente por todo el lecho para dar gránulos de núcleos de tamaño uniforme.

2. Consolidación y crecimiento, donde la colisión entre dos gránulos, gránulos y polvo de alimentación o gránulos y el equipo conducen a la compactación y crecimiento de los gránulos. El crecimiento ocurre siempre que el material presente en el granulador choca y se pega. El proceso de crecimiento comienza tan pronto como el líquido entra en contacto con la masa de polvo agitada. Durante la agitación, los gránulos generalmente se consolidan.

3. Desgaste y rotura, donde los gránulos húmedos o secos se rompen debido a un impacto, desgaste o compactación en el granulador o durante la manipulación posterior. La rotura de los gránulos húmedos suele determinar la distribución final del tamaño de los gránulos, especialmente en un granulador de alto cizallamiento. La rotura se puede utilizar para limitar el tamaño máximo de los gránulos o para ayudar a distribuir un aglutinante viscoso (Bardin et al., 2004).

Las arcillas se han propuesto como adsorbentes de plaguicidas sintéticos, pero, aunque presenten gran poder adsorbente, no se pueden aplicar directamente en forma de polvo debido a su pequeño tamaño de partícula y los problemas de inhalación que conllevan (Durán et al., 2019). La conversión de polvos de arcilla en gránulos mejora la permeabilidad y retrasa la desorción de los compuestos debido a la estructura porosa y la densidad aparente del material granulado (Du et al., 2017). Asimismo, se facilita el manejo del material al evitar la segregación de partículas finas durante su uso (Visavale et al., 2007).

En el caso de las arcillas, existen muchos tipos de aditivos aglomerantes entre los que se encuentran celulosas o alginatos, ceras y resinas (Bueno et al., 2021). A veces, el uso de ligantes para la granulación de arcilla puede fallar debido al hinchamiento de las esmectitas.

Sin embargo, las organoarcillas, modificadas con cationes de amonio cuaternario, se pueden granular fácilmente, ya que el catión modificador actúa como coaglutinante (Alther, 2004).

Existen en la bibliografía ejemplos de aplicación de organoarcillas granuladas en el ámbito de la descontaminación de aguas. Así, Du et al. (2017) obtuvieron gránulos de una bentonita modificada con el catión hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) que presentó características satisfactorias para la adsorción del contaminante tributilo de estaño. Más recientemente, Durán et al. (2019) obtuvieron diferentes gránulos de una organobentonita que resultaron ser efectivos como componentes de filtros al presentar buena resistencia al agua y obtenerse porcentajes de adsorción similares a los obtenidos con el polvo de la organoarcilla.

En esta Tesis Doctoral hemos empleado una organoarcilla comercial Cloisite 10A para la formación de gránulos en su aplicación como adsorbente de compuestos alelopáticos. Gámiz & Celis (2021) prepararon gránulos a base de esta organoarcilla comercial y los utilizaron como soportes del monoterpeno S-carvona. Los gránulos preparados se comportaron como un sistema de liberación lenta, reduciendo las pérdidas por transporte del compuesto alelopático y prolongando su efecto fitotóxico en ensayos de laboratorio.

I.4.2. Uso de enmiendas orgánicas como adsorbentes

La adición de enmiendas orgánicas constituye una práctica que mejora las propiedades físico-químicas de los suelos agrícolas, al incrementar el contenido en carbono orgánico, la capacidad de retención de agua y la porosidad del suelo (Tester, 1990). Al mejorar la estructura del suelo, la biodisponibilidad de los nutrientes y la actividad microbiana, aumenta la fertilidad, por lo que puede contribuir a recuperar suelos degradados (García et al., 2017; Galán-Pérez & Peña, 2019). Además, la adición de enmiendas orgánicas suele tener un importante efecto en los procesos de retención de compuestos orgánicos y también en su degradación (Si et al., 2006). Para plaguicidas sintéticos, se ha comprobado que en suelos con abundante materia orgánica, propia o aplicada a través de enmiendas, disminuyen las pérdidas de agroquímico por los fenómenos de lixiviación y escorrentía en comparación con suelos con poca materia orgánica (Gámiz, 2012; Perez-Lucas et al., 2021). Es de esperar, por tanto, que las enmiendas orgánicas puedan tener un efecto similar sobre el comportamiento de los compuestos alelopáticos.

El interés acerca de los cambios que puede provocar la aplicación de enmiendas orgánicas en la dinámica de los plaguicidas en el suelo surge en la década de los 80 (Gerstl & Helling, 1985; Azam et al., 1988). A raíz de los beneficios encontrados, se han llevado a cabo estudios con enmiendas muy diferentes como el carbón vegetal (Bosetto et al., 1992), la turba (Moorman et al., 2001), lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (Celis et al., 1998a,b; González et al., 2008), residuos sólidos urbanos (Fernández et al., 2000; Cox et al., 2001) y residuos o subproductos agroalimentarios (Businelli, 1997; Marín-Benito et al., 2009). A nivel nacional, por la importancia del sector relacionado con la producción del aceite de oliva, los residuos de almazaras, como el alperujo, han sido muy estudiados (Albarrán et al., 2003; Cox et al., 2004a; López-Piñeiro et al., 2013). Por ser uno de los materiales ensayados como enmienda en la presente Tesis Doctoral, las características del alperujo se resumen a continuación.

I.4.2.1. El alperujo como enmienda agrícola

La producción de aceite de oliva a través del sistema de dos fases como el que se utiliza en España lleva asociada la generación de un subproducto sólido formado por fragmentos de las aceitunas, aguas de vegetación y restos grasos, conocido como alperujo (Fig. 33A). El alperujo tiene una elevada humedad, una relación C/N alta y carácter ácido. Es rico en lignina, hemicelulosa celulosa, proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Albuquerque et al., 2004). Además, contiene compuestos fenólicos a los que se les atribuye carácter fitotóxico (Albuquerque et al., 2006).

Con la finalidad de mejorar las propiedades físicas y químicas del alperujo y disminuir su fitotoxicidad, el producto que resulta de las almazaras suele someterse a un proceso de secado y compostaje. A través de este proceso, se produce una descomposición microbiana de la materia orgánica en un ambiente húmedo, templado y aeróbico, dando lugar a un material denominado compost (Fig. 33B). Estos residuos son apilados y acumulados. Por la acción de los microorganismos se producen reacciones exotérmicas que hacen que estos cúmulos puedan llegar a temperaturas de hasta 80°C en el centro, causando su pasteurización. Esta degradación por microorganismos de la materia orgánica hace que se produzca una reducción de masa de hasta un 50%.

I.4.2.2. El biochar de alperujo

El carbón biológico o biochar (BC) es un material que está recibiendo una gran atención en los últimos años como enmienda agrícola (Fig. 33C). Se forma a partir de la transformación termoquímica de biomasa mediante procesos de pirólisis, gasificación o carbonización hidrotermal, principalmente (Cha et al., 2016). A través de estos procesos, se genera un material muy estable que, al aplicarlo al suelo, incrementa la fertilidad, la capacidad de retención de agua, el potencial de captura de carbono y disminuye la emisión de gases con efecto invernadero. Aparte de la optimización de la producción de cultivos asociada a estos efectos, otra aplicación del biochar es su uso como adsorbente en la recuperación de suelos contaminados, tanto por metales pesados (Campos et al., 2021) como por contaminantes orgánicos (Gámiz et al., 2017b).

Los factores que más determinan las propiedades del biochar son la temperatura de obtención y el origen de la biomasa. Tang et al. (2013) investigaron la influencia de estas variables en la superficie específica y porosidad de diferentes biochars, relacionándola con la capacidad de adsorción. Los biochars preparados a una temperatura de pirólisis más elevada ($> 500\text{ }^{\circ}\text{C}$) presentan una estructura más grafitizada (aromática), una mayor superficie específica y un menor contenido en grupos funcionales que los preparados a menor temperatura (Gámiz et al., 2017b). La evolución de la estructura molecular y el desarrollo de microporos con la temperatura de calentamiento determinarán el comportamiento posterior del biochar como adsorbente de compuestos orgánicos, así como los mecanismos involucrados (Lian & Xing, 2017).



Figura 33: Muestras de: A) alperujo, B) alperujo compostado y C) biochar de alperujo.

Los residuos de almazaras constituyen una de las materias primas a partir de las cuales puede obtenerse biochar. Varios trabajos han determinado las propiedades adsorbentes de biochars obtenidos de alperujo, poniendo de manifiesto su elevada capacidad de adsorción para metales pesados (Ahmad et al., 2014) y compuestos orgánicos como los plaguicidas (Cabrera et al., 2011; García-Jaramillo et al., 2014).

I.4.2.3. Efectos de la adición de alperujo en la dinámica de los plaguicidas y compuestos alelopáticos

Se sabe que el efecto de las enmiendas orgánicas en la dinámica de los plaguicidas depende de las propiedades del suelo y de la enmienda, así como de las características del plaguicida. De forma similar a lo que ocurre con otros residuos orgánicos, la materia orgánica insoluble del alperujo suele aumentar la adsorción de los plaguicidas, mientras que el efecto de la materia orgánica soluble puede ser más variable (Cox et al., 2004b; Fernandes et al., 2006). Se ha descrito que la materia orgánica soluble del alperujo puede aumentar la adsorción, cuando recubre las partículas del suelo y proporciona nuevos sitios de interacción, o reducirla, por la formación de complejos solubles o por competencia por los sitios de adsorción de las partículas del suelo (Cox et al., 2004b; Peña et al., 2015).

En cuanto al efecto en la persistencia, la adición de alperujo puede ralentizar la degradación microbiana de los plaguicidas como consecuencia de una degradación preferencial de la materia orgánica proporcionada por la enmienda por parte de los microorganismos degradadores del suelo (Albarrán et al., 2003; Gámiz et al., 2019b). Este hecho es más habitual en el caso del alperujo fresco, que contiene un mayor contenido en materia orgánica lábil y, por tanto, fácilmente biodegradable. Los tratamientos de compostaje y pirólisis transforman la materia orgánica en compuestos más humificados y aromáticos, alterando también sus propiedades adsorbentes y sus efectos sobre los microorganismos del suelo respecto al material de partida (Fig. 34).

Mientras que la información acerca de los efectos que la adición de residuos orgánicos como el alperujo puede tener en la dinámica de los plaguicidas en el suelo es considerable, los estudios realizados sobre sus posibles efectos en la dinámica de los compuestos alelopáticos son mucho más escasos. La mayoría de los trabajos publicados en este sentido se han diseñado para demostrar que la adición de biochar puede ser útil para reducir la fitotoxicidad que determinados compuestos alelopáticos pueden ejercer sobre cultivos, a través de una

disminución de su biodisponibilidad (Rogovska et al., 2014; Lu et al., 2015; Sujeeun & Thomas, 2017; Zhang et al., 2018). Algunos estudios, sin embargo, apuntan a que, dependiendo de la naturaleza de la enmienda, es posible regular la biodisponibilidad del compuesto alelopático, por ejemplo, a través de un aumento de su persistencia, para potenciar su bioactividad (Gámiz et al., 2019b, 2021; Real et al., 2019, 2021). Teniendo esto en cuenta, la aplicación de compuestos alelopáticos en suelos enmendados podría constituir un escenario propicio para optimizar su actividad como herbicidas naturales, aunque este es un aspecto que se encuentra todavía muy poco explorado en la bibliografía.

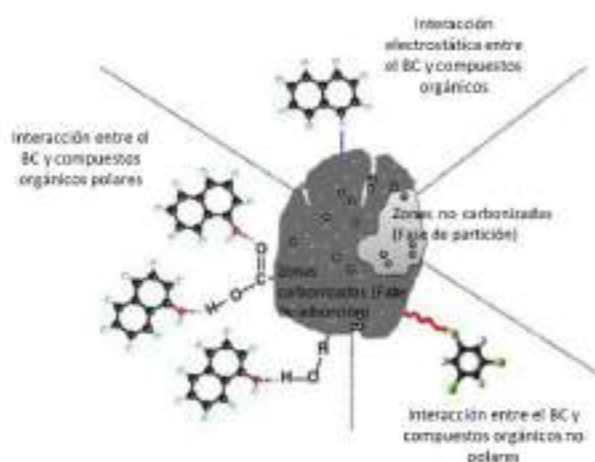


Figura 34: Posibles mecanismos de interacción entre el biochar y compuestos orgánicos (adaptado de Ahmad et al., 2014).

Capítulo II

Objetivos



Teniendo en cuenta la escasa información existente acerca de en qué medida los diferentes procesos medioambientales pueden afectar al destino y a la actividad biológica de los compuestos alelopáticos en el suelo, la presente Tesis Doctoral parte de la base de que mejorar el conocimiento de los procesos de adsorción, transporte y transformación que pueden sufrir los compuestos alelopáticos una vez que alcanzan el suelo podría permitir establecer las condiciones de uso más adecuadas para la expresión de su actividad biológica, así como diseñar estrategias dirigidas a mejorar su eficacia como plaguicidas naturales. Dos aspectos específicos a considerar son la posible enantioselectividad en el comportamiento de estos compuestos cuando contienen centros quirales en su estructura y el uso de materiales adsorbentes que, usados como enmiendas o soportes, pudieran servir para estabilizar este tipo de compuestos y mejorar su eficacia.

En este contexto, esta Tesis doctoral se plantea con dos objetivos generales:

- a) Profundizar en el conocimiento de los procesos de adsorción, transporte y transformación que compuestos representativos de importantes familias de alelopáticos pueden sufrir en suelos agrícolas, considerando su posible comportamiento enantioselectivo en el caso de que contengan centros quirales en su estructura.
- b) Evaluar el uso de materiales basados en arcillas y enmiendas orgánicas como adsorbentes con la finalidad de modular el comportamiento de los compuestos alelopáticos en el suelo para mejorar su eficacia.

Para alcanzar estos objetivos, se han seleccionado dos compuestos representativos de dos de las familias de alelopáticos más importantes: un compuesto fenólico del subgrupo de las cumarinas, **escopoletina**, y un terpenoide del subgrupo de los monoterpenos, **pulegona**. Además de por haberse propuesto su actividad alelopática, estos compuestos son también representativos de aquellos para los que un escaso conocimiento de su comportamiento en el suelo puede constituir un factor limitante en su potencial aplicación como plaguicidas naturales. Por otra parte, el monoterpeno pulegona contiene un centro quiral en su estructura, permitiendo abordar la evaluación de su posible comportamiento enantioselectivo.

II. Objetivos

En el estudio, se han utilizado **8 suelos agrícolas** mediterráneos con distintas propiedades físico-químicas y diversas **arcillas** (filosilicatos e hidróxidos dobles laminares) modificadas con iones orgánicos y **residuos de almazaras** (alperujo), en forma fresca, compostada y pirolizada (biochar), como adsorbentes moduladores del comportamiento de los compuestos alelopáticos.

Los objetivos específicos de esta Tesis, asociados a cada uno de los artículos que la componen, han sido:

- 1) Caracterizar la adsorción y disipación de escopoletina en diferentes suelos agrícolas, evaluando su fitotoxicidad a través de bioensayos con suelo para comprender el papel de este en su bioactividad e identificar condiciones que pudieran favorecer la expresión de la misma.
- 2) Estudiar los efectos en la adsorción y persistencia de escopoletina provocados por la adición de residuos de almazaras y organoarcillas a suelos poco propicios para la expresión de la bioactividad de este compuesto alelopático, estableciendo los vínculos entre los cambios en la adsorción y persistencia y la fitotoxicidad, con el fin de discernir si el tratamiento con este tipo de enmiendas pudiera potenciar la actividad herbicida del compuesto alelopático.
- 3) Desarrollar un procedimiento de granulación para mejorar las propiedades físicas de una organoarcilla, comparar las propiedades adsorbentes de la organoarcilla granulada y sin granular para escopoletina y establecer la capacidad de la organoarcilla granulada de proteger al compuesto alelopático de una rápida biodegradación en el suelo y de favorecer la expresión de su actividad fitotóxica.
- 4) Caracterizar la adsorción y disipación de las dos formas enantioméricas del monoterpeno pulegona, así como su fitotoxicidad hacia distintas especies de plantas en suelos agrícolas con distintas características físico-químicas, abordando si una reducción de las pérdidas de pulegona, inducida por un aumento de su adsorción, podría constituir una estrategia a través de la cual la bioactividad de los monoterpenos en el suelo pudiera ser potenciada.

Capítulo III

Resumen de resultados y discusión



III.1. Efecto de las propiedades del suelo en la biodisponibilidad de escopoletina y en la expresión de su actividad fitotóxica

Los compuestos alelopáticos se consideran una fuente de plaguicidas naturales con potencial para ser usados como alternativas a los formulados sintéticos. No obstante, tanto la comprensión de su papel ecológico como su posible uso en la protección de los cultivos se ven dificultados por la escasa información de la que suele disponerse acerca de los procesos que sufren estos compuestos una vez que alcanzan el suelo. La adsorción a los componentes minerales y orgánicos, los procesos de transformación química y/o biológica y los procesos de transporte afectan a la biodisponibilidad de los compuestos alelopáticos en el suelo y, finalmente, a su actividad fitotóxica.

Seleccionando a la hidroxycumarina escopoletina (Fig. 35) como representativa de un importante grupo de compuestos alelopáticos para el que se han descrito propiedades fitotóxicas, pero para el que existe muy poca información acerca de los procesos que pueden sufrir en el suelo (Baghestani et al., 1999; Fernández-Aparicio et al., 2013; Pan et al., 2015; Graña et al., 2017), la hipótesis de la que se partió para el **primer artículo** que compone esta Tesis Doctoral fue que profundizar en el conocimiento de los procesos que pueden determinar la biodisponibilidad de la escopoletina en los suelos podría ayudar a identificar escenarios en los que la actividad de esta y otras hidroxycumarinas pudiera expresarse mejor. Para abordar esta hipótesis, se realizaron ensayos de adsorción de escopoletina en diferentes suelos agrícolas, así como en adsorbentes modelos representativos de los constituyentes más activos de los mismos. Además, se realizaron experimentos de incubación para evaluar la persistencia de escopoletina bajo diferentes condiciones experimentales y se diseñaron bioensayos para comparar la fitotoxicidad del compuesto tanto en placas de Petri (sin suelo) como en macetas de suelo con dos especies sensibles al mismo, *Eruca vesicaria* y *Hordeum vulgare*.

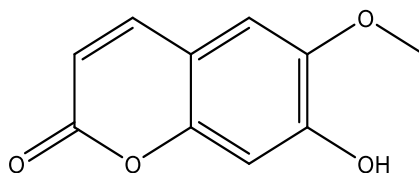


Figura 35: Estructura química de la escopoletina.

Los resultados de adsorción de escopoletina a los suelos (Fig. 36) mostraron que esta presentaba mayor afinidad por los suelos ácidos que por los suelos alcalinos, de manera que las correlaciones entre adsorción y las propiedades de los suelos reflejaron una relación negativa entre los coeficientes de adsorción (K_d) y el pH. Cuando solo se consideraron los suelos alcalinos, existió una relación positiva entre la adsorción y el contenido en fracción fina del suelo (limo/arcilla). También se concluyó que la adsorción del compuesto en suelos ácidos estuvo dominada por interacciones débiles, mientras en suelos alcalinos, en especial arcillosos, adquirieron importancia interacciones más fuertes con los constituyentes minerales de los mismos (filosilicatos y óxidos de Fe/Al).

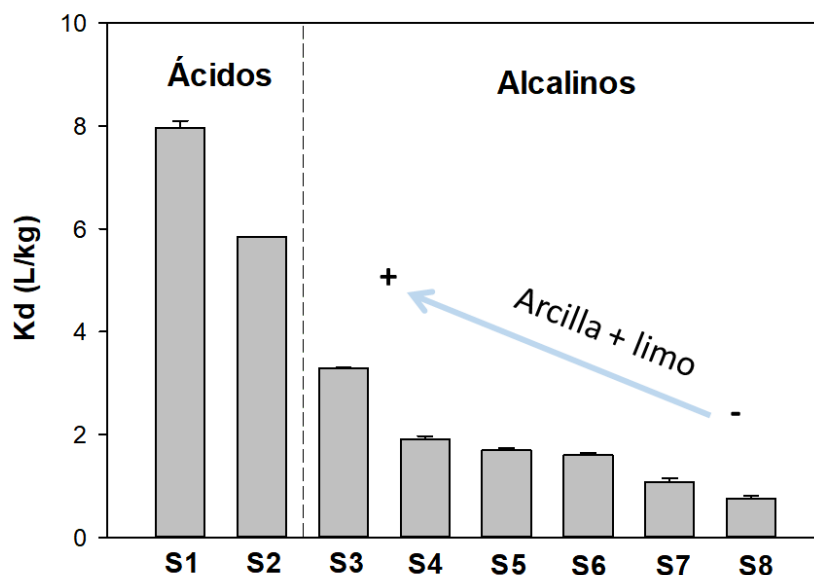


Figura 36: Coeficientes de adsorción (K_d) de escopoletina en 8 suelos agrícolas (S1-S8) con diferentes características fisicoquímicas.

Los resultados de los experimentos de disipación de escopoletina reflejaron que su persistencia en los suelos fue escasa, con constantes de degradación que resultaron en tiempos de vida media ($t_{1/2}$) inferiores a 4 días. Los valores de $t_{1/2}$ en los suelos ácidos fueron ligeramente mayores que en los alcalinos (Fig. 37), lo cual se relacionó con la mayor adsorción de escopoletina observada en suelos con niveles de pH inferiores al pK_a del compuesto. Asimismo, la degradación de escopoletina en los suelos transcurrió principalmente por vía microbiana, ya que tras la esterilización de los suelos el compuesto mostró un aumento de la

persistencia, alcanzando valores de $t_{1/2}$, obtenidos por extrapolación, superiores a 29 días (Fig. 37). Los estudios de persistencia de escopoletina en un suelo alcalino bajo distintas condiciones de humedad, temperatura y concentración inicial de compuesto pusieron de manifiesto que su concentración inicial y su adición al suelo en condiciones moderadas de temperatura y humedad tuvieron poco impacto en su velocidad de degradación. Condiciones extremas de temperatura y sequedad, sin embargo, incrementaron notablemente la persistencia de escopoletina en el suelo.

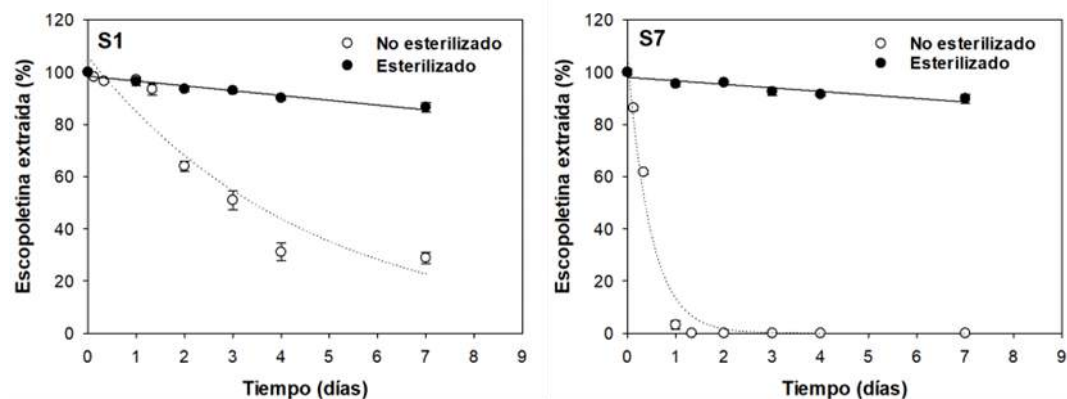


Figura 37: Curvas de disipación de escopoletina en un suelo ácido (S1) y un suelo alcalino (S7) esterilizados y sin esterilizar.

Los bioensayos llevados a cabo en placas de Petri sin suelo revelaron que el principal efecto fitotóxico de escopoletina fue un efecto inhibitorio en el crecimiento radicular de las plantas ensayadas, *Eruca vesicaria* y *Hordeum vulgare*, más acentuado en la planta dicotiledónea que en la monocotiledónea, similar a lo observado con herbicidas auxínicos (Graña et al., 2017). En macetas, la presencia de suelo tuvo un efecto muy pronunciado en la expresión de su fitotoxicidad, de manera que escopoletina sólo expresó su actividad fitotóxica en suelos ácidos, pero no en alcalinos (Fig. 38). Este hecho se explicó por la combinación de dos efectos. Por una parte, la mayor adsorción registrada en suelos ácidos protegió al compuesto de su biodegradación, alargando su persistencia. Por otra, al transcurrir la adsorción en suelos ácidos mediante interacciones débiles, estas favorecieron la desorción progresiva de escopoletina manteniendo concentraciones biodisponibles suficientes para ejercer su actividad biológica (Blum, 1998; Kaur et al., 2009).

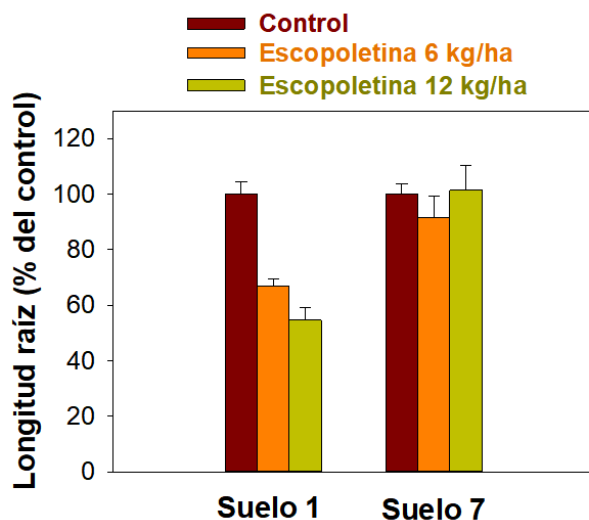


Figura 38: Efecto de escopoletina aplicada a dosis de 6 y 12 kg/ha en el crecimiento de la raíz de *Eruca vesicaria* sembrada en macetas de un suelo ácido (S1) y un suelo alcalino (S7).

En resumen, los resultados recopilados en el primer artículo de esta Tesis ilustran cómo la actividad de los compuestos alelopáticos puede verse determinada por su comportamiento en el suelo y resaltan la importancia de conocer en profundidad los procesos de transferencia y transformación que pueden sufrir en el mismo a la hora de comprender tanto su papel ecológico como su verdadero potencial como plaguicidas naturales.

III.2. Uso de enmiendas orgánicas y materiales laminares como moduladores de la adsorción, persistencia y bioactividad de escopoletina en el suelo

La adición de enmiendas, tanto orgánicas como inorgánicas, a los suelos agrícolas es una práctica que suele tener un gran impacto en la dinámica de los plaguicidas sintéticos (López-Piñeiro et al., 2013; Gámiz et al., 2016b). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de cómo esta práctica puede afectar al comportamiento de los compuestos alelopáticos en el suelo y a la expresión de su actividad biológica. Sobre la base de los resultados obtenidos en el primer artículo, en la **segunda publicación** que compone esta Tesis Doctoral se partió de la hipótesis de que la adición de enmiendas orgánicas y complejos organoarcillosos podría alterar la escasa adsorción y persistencia que presentó la escopoletina en suelos alcalinos, modificando la limitada bioactividad que esta hidroxycumarina pareció mostrar en este tipo de

suelos. El objetivo fue, por tanto, comprobar si la adición de enmiendas orgánicas y organoarcillas pudiera dar lugar a cambios en la adsorción y persistencia del compuesto alelopático que favorecieran la expresión de su actividad fitotóxica en un suelo poco propicio para ello. Las enmiendas orgánicas seleccionadas para el estudio fueron un alperujo fresco (OMW), un alperujo compostado (OMWc) y biochar (BC) preparado a partir de este último. Las organoarcillas fueron una organomontmorillonita comercial (Cloi10) y una hidrotalcita modificada con aniones oleato preparada en el laboratorio (HT-OLE).

Los resultados mostraron que las enmiendas aumentaron la adsorción de escopoletina en el suelo en consonancia con sus afinidades individuales por el compuesto, es decir, siguiendo el orden: Cloi10 >> OMW > BC > OMWc > HT-OLE. Para las enmiendas con mayor afinidad por escopoletina (Cloi10, OMW y BC), un estudio de isotermas confirmó que sus propiedades adsorbentes se mantenían en un amplio rango de concentraciones iniciales del compuesto alelopático y un estudio de desorción sugirió un mecanismo de retención a través de interacciones débiles. En el caso de las organoarcillas (Cloi10 y HT-OLE) y el biochar (BC), los coeficientes de adsorción experimentales (K_{d-exp}) para los suelos enmendados resultaron ser inferiores a los calculados (K_{d-calc}) a partir de los coeficientes de adsorción individuales de los componentes de la mezcla, mientras que en el caso del alperujo compostado (OMWc) y, sobre todo, del fresco (OMW) los coeficientes de adsorción experimentales fueron superiores a los calculados (Tabla III).

Tabla III. Coeficientes de adsorción, K_d , experimentales y calculados para escopoletina en un suelo alcalino franco arcillo arenoso sin enmendar y enmendado con enmiendas orgánicas y organoarcillas.

	K_{d-exp} (L/kg)	K_{d-calc} (L/kg)	pH
Suelo			
Suelo sin enmendar	0.38 ± 0.04	0.38	8.4
Suelo + Enmiendas orgánicas			
Suelo + OMW	4.14 ± 0.29	2.98	7.9
Suelo + OMWc	0.99 ± 0.04	0.88	8.3
Suelo + BC	1.54 ± 0.10	2.18	8.4
Suelo + Organoarcillas			
Suelo + HT-OLE	< 0.15	0.88	9.1
Suelo + Cloi10	44.6 ± 6.6	> 385	8.4

Estas desviaciones se atribuyeron a fenómenos de competencia entre los constituyentes solubles del suelo y la escopoletina por los sitios de adsorción en la superficie de las enmiendas Cloi10, HT-OLE y BC (Gámiz et al., 2010) y a un mecanismo por el cual la materia orgánica soluble del alperujo fresco (OMW) pudo proporcionar sitios de adsorción adicionales en la superficie de las partículas del suelo tras su adsorción a las mismas (Celis et al., 1998a; Cox et al., 2004b; Peña et al., 2015).

Los resultados de los experimentos de disipación revelaron que la adición de las enmiendas aumentó significativamente la persistencia de escopoletina en el suelo, especialmente en el caso de Cloi10, OMW y BC (Fig. 39), lo que se atribuyó al hecho de que una mayor adsorción de escopoletina a los suelos enmendados la protegió de procesos biodegradativos (Gámiz et al., 2017a; Real et al., 2019). No obstante, medidas de la respiración del suelo sin tratar y tratado con las enmiendas reflejaron cambios tras la adición de las enmiendas. El resultado más remarcable fue el obtenido con OMW, que aumentó la respiración del suelo mucho más que las otras enmiendas e incrementó la persistencia de escopoletina en mayor medida que Cloi10 a pesar de presentar una afinidad por el compuesto diez veces menor que la organoarcilla. Se concluyó que una rápida mineralización de la materia orgánica lábil presente en OMW pudo contribuir a retrasar la degradación de escopoletina como consecuencia de una degradación preferencial de la materia orgánica de la enmienda por los microorganismos del suelo (Albarrán et al., 2003).

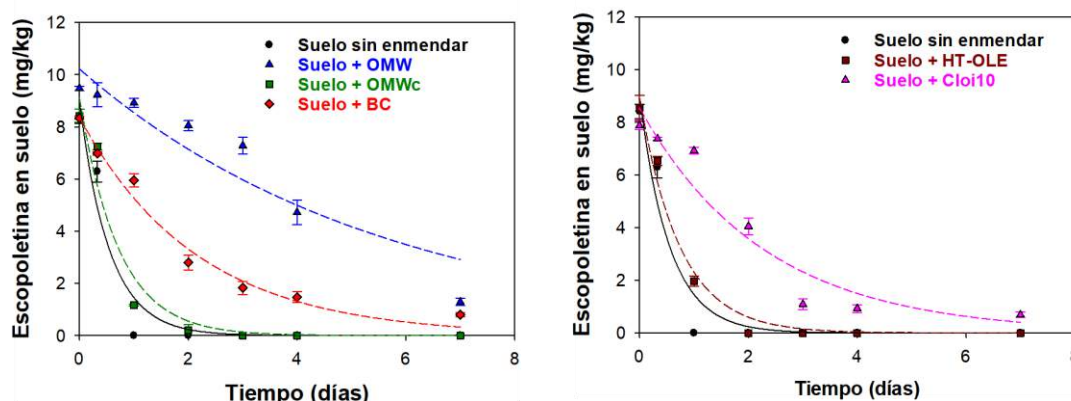


Figura 39: Efecto de la adición de enmiendas orgánicas y organoarcillas en la disipación de escopoletina en un suelo alcalino franco arcillo arenoso.

Con el fin de establecer una relación entre los cambios en la adsorción y persistencia de escopoletina y su actividad fitotóxica, se realizaron bioensayos con la especie *Lactuca sativa* en suelo sin enmendar y enmendado con Cloi10, OMW y BC. En el caso del suelo enmendado con OMW y Cloi10, las enmiendas *per se* produjeron efectos inhibitorios que oscurecieron una posible fitotoxicidad de escopoletina en los suelos enmendados. Sin embargo, la aplicación de escopoletina a suelo tratado con BC reflejó un grado de fitotoxicidad de escopoletina que no se observó en suelo sin tratar y que ocurrió a pesar de que la aplicación de BC *per se* no mostró efectos negativos sobre los parámetros de crecimiento de la planta estudiados (Fig. 40).

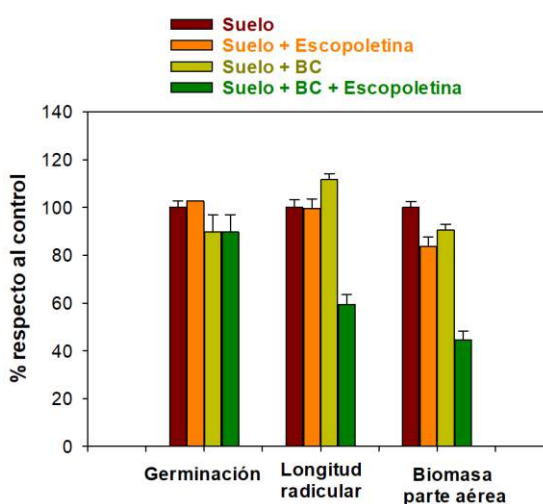


Figura 40: Efecto de la adición de biochar (BC) en la fitotoxicidad de escopoletina (12 kg/ha) en un suelo alcalino franco arcillo arenoso frente a *Lactuca sativa* L.

En conclusión, los resultados de este artículo mostraron que el tratamiento de suelos con enmiendas adecuadas podría proporcionar un escenario que favoreciera la expresión de la actividad biológica de ciertos compuestos alelopáticos a través de su impacto en la adsorción y persistencia de los mismos.

III.3. Gránulos de organoarcilla como adsorbente de escopoletina y su aplicación como soportes del compuesto alelopático para protegerlo de una rápida degradación en el suelo

Los resultados que se incluyen en el **tercer artículo** que compone esta Tesis Doctoral completan los estudios realizados en la misma con la hidroxycumarina escopoletina. En los

trabajos anteriores encontramos que la expresión de la fitotoxicidad de escopoletina dependía del tipo de suelo y, específicamente, de cómo la adsorción y la persistencia afectaban a su biodisponibilidad. Asimismo, observamos que la arcilla organofílica comercial Cloisite 10A, empleada como enmienda, aumentaba la persistencia de escopoletina en suelos alcalinos al modificar su capacidad de adsorción. Partiendo de la base de que escopoletina presenta adsorción reversible en esta organoarcilla, en este trabajo postulamos que, mediante su adsorción a la misma, podría ser posible modular su biodisponibilidad y, por tanto, la expresión de su actividad biológica. No obstante, la aplicación directa al suelo de organoarcillas en forma de polvo presenta algunos inconvenientes que necesitan considerarse, como, por ejemplo, los riesgos de ingesta, inhalación y dispersión por fenómenos ambientales como el viento o la lluvia o su rápida pérdida de poder adsorbente una vez que alcanzan el suelo (Du et al., 2017; Gámiz et al., 2017a).

En este contexto, uno de los objetivos planteados en el tercer artículo fue desarrollar un procedimiento de granulación que mejorara las propiedades físicas de la organoarcilla comercial Cloisite 10A y comparar las propiedades adsorbentes de los gránulos y el polvo de la misma para escopoletina y sus efectos en la degradación del compuesto en un suelo alcalino bajo condiciones controladas de laboratorio. El estudio se completó ensayando la persistencia y fitotoxicidad de una formulación consistente en gránulos de la organoarcilla con escopoletina previamente adsorbida en un escenario real en condiciones de campo.

Los resultados mostraron que la adsorción de escopoletina en la organoarcilla en forma de polvo fue prácticamente instantánea, alcanzándose el máximo de adsorción (86%) a las 8 h de contacto entre el adsorbente y el adsorbato. Para la forma granulada, sin embargo, la cinética de adsorción fue más lenta; la cantidad de escopoletina adsorbida de forma inmediata por los gránulos fue insignificante y sólo después de 72 h la adsorción alcanzó valores similares a los observados para el polvo (Fig. 41). La cinética de adsorción a los gránulos se ajustó de forma satisfactoria a un modelo de difusión intraparticular (Weber & Morris, 1963; Schwaab et al., 2017), lo que sugirió que el principal efecto de la granulación de la organoarcilla fue reducir la accesibilidad de los sitios de adsorción.

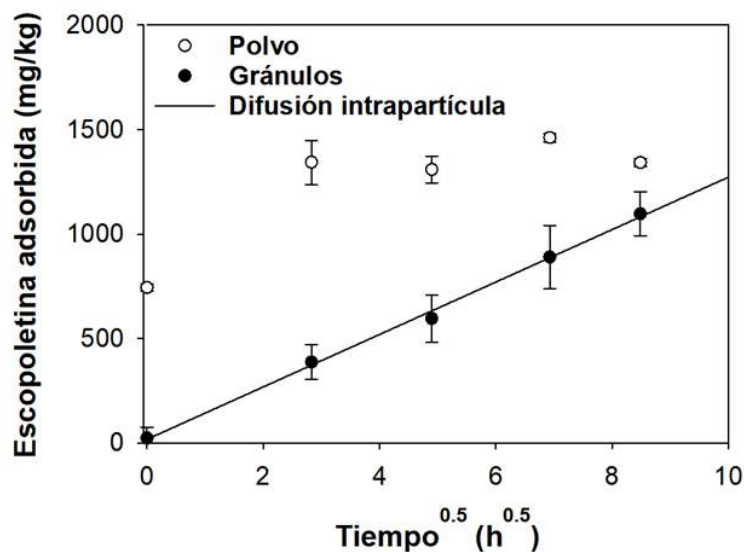


Figura 41: Cinéticas de adsorción de escopoletina a la organoarcilla Cloisite 10A en forma de polvo y de gránulos.

La adsorción de escopoletina observada en los gránulos y en el polvo se tradujo en un aumento de la persistencia del compuesto en el suelo tras tratar este con las diferentes formas de la organoarcilla, si bien el patrón de degradación fue distinto en función del tipo de tratamiento. La organoarcilla en polvo fue más efectiva que los gránulos a la hora de prolongar la persistencia de escopoletina a tiempos cortos de incubación ($t \leq 1$ día), mientras que este efecto se revirtió para tiempos más prolongados ($t \geq 2$ días). Por otra parte, los gránulos de organoarcilla con el compuesto preadsorbido incrementaron su vida media en el suelo de 0.34 a 14.4 días. Este fenómeno corroboró el mecanismo de adsorción propuesto y el efecto de la granulación de la organoarcilla en la adsorción y persistencia de escopoletina. Así, una mayor disponibilidad de los sitios de adsorción (externos) en el polvo de organoarcilla condujo a una rápida protección frente a la biodegradación, pero también a una elevada bioaccesibilidad de la fracción adsorbida para ser posteriormente degradada por los microorganismos del suelo. Por el contrario, la menor disponibilidad de los sitios de adsorción en los gránulos derivó en una adsorción más lenta y una menor protección a tiempos de incubación cortos, pero, una vez que escopoletina alcanzó los sitios de adsorción, quedó más protegida frente a los procesos biodegradativos.

Bajo condiciones reales de campo, el comportamiento de escopoletina aplicada a un suelo alcalino en forma libre o preadsorbida en gránulos de organoarcilla fue similar al

observado en el laboratorio. La escopoletina libre se degradó rápidamente mientras que su aplicación en gránulos aumentó notablemente su persistencia en el suelo hasta incrementar su tiempo de vida media de 0.54 a 20.1 días (Fig. 42).

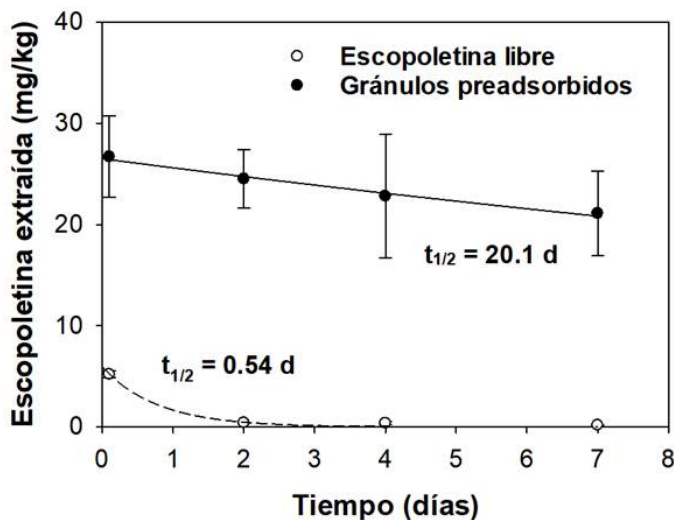


Figura 42: Curva de disipación de escopoletina aplicada a parcelas de campo en forma libre y soportada en gránulos de la organoarcilla Cloisite 10A.

Respecto a la bioactividad, la escopoletina formulada en los gránulos de organoarcilla mejoró la expresión de su fitotoxicidad y redujo tanto la germinación como la elongación de las raíces de *Lactuca sativa* L. en mayor grado que el compuesto libre.

De los resultados de este trabajo concluimos que la interacción de escopoletina con gránulos de la organoarcilla Cloisite 10A protegió satisfactoriamente al compuesto de su rápida biodegradación en suelos alcalinos, tanto en condiciones de laboratorio como de campo. El uso de gránulos de organoarcilla podría ser, por tanto, una estrategia eficaz de formulación para mejorar el rendimiento de los compuestos alelopáticos como plaguicidas naturales a partir de un incremento de su persistencia. Optimizando ciertos parámetros, tales como su coste, su bioactividad hacia malas hierbas específicas o la cantidad necesaria tanto de compuesto como de organoarcilla a emplear, podrían estandarizarse formulaciones similares a la aquí preparada para implantarse como estrategia de aplicación de compuestos alelopáticos con características mejoradas respecto al producto libre.

III.4. Caracterización enantioselectiva de la adsorción, disipación y fitotoxicidad del monoterpeno pulegona en suelos agrícolas

Los monoterpenos constituyen una importante familia de compuestos alelopáticos que destacan por encontrarse entre los principales componentes de los aceites esenciales de las plantas aromáticas (Chaimovitsh et al., 2017). Se trata de compuestos orgánicos con 10 átomos de carbono derivados de la unión de dos unidades de isopreno, volátiles y para los que se han descrito una gran variedad de actividades biológicas, entre las que cabe destacar un marcado carácter fitotóxico frente a diferentes especies de plantas (Vaughn & Spencer, 1993; Vokou et al., 2003). Se ha comprobado que los monoterpenos que contienen oxígeno en su estructura presentan una mayor solubilidad en agua y un mayor carácter fitotóxico que los monoterpenos hidrocarbonados (Chaimovitsh et al., 2017). Sin embargo, al igual que en el caso de las cumarinas, se sabe muy poco acerca de cómo los diferentes procesos de transporte y degradación pueden afectar al comportamiento y a la actividad fitotóxica de los monoterpenos en el suelo. Además, el hecho de que muchos monoterpenos presenten centros quirales en su estructura añade complejidad al estudio de su dinámica en el medio ambiente debido a que los procesos a los que se ven sometidos pueden ser enantioselectivos, siendo este un aspecto que ha recibido muy poca atención en la bibliografía.

El objetivo planteado en el **cuarto artículo** que compone esta Tesis Doctoral fue el de caracterizar los procesos de adsorción y disipación de los dos enantiómeros del monoterpeno oxigenado pulegona (Fig. 43) en diferentes suelos, así como comparar su fitotoxicidad hacia tres especies de plantas (*Lactuca sativa*, *Hordeum vulgare* y *Eruca sativa*) a través de bioensayos realizados en ausencia y en presencia de suelo. En los bioensayos con suelo, se abordó si la adición de una organo-hidrotalcita como material adsorbente pudiera llevar a una estabilización del compuesto que ayudara a potenciar su bioactividad.

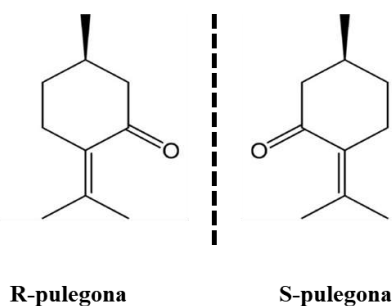


Figura 43: Estructura de los dos enantiómeros del monoterpeno pulegona.

La adsorción de los enantiómeros R y S de pulegona en los suelos resultó ser un proceso no enantioselectivo con coeficientes de adsorción bajos o moderados ($K_d = 0.31-1.31$ L/kg). Apoyadas por los resultados de adsorción obtenidos con adsorbentes modelos, las correlaciones encontradas entre los coeficientes de adsorción y las propiedades de los suelos apuntaron a la materia orgánica como la principal responsable del proceso de adsorción de los enantiómeros de pulegona, aunque también sugirieron que, en suelos pobres en materia orgánica, el papel de la fracción mineral puede ser relevante. Un estudio de desorción sugirió una elevada reversibilidad del proceso de adsorción de los enantiómeros de pulegona a los suelos.

Experimentos de incubación mostraron que, en el suelo, la degradación de R y S-pulegona es un proceso rápido, mediado por microorganismos, y que el fenómeno de volatilización contribuye de forma importante a la disipación del compuesto. Ensayos de persistencia en los que se modificó la humedad, la concentración inicial de compuesto y la temperatura indicaron que las condiciones que más favorecían la actividad microbiana aumentaban la velocidad de degradación de ambos enantiómeros. La degradación en suelos demostró ser ligeramente enantioselectiva, en particular en suelos ácidos, donde el enantiómero R se degradó más rápidamente que el S (Fig. 44).

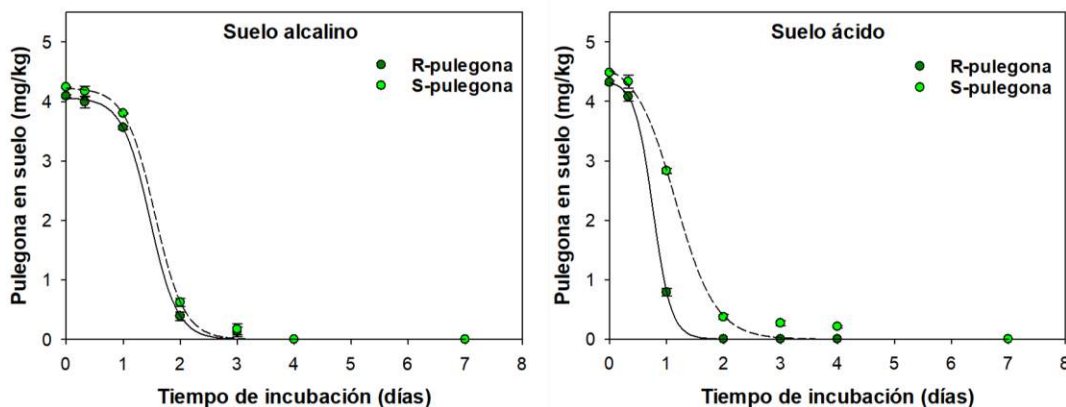


Figura 44: Curvas de degradación de los enantiómeros de pulegona en un suelo alcalino y un suelo ácido sin esterilizar.

Los bioensayos sin suelo pusieron de manifiesto que, entre las especies ensayadas, *Lactuca sativa* era la más sensible a los dos enantiómeros de pulegona para los diferentes

parámetros de germinación y crecimiento estudiados. Además, el enantiómero S mostró una mayor fitotoxicidad que el R para esta especie. El valor de IC_{50} del enantiómero S respecto a su efecto en la biomasa aérea de *Lactuca sativa* fue 3 veces menor que el obtenido para *Hordeum vulgare* y 20 veces menor que el obtenido para *Eruca sativa*.

Seleccionando *Lactuca sativa* y el enantiómero S para los bioensayos con suelo, se observó que las pérdidas por volatilización y biodegradación provocaban una drástica disminución de la fitotoxicidad del compuesto en suelos. Ante este comportamiento, se empleó una organo-hidrotalcita (HT-OLE) que en ensayos previos había mostrado una elevada afinidad por los enantiómeros de pulegona para, a través de un aumento del proceso de adsorción, estabilizar al compuesto frente a procesos biodegradativos y de pérdidas por volatilización y aumentar su actividad (Gámiz & Celis, 2021). La adición de la organo-hidrotalcita se tradujo en un aumento del tiempo de residencia de S-pulegona en el suelo, permitiendo una mejor expresión de su fitotoxicidad (Fig. 45).

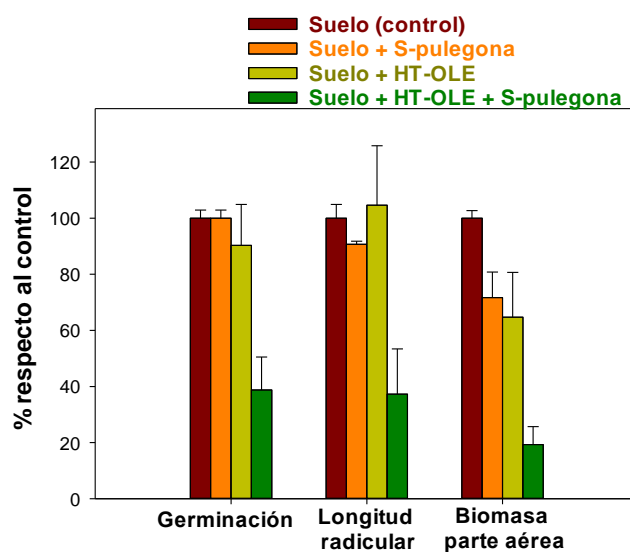


Figura 45: Efecto de la adición de la organo-hidrotalcita HT-OLE en la fitotoxicidad de S-pulegona en un suelo franco arcillo arenoso frente a *Lactuca sativa* L.

En este artículo se demuestra que la adsorción de los monoterpenos a adsorbentes apropiados podría representar una forma de aumentar el potencial de estos compuestos como herbicidas en suelos a través de una reducción de los procesos de biodegradación y transporte que llevan a su rápida desaparición en los mismos.

Capítulo IV

Bibliografía



- Abbas, H., Duke, S., Shier, W., Badria, F., Ocamb, C. & Woodward, R. (1997). Comparison of ceramide synthase inhibitors with other phytotoxins produced by *Fusarium* species. *J. Nat. Tox.* **6**, 163–181.
- Abraham, D., Braguini, W.L., Kelmer-Bracht, A.M. & Ishii-Iwamoto, E.L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.* **26**, 611–624.
- AEPLA (2019): Informe del Sector Agrícola. <https://www.aepla.es/wp-0>
- Aguer, J.P., Hermosín, M.C., Calderón, M.J. & Cornejo, J. (2000). Fenuron sorption by homoionic natural and modified smectites. *J. Environ. Sci. Health Part B* **35**, 279–296.
- Aguer, J.P. & Richard, C. (1996). Reactive species produced on irradiation at 365 nm of aqueous solutions of humic acids. *J. Photochem. Photobiol. A.* **93**, 193–198.
- Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S. & Ok, Y.S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere* **99**, 19–33.
- Akelah, A., Salahuddin, N., Hitner, A., Baer, E. & Moet, A. (1994). Morphological hierarchy of butadieneacrylonitrile/montmorillonite nanocomposite. *Nanomaterials* **4**, 965–978.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñero, A., Ortega-Calvo, J.J. & Cornejo, J. (2003). Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manag.* **19**, 150–156.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D. & Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.* **91**, 195–200.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D. & Cegarra, J. (2006). Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* **64**, 470–477.
- Ali, H. & Aboul-Enein, H.Y. (2004). Chiral pollutants: Biotransformation, biodegradation and metabolism. En: *Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, pp. 75–103.
- Alther, G. (2004). Some practical observations on the use of bentonite. *Environ. Eng. Geosci.* **10**, 347–359.

- Altieri, A., Lana, M., Bittencourt, H., Kieling, A., Comin, J. & Lovato, P. (2011). Enhancing crop productivity via weed suppression in organic no-till cropping systems in Santa Catarina, Brazil. *J. Sustainable Agric.* **35**, 855–869.
- Amaral, J.A & Knowles, R. (1998). Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 520–525.
- Araniti, F., Lupini, A., Sunseri, F. & Abenavoli, M.R. (2017). Allelopathic potential of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter mediated by VOCs: A physiological and metabolomic approach. *PLoS ONE* **12**, 1–23.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C. & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* **123**, 247–260.
- Azam, F., Fuhr, F. & Mittelstaedt, W. (1988). Fate of [Carbonyl-C-14] methabenzthiazuron in an arid region soil - Effect of organic amendment, soil disturbance and fumigation. *Plant Soil* **107**, 149–158.
- Bachheti, A., Sharma, A., Bachheti, R.K., Husen, A. & Pandey, D.P. (2019). Plant allelochemicals and their various applications. En: *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Merillon, J.M. & Ramawat, K.G (eds). Springer Nature, pp. 1–25.
- Baghestani, A., Lemieux, C., Leroux, G., Baziramakenga, R. & Simard, R. (1999). Determination of allelochemicals in spring cereal cultivars of different competitiveness. *Weed Sci.* **47**, 498–504.
- Baker, B. & Mohler, C. (2015). Weed management by upstate New York organic farmers: Strategies, techniques and research priorities. *Renew. Agric. Food Syst.* **30**, 418–427.
- Bardin, M., Knight, P.C. & Seville, J.P.K. (2004). On control of particle size distribution in granulation using high-shear mixers. *Powder Technol.* **140**, 169–175.
- Barriuso, E., Laird, D.A., Koskinen, W.C. & Dowdy, R.H. (1994). Atrazine desorption from smectites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **58**, 1632–1638.
- Barriuso, E., Andrades, M.S., Benoit, P. & Houot, S. (2011). Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: Experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry* **106**, 117–133.
- Basheer, A.A. (2017). Chemical chiral pollution: Impact on the society and science and need of the regulations in the 21st century. *Chirality* **30**, 402–406.

- Beck, A.J., Johnston, A.E.J. & Jones, K.C. (1993). Movement of nonionic organic chemicals in agricultural soils. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **23**, 219–248.
- Belz, R.G. (2007). Allelopathy in crop/weed interactions-an update. *Pest Manag. Sci.* **63**, 308–326
- Benelli, G., Pavela, R., Maggi, F., Petrelli, R. & Nicoletti, M. (2017). Commentary: making green pesticides greener? The potential of plant products for nanosynthesis and pest control. *J. Clust. Sci.* **28**, 3–10.
- Bertin, C., Harmon, R., Akaogi, M., Weidenhamer, J.D. & Weston, L.A. (2009). Assessment of the phytotoxic potential of m-tyrosine in laboratory soil bioassays. *J. Chem. Ecol.* **35**, 1288–1294.
- Bhadoria, P.B.S. (2011). Allelopathy: A natural way towards weed management. *Am. J. Experim. Agric.* **1**, 7–20.
- Blum, U. (1998). Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. *J. Chem. Ecol.* **24**, 685–708
- Blum, U., Shafer, S.R. & Lehman, M.E. (1999). Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: Concepts vs. an experimental model. *CRC Crit Rev. Plant. Sci.* **18**, 673–693.
- Bosetto, M., Arfaioli, P. & Fusi, P. (1992). Adsorption of the herbicides alachlor and metolachlor on 2 activated charcoals. *Sci. Total Environ.* **123**, 101–108.
- Bowman, B.T. & Sans, W.W. (1985), Partitioning behavior of insecticides in soil-water systems: II. Desorption hysteresis effects. *J. Environ. Qual.* **14**, 270–273.
- Boyd, S.A., Johnston, C.T., Laird, D.A., Teppen, B.J. & Li, H. (2011). Comprehensive study of organic contaminant adsorption by clays. Methodologies, mechanisms, and environmental implications. En: *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Environmental Systems*. Xing, B., Senesi, N. & Huang, P.M. (eds). John Wiley & Sons. pp. 51–71.
- Bravetti, M.M. de M., Carpinella, M.C. & Palacios, S.M. (2020). Phytotoxicity of *Cortaderia speciosa* extract, active principles, degradation in soil and effectiveness in field tests. *Chemoecology* **30**, 15–24.
- Brixie, J.M. & Boyd, S.A. (1994). Treatment of contaminated soils with organoclays to reduce leachable pentachlorophenol. *J. Environ. Qual.* **23**, 1283–1290.

- Bueno, S., Durán, E., Gámiz, B. & Hermosín, M.C. (2021). Formulating low cost modified bentonite with natural binders to remove pesticides in a pilot water filter system. *J. Environ. Chem. Eng.* **9**, 104623.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D. & Buser, H. (2003). Enantioselective degradation of metalaxyl in soils: Chiral preference changes with soil pH. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 2668–2674.
- Buerge, I.J., Müller, M.D. & Poiger, T. (2013). The chiral herbicide beflubutamid (II): enantioselective degradation and enantiomerization in soil, and formation/degradation of chiral metabolites. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 6812–6818.
- Buerge, I.J., Kasteel, R., Bächli, A. & Poiger, T. (2019). Behavior of the chiral herbicide imazamox in soils: Enantiomer composition defferetiates between biodegradation and photodegradation. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 5733–5740.
- Businelli, D. (1997). Pig slurry amendment and herbicide coapplication effects on s-triazine mobility in soil: An adsorption-desorption study. *J. Environ. Qual.* **26**, 102–108.
- Cabrera, A., Cox, L., Spokas, K.A., Celis, R., Hermosín, M.C., Cornejo, J. & Koskinen, W.C. (2011). Comparative sorption and leaching study of the herbicides fluometuron and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) in a soil amended with biochars and other sorbents. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 12550–12560.
- Cai, D.W. (2008). Understand the role of chemical pesticides and prevent misuses of pesticides. *Bull. Agric. Sci. Technol.* **1**, 36–38.
- Calle, J.M., Pérez, A.J., Simonet, A.M., Guerra, J.O. & Macías, F.A. (2016). Steroidal saponins from *Furcraea hexapetala* leaves and their phytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* **79**, 2903–2911.
- Calvet, R. (1989). Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* **83**, 145–177.
- Campos, P., Knicker, H., Miller, A., Velasco-Molina, M. & de la Rosa, J.M. (2021). Biochar ageing in polluted soils and trace elements immobilization in a 2-year field experiment. *Environ. Pollut.* **290**, 118025.
- Cantrell, C.L., Dayan, F.E. & Duke, S.O. (2012). Natural products as sources for new pesticides. *J. Nat. Prod.* **75**, 1231–1242.
- Cecchi, A.M., Koskinen, W.C., Cheng, H.H. & Haider, K. (2004). Sorption-desorption of phenolic acids as affected by soil properties. *Biol. Fertil. Soils.* **39**, 235–242.

- Celis, R., Barriuso, E. & Houot, S. (1998a). Sorption and desorption of atrazine by sludge-amended soil: Dissolved organic matter effects. *J. Environ. Qual.* **27**, 1348–1356.
- Celis, R., Barriuso, E. & Houot, S. (1998b). Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. *Chemosphere* **37**, 1091–1107.
- Celis, R. & Koskinen, W.C. (1999). An isotopic exchange method for the characterization of the irreversibility of pesticide sorption-desorption in soil. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 782–790.
- Celis, R., Koskinen, W.C., Cecchi, A.M., Bresnahan, M.J., Carrizosa, M.J., Ulibarri, M.A., Pavlovic, I. & Hermosín, M.C. (1999a). Sorption of the ionizable pesticide imazamox by organo-clays and organohydrotalcites. *J. Environ. Sci. Health Part B* **34**, 929–941.
- Celis, R., Hermosín, M.C., Cox, L. & Cornejo, J. (1999b). Sorption of 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1200–1206.
- Celis, R., De Jonge, H., De Jonge, L.W., Real, M., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2006). The role of mineral and organic components in phenanthrene and dibenzofuran sorption by soil. *Eur. J. Soil Sci.* **57**, 308–319.
- Celis, R., Adelino, M.A., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2012). Montmorillonite–chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. *J. Hazard. Mater.* **209–210**, 67–76.
- Celis, R., Gámiz, B., Adelino, M. A., Hermosín, M. C. & Cornejo, J. (2013). Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metaxyl in Mediterranean agricultural soils. *Sci. Total. Environ.* **444**, 288–297.
- Celis, R., Adelino, M.A., Gámiz, B., Hermosín, M.C., Koskinen, W.C. & Cornejo, J. (2014). Nanohybrids of Mg/Al layered double hydroxide and long-chain (C18) unsaturated fatty acid anions: Structure and sorptive properties. *Appl. Clay Sci.* **96**, 81–90.
- Celis, R., Gámiz, B., Facenda, G. & Hermosín, M.C. (2015). Enantioselective sorption of the chiral fungicide metalaxyl on soil from non-racemic aqueous solutions: Environmental implications. *J. Hazard. Mater.* **300**, 581–589.
- Cha, J.S., Park, S.H., Jung, S.C., Ryu, C., Jeon, J.K., Shin, M.C. & Park, Y.K. (2016). Production and utilization of biochar: A review. *J. Ind. Eng. Chem.* **40**, 1–15.
- Chaimovitch, D., Shachter, A., Abu-Abied, M., Rubin, B., Sadot, E. & Dudai, N. (2017). Herbicidal activity of monoterpenes is associated with disruption of microtubule functionality and membrane integrity. *Weed Sci.* **65**, 19–30.

- Cheikh, D., Majdoub, H. & Darder, M. (2022). An overview of clay-polymer nanocomposites containing bioactive compounds for food packaging applications. *Appl. Clay Sci.* **216**, 106335.
- Chen, Y., Paetz, C. & Schneider, B. (2018). Precursor-directed biosynthesis of phenylbenzoisoquinolindione alkaloids and the discovery of a phenylphenalenone-based plant defense mechanism. *J. Nat. Prod.* **81**, 879–884.
- Chen, Y., Peng, Y., Chuan-Chao, D. & Qun, J. (2011). Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. *Appl. Soil Ecol.* **51**, 102–110.
- Cheng, F. & Cheng, Z. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Front. Plant Sci.* **6**, 1020.
- Cheng, J.J., Zhang, L.J., Cheng, H.L., Chiou, C.T., Lee, I.J. & Kuo, Y.H. (2010). Cytotoxic hexacyclic triterpene acids from *Euscaphis japonica*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1655–1658.
- Chinchilla, N., Marín D., Oliveros-Bastidas, A., Molinillo, J.M.G. & Macías, F.A. (2015). Soil biodegradation of a benzoxazinone analog proposed as a natural products-based herbicide. *Plant Soil.* **393**, 207–214.
- Chiou, C.T. (2002). Partition and Adsorption of Organic Contaminants in Environmental Systems. John Wiley & Sons.
- Chludil, H.D., Corbino, G.B. & Leicach, S.R. (2008). Soil quality effects on *Chenopodium album* flavonoid content and antioxidant potential. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5050–5056.
- Clausen, L., Fabricius, I. & Madsen, L. (2001). Adsorption of pesticides onto quartz, calcite, kaolinite, and alpha-alumina. *J. Environ. Qual.* **30**, 846–857.
- Clearfield, A., Kieke, M., Kwan, J., Colon, J.L. & Wang, R.C. (1991). Intercalation of dodecyl sulfate into layered double hydroxides. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **11**, 361–378.
- Clemens, S. & Weber, M. (2016). The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant Signal Behav.* **11**, e114197.
- Collins, C., Fryer, M. & Grosso, A. (2006). Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environ Sci Technol.* **40**, 45–52.
- Comisión Europea (2009). Reglamento (CE) No. 1107/2009 de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial Unión

- Europea de 24 de noviembre de 2009. N° 309, 1–50.
<https://www.boe.es/doue/2009/309/L00001-00050.pdf>
- Cornejo, J., Celis, R., Pavlovic, I. & Ulibarri, M.A. (2008). Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: A review. *Clay Miner.* **43**, 155–175.
- Cox, L., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (1995). Adsorption and desorption of the herbicide thiazafurion as a function of soil properties. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **58**, 305–314.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. & Mansour, M. (1996). Photolysis of metamitron in water in the presence of soils and soil components. *Chemosphere.* **33**, 2057–2064.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M.C., Becker, A. & Cornejo, J. (1997a). Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric. Ecosyst. Environ.* **65**, 151–161.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Celis, R. & Cornejo, J. (1997b). Sorption of two polar herbicides in soils and soil clays suspensions. *Water Res.* **31**, 1309–1316.
- Cox, L., Cecchi, A., Celis, R., Hermosín, M.C., Koskinen, W.C. & Cornejo, J. (2001). Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **65**, 1688–1695.
- Cox, L., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2004a). Influence of organic amendments on sorption and dissipation of imidacloprid in soil. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **84**, 95–102.
- Cox, L., Fernandes, M.C., Zsolnay, A., Hermosin, M.C. & Cornejo, J. (2004b). Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: Effect on pesticide adsorption behavior. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5635–5642.
- Cruz-Guzmán, M., Celis, R., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2004). Adsorption of the herbicide simazine by montmorillonite modified with natural organic cations. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 180–186.
- Cruz-Guzmán, M., Celis, R., Hermosín, M.C., Koskinen, W.C. & Cornejo, J. (2005). Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7502–7511.
- Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., Łyczewska, M. & Ludwicki, J. K. (2015). Biopesticides - Towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Manag. Sci.* **71**, 3–6.

- Dayan, F.E., Kagan, I.A. & Rimando, A.M. (2003). Elucidation of the biosynthetic pathway of the allelochemical sorgoleone using retrobiosynthetic NMR analysis. *J. Biol. Chem.* **278**, 28607–28611.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L. & Duke, S.O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4022–4034.
- Dayan, F.E., Rimando, A.M., Pan, Z., Baerson, S.R., Gimsing, A.L. & Duke, S.O. (2010). Sorgoleone. *Phytochemistry*. **71**, 1032–1039.
- Dayan, F.E., Owens, D. K. & Duke, S.O. (2012). Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Manag. Sci.* **68**, 519–528.
- Dayan, F.E. & Duke, S.O. (2014). Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant. Physiol.* **166**, 1090–1105.
- Dayan, F.E., Owens, D.K., Watson, S.B., Asolkar, R.N. & Boddy, L.G. (2015). Sarmentine, a natural herbicide from piper species with multiple herbicide mechanisms of action. *Front. Plant. Sci.* **6**, 1–11.
- De Albuquerque, M.B., Dos Santos, R.C., Lima, L.M., Melo Filho, P.D.A., Nogueira, R. J.M.C., Da Câmara, C.A.G. & Ramos, A.D.R. (2011). Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **31**, 379–395.
- De Oliveira, L., Trigueiro, P., Sammy Nery Souza, J. de Carvalho, M., Osajima, J., da Silva-Filho, E. & Fonseca, M. (2022). Montmorillonite with essential oils as antimicrobial agents, packaging, repellents, and insecticides: An overview. *Colloids Surf. B* **209**, 112186.
- Dhima. K., Vasilakoglou, I.B., Eleftherohorinos, I.G. & Lithourgidis, A.S. (2006). Allelopathic potencial of winter cereals and their cover crop mulch effect on grass weed suppression and corn development. *Crop Ecol., Manag. Qual.* **46**, 345–352.
- Du, J., Chadalavada, S. & Naidu, R. (2017). Synthesis of porous bentonite organoclay granule and its adsorption of tributyltin. *Appl. Clay Sci.* **148**, 131–137.
- Duke, S.O., Romagni, J.G. & Dayan, F.E. (2000). Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Prot.* **19**, 583–589.
- Duke, S.O., Dayan F.E., Rimando A.M., Chrader K.K., Aliotta G., Oliva A. & Romagni J.G. (2002). Chemicals from nature for weed management. *Weed Sci.* **50**, 138–151.
- Durán, E., Bueno, S., Hermosín, M.C., Cox, L. & Gámiz, B. (2019). Optimizing a low added value bentonite as adsorbent material to remove pesticides from water. *Sci. Total Environ.* **672**, 743–751.

- Einhellig, F.A., Rice, E.L., Risser, P.G. & Wender, S.H. (1970). Effects of scopoletin on growth, CO₂ exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin, and chlorogenic acids in tobacco, sunflower, and pigweed. *Bull. Torrey Bot. Club.* **97**, 22–33
- Ezzaim, A., Turpault, M.P. & Ranger, J. (1999). Quantification of weathering processes in an acid brown soil developed from tuff. Part II. Soil formation. *Geoderma* **87**, 155–177.
- FAO (2019). Contaminación del Suelo: Una Realidad Oculta. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. <https://www.fao.org/3/i9183es/i9183es.pdf>
- FAO & ITPS (2017). Global assessment of the impact of plant protection products on soil functions and soil ecosystems. p 40, Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/documents/card/es/c/I8168EN/>
- FAOSTAT (2022). Datos Estadísticos de la FAO. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/EP/visualize>
- Fay, P.K. & Duke, W.B. (1977). An assessment of allelopathic potential in *Avena* germ plasm. *Weed Sci.* **25**, 224–228.
- Fernandes, M.C., Cox, L., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2006). Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Manag. Sci.* **62**, 1207–1215.
- Fernández, M., Barbería-Roque, L., Gámez-Espinosa, E. & Deyá, C. (2020). Organo montmorillonite with biogenic compounds to be applied in antifungal coatings. *Appl. Clay Sci.* **184**, 105369.
- Fernández, M.D., Sanchez-Brunete, C. & Tadeo, J.L. (2000). Influence of compost addition on the degradation rate of simazine and hexazinone. *Fresenius Environ. Bull.* **9**, 652–658.
- Fernández-Aparicio, M., Cimmino, A., Evidente, A. & Rubiales, D. (2013). Inhibition of *Orobanche crenata* seed germination and radicle growth by allelochemicals identified in cereals. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 9797–9803.
- Filippin, K.J., Portela, A., Rodrigues, E.D., Cepa-Matos, M., da Silva, G.V., Garcez, W.S. & Perdomo, R.T. (2018). Cytotoxic alkaloids from *Pogonopus tubulosus*: G2/M cell

- cycle arrest and inhibition of DNA topoisomerase II α by isotubulosine. *Phytother. Res.* **32**, 943–948.
- Filius, J.D., Hiemstra, T. & Vanriemsdijk, W.H. (1997). Adsorption of small weak organic acids on goethite-modeling of mechanisms. *J. Colloid. Interface. Sci.* **195**, 368–380.
- Flores-Céspedes, F., Martínez-Domínguez, G.P., Villafranca-Sánchez, M. & Fernández-Pérez, M. (2015). Preparation and characterization of azadirachtin alginate-biosorbent based formulations: Water release kinetics and photodegradation study. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8391–8398.
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A. & Jukes, A.A. (2003). Pesticide degradation in a "biobed" composting substrate. *Pest Manag. Sci.* **59**, 527–537.
- Forim, M.R., Costa, E.S., da Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B., Mondego, J.M. & Boiça Jr., A.L. (2013). Development of a new method to prepare nano-/microparticles loaded with extracts of *Azadirachta indica*, their characterization and use in controlling *Plutella xylostella*. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 9131–9139.
- Frková, Z., Johansen, A., de Jonge, L.W., Olsen, P., Gosewinkel, U., Bester, K. (2016). Degradation and enantiomeric fractionation of mecoprop in soil previously exposed to phenoxy acid herbicides- New insights for bioremediation. *Sci. Total. Environ.* **569–570**, 1457–1465.
- Galán-Pérez, J.A. & Peña, A. (2019). Conditioning of a calcareous soil with biosolid and compost under laboratory conditions: Exploration of soil property evolution. *Pedosphere* **29**, 266–272.
- Galindo, J.C.G., Hernández, A., Dayan, F.E., Téllez, M.R., Macías, F.A., Paul, R.N. & Duke, S.O. (1999). Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochem.* **52**, 805–813.
- Gámiz, B. (2012). Uso de Residuos Orgánicos y de Arcillas Modificadas para Aumentar la Eficacia de Herbicidas y Reducir la Contaminación de Suelos y Aguas por los Mismos en Cultivos Andaluces. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Gámiz, B., Celis, R., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2010). Organoclays as soil amendments to increase the efficacy and reduce the environmental impact of the herbicide fluometuron in agricultural soils. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7893–7901.
- Gámiz, B., Celis, R., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (2013). Effect of olive-mill waste addition to agricultural soil on the enantioselective behavior of the chiral fungicide metalaxyl. *J. Environ. Manage.* **128**, 92–99.

- Gámiz, B., Facenda, G. & Celis, R. (2016a). Evidence for the effect of sorption enantioselectivity on the availability of chiral pesticide enantiomers in soil. *Environ Pollut.* **213**, 966–973.
- Gámiz, B., López-Cabeza, R., Facenda, G., Velarde, P., Hermosín M C., Cox, L. & Celis, R. (2016b). Effect of synthetic clay and biochar addition on dissipation and enantioselectivity of tebuconazole and metalaxyl in an agricultural soil: Laboratory and field experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* **230**, 32–41.
- Gámiz, B., Hermosín, M.C. & Celis, R. (2016c). Sorption, persistence and leaching of abscisic acid in agricultural soils. An enantiomer-selective study. *Geoderma.* **269**, 112–118.
- Gámiz, B., Cox, L., Hermosín, M.C., Spokas, K. & Celis, R. (2017a). Assessing the effect of organoclays and biochar on the fate of abscisic acid in soil. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 29–38.
- Gámiz, B., Velarde, P., Spokas, K.A., Hermosín, M.C. & Cox, L. (2017b). Biochar soil additions affect herbicide fate: Importance of application timing and feedstock species. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3109-3117.
- Gámiz, B., Hermosín, M.C. & Celis, R. (2018). Appraising factors governing sorption and dissipation of the monoterpene carvone in the rhizosphere. *Geoderma* **321**, 61–68.
- Gámiz, B., Facenda, G. & Celis, R. (2019a). Nanoengineered sorbents to increase the persistence of the allelochemical carvone in the rhizosphere. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 589–596.
- Gámiz, B., Facenda, G. & Celis, R. (2019b). Modulating the persistence and bioactivity of allelochemicals in the rhizosphere: Salicylic acid, a case of study. *Arch. Agron. Soil Sci.* **65**, 581–595.
- Gámiz, B. & Celis, R. (2021). S-Carvone formulation based on granules of organoclay to modulate its losses and phytotoxicity in soil. *Agronomy* **11**, 1593.
- Gámiz, B., López-Cabeza, R., Velarde, P., Spokas, K. & Cox, L. (2021). Biochar changes the bioavailability and bioefficacy of the allelochemical coumarin in agricultural soils. *Pest Manag. Sci.* **77**, 834–843.
- Gámiz, B., López-Cabeza, R., Cox, L. & Celis, R. (2022). Environmental fate of chiral pesticides in soils. En: *Pesticides in Soils: Occurrence, Fate, Control and Remediation. The Handbook of Environmental Chemistry.* Rodriguez-Cruz, M.S. & Sánchez-Martín, M.J. (eds). Springer, pp. 107–135.

- García, C., Hernández, T., Coll, M.D. & Ondono, S. (2017). Organic amendments for soil restoration in arid and semiarid areas: A review. *AIMS Environ. Sci.* **4**, 640–676.
- García-Delgado, C., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J. & Rodríguez-Cruz, M.S. (2020). Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *J. Hazard. Mater.* **390**, 122162.
- García-Jaramillo, M., Cox, L., Cornejo, J. & Hermosín, M.C. (2014). Effect of soil amendments on the behavior of bentazone and tricyclazole. *Sci. Total Environ.* **466–467**, 906–913.
- Garrison, A.W. (2006). Probing the enantioselectivity of chiral pesticides. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 16–23.
- Garrison, A.W. (2011). An introduction to pesticide chirality and the consequences of stereoselectivity. En: *Chiral Pesticides: Stereoselectivity and Its Consequences* Garrison, A.W., Gan, J. & Liu, W. (eds). ACS Symposium Series, American Chemical Society, pp. 1–7.
- Garrison, A., Miller, A., Ryan, M., Roxburgh, S. & Shea, K. (2014). Stacked crop rotations exploit weed-weed competition for sustainable weed management. *Weed Sci.* **62**, 166–176.
- Gasic, S. & Tanovic, B. (2013). Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pestic. Phytomed.* **28**, 97–102.
- Gerstl, Z. & Helling, C.S. (1985). Fate of bound methyl parathion residues in soils as affected by agronomic practices. *Soil Biol. Biochem.* **17**, 667–673.
- Ghimire, B.K., Ghimire, B., Yu, C.Y. & Chung, I. M. (2019). Allelopathic and autotoxic effects of *Medicago sativa*—derived allelochemicals. *Plants* **8**, 233.
- Giannakas, A., Tsagkalias, I., Achilias, D. & Ladavos, A. (2017). A novel method for the preparation of inorganic and organo-modified montmorillonite essential oil hybrids. *Appl. Clay Sci.* **146**, 362–370.
- Giannakas, A., Stathopoulou, P., Tsagkalias, I., Achilias, D. & Salmas, C. (2020). The effect of different preparation methods on the development of chitosan/thyme oil/montmorillonite nanocomposite active packaging films. *J. Food Process. Preserv.* **44**, e14327.
- Giles, C.H., MacEwan, T.H., Nakhwa, S.N. & Smith, D. (1960). Studies in adsorption. Part XII. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis

- of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.* **3**, 3973–3993.
- González, M., Mingorance, M.D., Sánchez, L. & Peña, A. (2008). Pesticide adsorption on a calcareous soil modified with sewage sludge and quaternary alkyl-ammonium cationic surfactants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **15**, 8–14.
- Govea, K.P., Pereira, R.S.T., de Assis, M.D.O., Alves, P.I., Brancaglioni, G.A., Toyota, A.E., Machado, J.V.C., Carvalho, D.T., de Souza, T.C., Beijo, L.A., de Oliveira Ribeiro Trindade, L. & Barbosa, S. (2020). Allelochemical activity of eugenol-derived coumarins on *Lactuca sativa* L. *Plants* **9**, 533.
- Graña, E., Sotelo, T., Díaz-Tielas, C., Reigosa, M. & Sánchez-Moreiras, A. (2013). The phytotoxic potential of the terpenoid citral on seedlings and adult plants. *Weed Sci.* **61**, 469–481.
- Graña, E., Costas-Gil, A., Longueira, S., Celeiro, M., Teijeira, M., Reigosa, M.J. & Sánchez-Moreiras, A.M. (2017). Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *J. Plant Physiol.* **218**, 45–55.
- Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L. & McCarthy, J.F. (1994). Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: Mechanisms and models. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 38–46.
- Guggenheim, S. & Martin, R.T. (1995). Definition of clay and clay mineral: Joint report of the AIPEA and CMS nomenclature committees. *Clay Miner.* **30**, 257–259.
- Hance, R.J. (1967). The speed of attainment of sorption equilibria in some systems involving herbicides. *Weed Res.* **7**, 29–36.
- Harner, T., Wiberg, K. & Norstrom, R. (2000). Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signature in environmental analysis. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 218–220.
- Heap, I. (2022). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <https://www.weedscience.org/graphs/soagraph.aspx>
- Heap, I. & Duke, S.O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest. Manag. Sci.* **74**, 1040–1049.
- Heftmann, E. (1975). Functions of steroids in plants. *Phytochem.* **14**, 897–901.
- Hermosín M.C. & Pérez-Rodríguez, J.L. (1981). Interaction of chlordimeform with clay minerals. *Clays Clay Miner.* **29**, 143–152.

- Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (1987). Adsorption and desorption of maleic hydrazide as a function of soil properties. *Soil Sci.* **44**, 250–256.
- Hermosín, M.C., Cornejo, J. & Pérez-Rodríguez, J.L. (1987). Adsorption and desorption of maleic hydrazide as a function of soil properties. *Soil Sci.* **144**, 250–256.
- Hermosín, M. C., Calderón, M. J., Real, M. & Cornejo, J. (2013). Impact of herbicides used in olive groves on waters of the Guadalquivir River basin (southern Spain). *Agric. Ecosyst. Environ.* **164**, 229–243.
- Hickman, D.T., Rasmussen, A., Ritz, K., Birkett, M.A. & Neve, P. (2021). Review: Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: Towards an integrated approach. *Pest Manag. Sci.* **77**, 1121–1131.
- Hingston, F.J., Posner, A.M. & Quirk, J.P. (1972). Anion adsorption by goethite and gibbsite. I. The role of the proton in determining adsorption envelopes. *J. Soil Sci.* **23**, 177–192.
- Hiradate, S., Ohse, K., Furubayashi, A. & Fujii, Y. (2010). Quantitative evaluation of allelopathic potentials in soils: Total activity approach. *Weed Sci.* **58**, 258–264.
- Horspool, W.N. (1976). *Aspects of Organic Photochemistry*. Academic Press.
- Hotti, H. & Rischer, H. (2017). The killer of socrates: Coniine and related alkaloids in the plant kingdom. *Molecules* **22**, 1962.
- Huang, J., Liang, C. & Zhang, X. (2017). Effects of nano-SiO₂ on the sorption of chiral metalaxyl to agricultural soils. *Environ. Pollut.* **225**, 201–210.
- Huang, H., Morgan, C.M., Asolkar, R.N., Koivunen, M.E. & Marrone, P.G. (2010). Phytotoxicity of sarmentine isolated from long pepper (*Piper longum*) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9994–10000.
- IAS, International Allelopathy Society. (1996). First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future, Spain.
- Illes, E. & Tombacz, E. (2004). The role of variable surface charge and surface complexation in the adsorption of humic acid on magnetite. *Colloids. Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects.* **230**, 99–109.
- Inderjit. (2001). Soil: Environmental effect on allelochemical activity. *Agron. J.* **93**, 79–84.
- Isman, M. (2008). Botanical insecticides: For richer, for poorer. *Pest Manag. Sci.* **64**, 8–11.
- Iveson, S.M., Lister, J.D., Hapgood, K. & Ennis, B.J. (2001). Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes. A review. *Powder Technol.* **117**, 3–39.

- Jabran, K., Mahajan, G., Sardana, V. & Chauhan, B.S. (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Prot.* **72**, 57–65.
- Jain, P.K. & Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2**, 236–240.
- Jaynes, W.F. & Boyd, S.A. (1991). Hydrophobicity of siloxane surface in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clays Clay Miner.* **39**, 428–436.
- Jaynes, W.F. & Vance, G.F. (1996). BTEX sorption by organoclays: Cosorptive enhancement and equivalence of interlayer complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **60**, 1742–1749.
- Jones, T.R. (1983). The properties and uses of clays which swell in organic solvents. *Clay Miner.* **18**, 399–410.
- Jordan, J.W. (1949). Organophilic bentonites. I. Swelling in organic liquids. *J. Phys. Colloid Chem.* **53**, 294–306.
- Kah, M. & Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: Current methods and future priorities. *Environ. Intern.* **63**, 224–235.
- Karamanoli, K., Ainalidou, A., Bouzoukla, F. & Vokou, D. (2018). Decomposition profiles of leaf essential oils in the soil environment. *Ind. Crops Prod.* **124**, 397–401.
- Karathanasis, A.D., Adams, A.D.F. & Hajek, B.F. (1983). Stability relationships in kaolinite, gibbsite and Al-hydroxy interlayered vermiculite soil system. *Soil Sci. Soc. Am.* **3**, 1247–1251.
- Karickhoff, S.W. (1980). Sorption kinetics of hydrophobic pollutants in natural sediments. En: *Contaminants and Sediments, Vol. 2*. Baker, R.A. (ed). Ann Arbor Science Publishers, pp. 193–205.
- Katagi, T. (2012). Isomerization of chiral pesticides in the environment. *J. Pestic. Sci.* **37**, 1–14.
- Kato-Noguchi, H. & Peters, R.J. (2013). The role of momilactones in rice allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **39**, 175–185.
- Kaur, H., Kaur, R., Kaur, S., Baldwin, I.T. & Inderjit. (2009). Taking ecological function seriously: Soil microbial communities can obviate allelopathic effects of released metabolites. *PLoS ONE* **4**, e4700.

- Khaliq, A., Matloob, A., Irshad, M.S., Tanveer, A. & Zamir, M.S.I. (2010). Organic weed management in maize (*Zea mays* L.) through integration of allelopathic crop residues. *Pakistan J. Weed Sci. Res.* **16**, 409–420.
- Khan, S.U. (1980). Physicochemical processes affecting pesticides in soil. En: Pesticides in the Soil Environment. Wakeman, R.J. (ed). Elsevier, pp. 29–118.
- Kobayashi, K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol. Manag.* **4**, 1–7.
- Koch, M.A., Schuffenhauer, A., Scheck, M., Wetzels, S., Casaulta, M., Odermatt, A., Erl, P. & Waldmann, H. (2005). Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 17272–17277.
- Kong, C.H., Chen, X.H., Hu, F. & Zhang, S.Z. (2011). Breeding of commercially acceptable allelopathic rice cultivars in China. *Pest Manag. Sci.* **67**, 1100–1106.
- Koskinen, W.C. & Harper, S.S. (1990). The retention process: Mechanisms. En: Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling. Cheng, H.H. (ed). Soil Science Society of America, pp. 51–77.
- Lagaly, G. (1982). Layer charge heterogeneity in vermiculites. *Clays Clay Miner.* **30**, 215–222.
- Lagaly, G. (2001). Pesticide–clay interactions and formulations. *Appl. Clay Sci.* **18**, 205–209.
- Lagaly, G. & Beneke, K. (1991). Intercalation and exchange reactions of clay minerals and non-clay layer compounds. *Colloid Polym. Sci.* **269**, 1198–1211.
- Lee, J.F., Mortland, M.M., Chiou, C.T., Kile, D.E. & Boyd, S.A. (1990). Adsorption of benzene, toluene, and xylene by two tetramethylammonium smectites having different charge densities. *Clays Clay Miner.* **38**, 113–120.
- Levy, L., Gurov, A. & Radian, A. (2020). The effect of gallic acid interactions with iron-coated clay on surface redox reactivity. *Water. Res.* **184**, 116190.
- Li, H.H., Inoue, M., Nishimura, H., Mizutani, J. & Tsuzuki, E. (1993). Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* **19**, 1775–1787.
- Li, H., Lee, H.S.L., Fabrege, J.R. & Jatvert, C.T. (2001). Role of pH in partitioning and cation exchange of aromatic amine on water-saturated soils. *Chemosphere.* **44**, 627–625.

- Li, X-J., Xia, Z-C., Kong, C-H. & Xu, X-H. (2013). Mobility and microbial activity of allelochemicals in soil. *J. Agric. Food. Chem.* **61**, 5072–5079.
- Li, Z-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C-D. & Jiang, D-A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules.* **15**, 8933–8952.
- Lian, F. & Xing, B. (2017). Black carbon (biochar) in water/soil environments: Molecular structure, sorption, stability, and potential risk. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 13517–13532.
- Liang, C., Huang, J. & Zhang, X. (2016). Effects of engineered nanoparticles on the enantioselective transformation of metalaxyl agent and commercial metalaxyl in agricultural soils. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 7688–7695.
- Liu, J., Xie, M., Li, X., Jin, H., Yang, X., Yan, Z., Su, A. & Qin, B. (2018). Main allelochemicals from the rhizosphere soil of *Saussurea lappa* (Decne.) Sch. Bip. and their effects on plants' antioxidase systems. *Molecules* **23**, 2506.
- Livshultz, T., Kaltenecker, E., Straub, S., Weitemier, K., Hirsch, E., Kval, K., Mema, L. & Liston, A. (2018). Evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in Apocynaceae: Revisiting the defence de-escalation hypothesis. *New Phytol.* **218**, 762–773.
- Lobo-Sánchez, M., Nájera-Meléndez, G., Luna, G., Segura-Pérez, V., Rivera, J. A. & Fetter, G. (2018). ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria. *Appl. Clay Sci.* **153**, 61–69.
- López-Cabeza, R. (2017). Comportamiento Enantioselectivo de los Plaguicidas Metalaxil e Imazaquín en Suelos Agrícolas. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- López-Cabeza, R., Cornejo, J. & Celis, R. (2016). Evaluation of an organo-layered double hydroxide and two organic residues as amendments to immobilize metalaxyl enantiomers in soils: A comparative study. *J. Environ. Manag.* **181**, 135–145.
- López-Cabeza, R., Gámiz, B., Cornejo, J. & Celis, R. (2017). Behavior of the enantiomers of the herbicide imazaquin in agricultural soils under different application regimes. *Geoderma* **293**, 64–72.
- López-Piñero, A., Peña, D., Albarrán, A., Becerra, D. & Sánchez-Llerena, J. (2013). Sorption, leaching and persistence of metribuzin in Mediterranean soils amended with olive mill waste of different degrees of organic matter maturity. *J. Environ. Manag.* **122**, 76–84.

IV. Bibliografía

- Lorenzo, P., Reboredo-Durán, J., Muñoz, L., Freitas, H. & González, L. (2020). Herbicidal properties of the commercial formulation of methyl cinnamate, a natural compound in the invasive silver wattle (*Acacia dealbata*). *Weed Sci.* **68**, 69–78.
- Lu, W.L., Kang, C.L., Wang, Y.X. & Xie, Z.L. (2015). Influence of biochar on the moisture of dark brown soil and yield of maize in Northern China. *Int. J. Agric. Biol.* **17**, 1007–1012.
- Macías, F.A., Molinillo J.M., Varela, R. & Galindo, J. (2007). Allelopathy - a natural alternative for weed control. *Pest Manag. Sci.* **63**, 327–348.
- Macías, F.A., Simonet, A.M., D'Abrosca, B., Maya, C.C., Reina, M., González-Coloma, A., Cabrera, R., Giménez, C. & Villarroel, L. (2009). Megalanthine, a bioactive sesquiterpenoid from *Heliotropium megalanthum*, its degradation products and their bioactivities. *J. Chem. Ecol.* **35**, 39–49.
- Macías, F.A., Santana, A., Yamahata, A., Varela, R.M., Fronczek, F.R. & Molinillo, J.M.G. (2012). Facile preparation of bioactive seco-guaianolides and guaianolides from *Artemisia gorgonum* and evaluation of their phytotoxicity. *J. Nat. Prod.* **75**, 1967–1973.
- Macías, F.A., Mejías, F.J.R. & Molinillo, J.M.G. (2019). Recent advances in allelopathy for weed control: From knowledge to applications. *Pest Manag. Sci.* **75**, 2413–2436.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2016). https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/informederesultadosprogramadeestudios2016_tcm30-440495.pdf
- Makoi, J. & Ndakidemi, P. (2012). Allelopathy as protectant, defence and growth stimulants in legume cereal mixed culture systems. *New Zealand J. Crop Hortic. Sci.* **40**, 161–186.
- Mansour, M., Feicht, E. & Mealiar, P. (1989). Improvement of the photostability of selected substances in aqueous medium. *Toxicol. Environ. Chem.* **20–21**, 139–147.
- MAPA (2021). Ministerio de Agricultura y Pesca: Fitosanitarios. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/fitosanitarios/>
- Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, S.M., Perez-Clavijo, M. & Rodríguez-Cruz, M.S. (2009). Effect of spent mushroom substrate amendment of vineyard soils on the behavior of fungicides: 1. Adsorption-desorption of penconazole and metalaxyl by soils and subsoils. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9634–9642.

- Marmulla, R. & Harder, J. (2014). Microbial monoterpene transformations-a review. *Front. Microbiol.* **5**, 1–14.
- Masiá, A., Vázquez, K., Campo, J. & Picó, Y. (2015). Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. *J. Chromatogr. A.* **1378**, 19–31.
- Meyn, M., Beneke, K. & Lagaly, G. (1990). Anion-exchange reactions of layered double hydroxides. *Inorg. Chem.* **29**, 5201–5207.
- Mirsky, S., Ryan, M., Teasdale, J., Curran, W., Reberg-Horton, C., Spargo, J., Wells, S., Keene, C. & Moyer, J. (2013). Overcoming weed management challenges in cover crop-based organic rotational no-till soybean production in the Eastern United States. *Weed Technol.* **27**, 193–203.
- MITECO, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2019). Encuesta de Comercialización de Productos Fitosanitarios 2019. https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/resultadoscomercializacionfitosanitarios2019_tcm30-561177.pdf
- Miyata, S. (1975). The syntheses of hydrotalcite-like compounds and their structures and physico-chemical properties. I. The systems $Mg^{2+}-Al^{3+}-NO_3$, $Mg^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$, $Mg^{2+}-Al^{3+}-ClO_4^-$, $Ni^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$, and $Zn^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$. *Clays Clay Miner.* **23**, 369–375.
- Miyata, S. (1980). Physicochemical properties of synthetic hydrotalcites in relation to composition. *Clays Clay Miner.* **28**, 5056.
- Miyata, S. (1983). Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays Clay Miner.* **31**, 305–311.
- Molisch, H. (1937). *Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere, Allelopathie*. Fischer, Jena.
- Moore, J.A. & Reynolds, Jr. R.C. (1987). *X- Ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals*. OUP USA.
- Moorman, T.B., Cowan, J.K., Arthur, E.L. & Coats, J.R. (2001). Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Biol. Fertil. Soils.* **33**, 541–545.
- Monkiedje, A. & Spiteller, M. (2002). Sorptive behavior of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, and their acid metabolite in typical Cameroonian and German soils. *Chemosphere* **49**, 659–668.

- Müller, M.D. & Buser, H. (1997). Conversion reactions of various phenoxyalkanoic acid herbicides in soil. 1. Enantiomerization and enantioselective degradation of the chiral 2-phenoxypropionic acid herbicides. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 1953–1959.
- Müller, T. & Kohler, H. (2004). Chirality of pollutants-effects on metabolism and fate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 300–316.
- Nakhli, A., Mbouga, M.G.N., Bergaoui, M., Khalfaoui, M., Cretin, M. & Huguet, P. (2018). Modeling of essential oils adsorption onto clays towards a better understanding of their interactions. *J. Mol. Liq.* **249**, 132–143.
- Nes, D.W. & Heftmann, E. (1981). A Comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *J. Nat. Prod.* **44**, 377–400.
- Nimbal, C.I., Yerkes, C.N., Weston, L.A. & Weller, S.C. (1997). Phytotoxicity and distribution of sorgoleone in grain sorghum germplasm. *J. Agric. Food. Chem.* **44**, 1343–1347.
- Niro, E., Marzaioli, R., De Crescenzo, S., D'Abrosca, B., Castaldi, S., Esposito, A., Fiorentino, A. & Rutigliano, F.A. (2016). Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community. *Soil Biol. Biochem.* **95**, 30–39.
- O'Connor, G.A., Wierenga, P.J., Cheng, H.H. & Doxtader, K.G. (1980). Movement of 2,4,5-T through large soil columns. *Soil Sci.* **130**, 157–162.
- Ortet, R., Prado, S., Mouray, E. & Thomas, O. P. (2008). Sesquiterpene lactones from the endemic Cape Verdean *Artemisia gorgonum*. *Phytochem.* **69**, 2961–2965.
- Ouédraogo, I., Winter, De J., Gerbaux, P. & Bonzi-Coulibaly, Y. (2013). Volatility profiles of monoterpenes loaded onto cellulosic-based materials. *Ind. Crops Prod.* **51**, 100–106.
- Pan, L., Li, X., Yan, Z., Guo, H. & Qin, B. (2015). Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: Structure-activity relationships and action mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* **97**, 272–277.
- Pan, L., Li, X., Jin, H., Yang, X. & Qin, B. (2017). Antifungal activity of umbelliferone derivatives: Synthesis and structure-activity relationships. *Microb. Pathog.* **104**, 110–115.
- Pang, L., Gao, Z., Zhang, S., Li, Y., Hu, S. & Ren, X. (2016). Preparation and anti-UV property of modified cellulose membranes for biopesticides controlled release. *Ind. Crop Prod.* **89**, 176–181.

- Parepa, M. & Bossdorf, O. (2016). Testing for allelopathy in invasive plants: It all depends on the substrate! *Biol. Invasions*. **18**, 2975–2982.
- Pauzat, F., Marloie, G., Markovits, A. & Ellinger, Y. (2015). Global versus local adsorption selectivity. *Int. J. Astrobiol.* **14**, 563–570.
- Pavlovic, I., Ulibarri, M.A., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (1997). Sorption of an anionic surfactant from water by a calcined hydrotalcite-like sorbent. *Fresenius Environ. Bull.* **6**, 266–271.
- Pavlovic, I., Barriga, C., Hermosín, M.C., Cornejo, J. & Ulibarri, M.A. (2005). Adsorption of acidic pesticides 2,4 D, clopyralid and picloram on calcined hydrotalcite. *Appl. Clay Sci.* **30**, 125–133.
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Nélieu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E. & Fritsch, C. (2021). Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agric. Ecosyst. Environ.* **305**, 107167.
- Peña, D., López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Becerra, D. & Sánchez-Llerena, J. (2015). Environmental fate of the herbicide MCPA in agricultural soils amended with fresh and aged de-oiled two-phase olive mill waste. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 13915–13925.
- Perez-Lucas, G., El Aatik, A., Vela, N., Fenoll, J. & Navarro, S. (2021). Exogenous organic matter as strategy to reduce pesticide leaching through the soil. *Arch. Agron. Soil Sci.* **67**, 934–945.
- Phuekphong, A., Kamonnart, I. & Makoto, O. (2020). Designing nanoarchitecture for environmental remediation based on the clay minerals as building block. *J. Hazard. Material.* **299**, 122888.
- Pignatello, J.J. (1989). Sorption dynamics of organic chemicals in soils and sediments. En: Reaction and Movement of Organic Chemicals in Soils. Sawhney, B.L. & Brown, K. (eds), American Society of Agronomy, pp. 45–80.
- Pignatello, J.J. (2012). Dynamic interactions of natural organic matter and organic compounds. *J. Soils Sediments.* **12**, 1241–1256.
- Pignatello, J.J. & Nason, S.L. (2020). Importance of soil properties and processes on bioavailability of organic compounds. En: Bioavailability of Organic Chemicals in Soil and Sediments. Ortega-Calvo, J.J. & Parsons, J.R. (eds). Springer Nature, pp. 7–41.

IV. Bibliografía

- Plaza-Bolaños, P., Padilla-Sánchez, J.A., Garrido-Frenich, A., Romero-González, R. & Martínez-Vidal, J.L. (2012). Evaluation of soil contamination in intensive agricultural areas by pesticides and organic pollutants: South-eastern Spain as a case study. *J. Environ. Monit.* **14**, 1182–1189.
- Polubesova, T., Eldad, S. & Chefetz, B. (2010). Adsorption and oxidative transformation of phenolic acids by Fe(III)-montmorillonite. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 4203–4209.
- Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M.S., Rodríguez-Cruz, M.S. & Herrero-Hernández, E. (2015). Pesticide residues in vineyard soils from Spain: Spatial and temporal distributions. *Sci. Total Environ.* **514**, 351–358.
- Qin, F., Gao, Y.X., Xu, P., Li, J.Z. & Wang, H.L. (2014). Environmental behavior of benalaxyl and furalaxyl enantiomers in agricultural soils. *J. Environ. Sci. Heal Part B* **49**, 738–746.
- Radwan, I., Baz, M., Khater, H., Alkhaibari, A. & Selim, A. (2022). Mg-LDH Nanoclays intercalated fennel and green tea active ingredient: Field and laboratory evaluation of insecticidal activities against *Culex pipiens* and their non-target organisms. *Molecules* **27**, 2424.
- Ramezani, M.K., Oliver, D.P., Kookana, R.S., Gill, G. & Preston, C. (2008). Abiotic degradation (photodegradation and hydrolysis) of imidazolinone herbicides. *J. Environ. Sci. Health Part B* **43**, 105–112.
- Razavi, S.M. (2011). Plant coumarins as allelopathic agents. *Intern. J. Biol. Chem.* **5**, 86–90.
- Real, M., Gámiz, B., López-Cabeza, R. & Celis, R. (2019). Sorption, persistence, and leaching of the allelochemical umbelliferone in soils treated with nanoengineered sorbents. *Sci. Rep.* **9**, 9764.
- Real, M., Facenda, G. & Celis, R. (2021). Sorption and dissipation of the allelochemicals umbelliferone and salicylic acid in a Mediterranean soil environment: Effect of olive-mill waste addition. *Sci. Total Environ.* **774**, 145027.
- Reichle, W.T. (1986). Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ion.* **22**, 135141.
- Reigosa-Roger, M.J. & Sánchez-Moreiras, A.M. (2010). Role of phenolics in allelopathy in the soil. En: Soil Phenols. Muscolo, A. & Sidari, M. (eds), Nova Science Publishers, Inc., pp. 87-115.

- Ren, X., He, X., Zhang, Z., Yan, Z., Jin, H., Li, X. & Qin, B. (2015). Isolation, identification, and autotoxicity effect of allelochemicals from rhizosphere soils of flue-cured tobacco. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8975–8980.
- Rice, E.L. (1984). Allelopathy, 2nd ed., Academic Press.
- Rives, V. & Ulibarri, M.A. (1999). Layered double hydroxides (LDH) intercalated with metal coordination compounds and oxometalates. *Coord. Chem. Rev.* **181**, 61120.
- Robin, D.C. & Marchand, P.A. (2019). Evolution of the biocontrol active substances in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Manag. Sci.* **75**, 950–958.
- Robinson, M.J.T. (1963). Experiments related to the biosynthesis of novocin and other coumarins *Tetrahedron* **19**, 1001–1010.
- Rodríguez-Cruz, S., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M. & Sánchez-Camazano, M. (2007). Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils. *J. Hazard. Mater.* **139**, 363–372.
- Rogovska, N., Laird, D.A., Rathke, S.J. & Karlen, D.L. (2014). Biochar impact on Midwestern Mollisols and maize nutrient availability. *Geoderma* **230**, 340–347.
- Romero, E., Matallo, M.B., Peña, A., Sánchez-Rasero, F., Schmitt-Kopplin, Ph. & Dios G. (2001). Dissipation of racemic mecoprop and dichlorprop and their pure R-enantiomers in three calcareous soils with and without peat addition. *Environ. Pollut.* **111**, 209–215.
- Ruiz-García, M., Mulas-García, D., Prades i Latorre, J., Ochoa de Eribe, J., Querzola, P. & Edmonds, J. (2015). ARAW: Uva sin botritis y sin residuos. *Phytoma* **274**, 64–68.
- Ruiz-Hitzky, E. & Van Meerbeek, A. (2006). Clay mineral-and organoclay-polymer nanocomposite. En: Handbook of Clay Science (Developments in Clay Science, 1). Bergaya, F., Theng, B.K.G. & Lagaly, G. (eds). Elsevier. pp. 583-621.
- Sajitha, T.P., Manjunatha, B.L., Siva, R., Gogna, N., Dorai, K., Ravikanth, G. & Uma Shaanker, R. (2018). Mechanism of resistance to Camptothecin, a cytotoxic plant secondary metabolite, by *Lymantria* sp. Larvae. *J. Chem. Ecol.* **44**, 611–620.
- Sanganyado, E., Lu, Z. & Liu, W. (2020). Application of enantiomeric fractions in environmental forensics: Uncertainties and inconsistencies. *Environ. Res.* **184**, 109354.

- Santana, C.M., Ferrera, Z.S., Padrón, M.E.T. & Rodríguez, J.J.S. (2009). Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches. *Molecules* **14**, 298–320.
- Sarmah, A.J., Kookana, R.S. & Alston, A.M. (1998). Fate and behavior of triasulfuron, metsulfuron-methyl, and chlorsulfuron in the Australian soil environment: A review. *Aust. J. Agric. Rec.* **49**, 775–790.
- Saudy, H-S. (2015). Maize–cowpea intercropping as an ecological approach for nitrogen-use rationalization and weed suppression. *Arch. Agron. Soil Sci.* **61**, 1–14
- Scavo, A., Abbate, C. & Mauromicale, G. (2019). Plant allelochemicals: Agronomic, nutritional and ecological relevance in the soil system. *Plant Soil* **442**, 23–48.
- Scavo, A. & Mauromicale, G. (2021). Crop allelopathy for sustainable weed management in agroecosystems: Knowing the present with a view to the future. *Agronomy* **11**, 2104.
- Schwaab, M., Steffani, E., Barbosa-Coutinho, E. & Severo Júnior, J.B. (2017). Critical analysis of adsorption/diffusion modelling as a function of time square root. *Chem. Eng. Sci.* **173**, 179–186.
- Simple, K.T., Morriss, A.W.J. & Paton, G.I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil. Sci.* **54**, 809–818.
- Simple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A. & Harms, H. (2004). Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 228–231.
- Serghini, K., Pérez De Luque, A., Castejón-Muñoz, M., García-Torres, L. & Jorrín, J. V. (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: Induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *J. Exp. Bot.* **52**, 2227–2234.
- Seupel, R., Hemberger, Y., Feineis, D., Xu, M., Seo, E. J., Efferth, T. & Bringmann, G. (2018). Ancistrocyclinones A and B, unprecedented pentacyclic N, C-coupled naphthylisoquinoline alkaloids, from the Chinese liana *Ancistrocladus tectorius*. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1581–1590.
- Si, Y.B., Zhang, J., Wang, S.Q., Zhang, L.G. & Zhou, D.M. (2006). Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuronmethyl in acidic soils in China. *Geoderma* **130**, 66–67.

- Silva, V., Mol, H., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils: A hidden reality unfolded. *Sci. Total Environ.* **653**, 1532–1545.
- Sobolev, V.S., Horn, B.W., Potter, T.L., Deyrup, S.T. & Gloer, J.B. (2006). Production of stilbenoids and phenolic acids by the peanut plant at early stages of growth. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 505–3511.
- Soltys, D., Krasuska, U., Bogatek, R. & Gniazdowska, A. (2013). Allelochemicals as bioherbicides-present and perspectives. En: *Herbicides-Current Research and Case Studies in Use*. Price, A.J., Kelton, J.A. (eds). Intech, pp. 517–542.
- Sparks, T.C., Hahn, D.R. & Garizi, N.V. (2017). Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: Role in agrochemical discovery. *Pest Manag. Sci.* **73**, 700–715.
- Sparks, T.C. & Duke, S.O. (2021). Structure simplification of natural products as a lead generation approach in agrochemical discovery. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 8324–8346.
- Stringlis, I.A., De Jonge, R. & Pieterse, C.M.J. (2019). The age of coumarins in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol.* **60**, 1405–1419.
- Sujeen, L. & Thomas, S.C. (2017). Potential of biochar to mitigate allelopathic effects in tropical island invasive plants: Evidence from seed germination trials. *Trop. Conserv. Sci.* **10**, 1–14.
- Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S. & Spiteller, M. (2013). Evaluation of sorption-desorption processes for metalaxyl in natural and artificial soils. *J. Environ. Sci. Health Part B.* **48**, 431–441.
- Tang, J., Zhu W., Kookana R. & Katayana A. (2013). Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 653–639.
- Terrado, M., Barceló, D. & Tauler, R. (2010). Multivariate curve resolution of organic pollution patterns in the Ebro River surface water-groundwater-sediment-soil system. *Anal. Chim. Acta.* **657**, 19–27.
- Tester, C.F. (1990). Organic amendment effects on physical and chemical properties of a sandy soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**, 827–831.
- Tharayil, N., Bhowmik, P.C. & Xing, B. (2006). Preferential sorption of phenolic phytotoxins to soil: Implications for altering the availability of allelochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3033–3040.

IV. Bibliografía

- Travaini, M.L., Sosa, G.M., Ceccarelli, E.A., Walter, H., Cantrell, C.L., Carrillo, N.J., Dayan, F.E., Meepagala, K.M. & Duke, S.O. (2016). Khellin and visnagin, furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as potential bioherbicides. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 9475–9487.
- Trezzi, M.M., Vidal, R.A., Balbinot Jr, A.A., Bittencourt, H.H. & Souza Filho, A.P.S. (2016). Allelopathy: Driving mechanisms governing its activity in agriculture. *J. Plant Interact.* **11**, 53–60.
- Tsao, R. & McCallum, J. (2010). Chemistry of flavonoids. En: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability. de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E. & Gonzalez-Aguilar, G.A. (eds), Wiley-Blackwell, pp. 131–153.
- Uddin, M.R., Park, S.U., Dayan, F.E. & Pyon, J.Y. (2014). Herbicidal activity of formulated sorgoleone, a natural product of sorghum root exudate. *Pest Manag. Sci.* **70**, 252–257.
- Ulibarri, M.A., Pavlovic, I., Hermosín, M.C. & Cornejo, J. (1995). Hydrotalcite-like compounds as potential sorbents of phenols from water. *Appl. Clay Sci.* **10**, 131–145.
- Unión Europea (2005). Reglamento (CE) No. 396/2005 de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal y animal. Diario Oficial Unión Europea de 16 de marzo de 2005. N° 70, 1–16. <https://www.boe.es/doue/2005/070/L00001-00016.pdf>
- Unión Europea (2017). Reglamento (CE) No. 2017/1432 de 7 de agosto de 2017, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios por lo que respecta a los criterios para la aprobación de sustancias de bajo riesgo. Diario Oficial Unión Europea de 8 de noviembre de 2017. N° 205, 59–62. <https://www.boe.es/doue/2017/205/L00059-00062.pdf>
- Unión Europea (2022a). European Commission. Horizon 2020. Work Programme 2018-2020. https://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/wp/2018-2020/main/h2020-wp1820-food_en.pdf
- Unión Europea (2022b). European Commission. Priorities for Sustainable Primary Production. https://ec.europa.eu/info/research-and-innovation/research-area/agriculture-forestry-and-rural-areas/sustainable-primary-production_en
- Vaughn, S.F. & Spencer, G.F. (1993). Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. *Weed Sci.* **41**, 114–119.

- Villaverde, J. J., Sandín-España, P., Sevilla-Morán, B., López-Goti, C. & Alonso-Prados, J. L. (2016). Biopesticides from natural products: Current development, legislative framework, and future trends. *BioResources*. **11**, 5618–5640.
- Visavale, G., Nair, R., Kamath, S., Sawant, M. & Thorat, B. (2007). Granulation and drying of modified clay incorporated pesticide formulation. *Dry. Technol.* **25**, 1369-1376.
- Vokou, D., Douvli, P., Blionis, G.J. & Halley, J.M. (2003). Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *J. Chem. Ecol.* **29**, 2281–2301.
- Wang, C-M., Chen, H-T., Li, T-C., Weng, J-H., Jhan, Y-L., Lin, S-X. & Chou, C-H. (2014). The role of pentacyclic triterpenoids in the allelopathic effects of *Alstonia scholaris*. *J. Chem. Ecol.* **40**, 90–98.
- Washington, J.B., Pignatello, J.J., Lu, Y., Ravikovitch, P.I., Neimark, A.V. & Xing, B. (2003). Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 409–417.
- Watson, J.R., Posner, A.M. & Quirk, J.P. (1973). Adsorption of the herbicide 2,4-D on goethite. *J. Soil Sci.* **24**, 503–511.
- Wauchope, R.D. (1978). The pesticides content of surface water drainage from agricultural fields – A Review. *J. Environ. Qual.* **7**, 459–472.
- Wauchope, R.D. & Myers, R.S. (1985). Adsorption-desorption kinetics of atrazine and linuron in freshwater sediments aqueous slurries. *J. Environ. Qual.* **14**, 132–136.
- Weber, J.B. (1982). Ionization and adsorption-desorption of tricyclazole by soil organic matter, montmorillonite clay and Cape Fear sandy loam soil. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 584–588.
- Weber, W.J. & Morris, J.C. (1963). Kinetics of adsorption on carbon from solution. *J. Sanit. Eng. Div.* **89**, 31–59.
- Weidenhamer, J.D., Macías, F.A., Fischer, N.H. & Williamson B.G. (1993). Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.* **19**, 1799–1807.
- Weidenhamer, J.D. & Romeo, J.T. (2005). Allelopathy as a mechanism for resisting invasion: The case of *Polygonella myriophylla*. En: *Invasive Plants: Ecological and Agricultural Aspects*. Inderjit (ed). Springer, pp. 167-177.
- Weston, L.A. (2005). History and current trends in the use of allelopathy for weed management. *Hort. Technol.* **15**, 529–534.

- Weston, L.A. & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **39**, 283–297.
- Winkler, B.C. (1967). Quantitative analysis of coumarins by thin layer chromatography, related chromatographic studies, and the partial identification of scopoletin glycoside present in tobacco tissue culture. Ph.D. Dissertation. University of Oklahoma.
- Wong, C.S. (2006). Environmental fate processes and biochemical transformations of chiral emerging organic pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 544–558.
- Worthington, M. & Reberg-Horton, C. (2013). Breeding cereal crops for enhanced weed suppression: Optimizing allelopathy and competitive ability. *J. Chem. Ecol.* **39**, 213–231.
- Wu, H., He, X., Zhou, Q. & Zhang, Y. (2017). Impact of microorganisms, humidity, and temperature on the enantioselective degradation of imazethapyr in two soils. *Chirality* **29**, 348–357.
- Xiao, Z., Le, C., Xu, Z., Gu, Z., Lv, J. & Shamsi, I.H. (2017). Vertical leaching of allelochemicals affecting their bioactivity and the microbial community of soil. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 7847–7853.
- Yang, L., Ma, X.Y., Ruan, X., Jiang, D.A., Pan, C. D. & Wang, Q. (2016). Enantioselective separation of 4,8-DHT and phytotoxicity of the enantiomers on various plant species. *Molecules* **21**, 528.
- Ye, S., Braña, A.F., González-Sabín, J., Morís, F., Olano, C., Salas, J.A. & Méndez, C. (2018). New insights into the biosynthesis pathway of polyketide alkaloid argimycins P in *Streptomyces argillaceus*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12.
- Zhang, Z.C., Chen, L.X., Wang, J., Yao, J. & Li, J.M. (2018). Biochar preparation from *Solidago canadensis* and its alleviation of the inhibition of tomato seed germination by allelochemicals. *RSC Adv.* **8**, 22370–22375.
- Zipper, C., Bunk, M., Zehnder, A. & Kohler, H-P. (1998). Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide dichlorprop [(RS)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid] by *Sphingomonas herbicidivorans* MH. *J. Bacteriol.* **180**, 3368–3374.

Capítulo V

Publicaciones



V.1. Artículo I

Título: Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants

Autores: José Antonio Galán-Pérez, Beatriz Gámiz*, Rafael Celis

Afiliación: *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain*

Revista: Biology and Fertility of Soils



Editor: Paolo Nannipieri

Editorial: Springer **Categoría:** Soil Science

Factor de Impacto (JCR 2021): 6.605 **Cuartil:** Q1 (6/39)

Volumen: 57 **Páginas:** 643–655 **Año de publicación:** 2021

Cita:

GALÁN-PÉREZ J.A., GÁMIZ B., CELIS R.

Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants. *Biology and Fertility of Soils* 57, 643–655 (2021).

<https://doi.org/10.1007/s00374-021-01556-2>



Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants

José Antonio Galán-Pérez¹ · Beatriz Gámiz¹ · Rafael Celis¹

Received: 10 December 2020 / Revised: 3 March 2021 / Accepted: 21 March 2021 / Published online: 9 April 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Vorlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The sorption of the allelochemical scopoletin (7-hydroxy-6-methoxycoumarin) was studied in eight agricultural soils and different model sorbents. We also determined its degradation in selected soils and related sorption and degradation results to the expression of scopoletin phytotoxicity in soil towards two model plant species, *Erica vesicaria* and *Hordeum vulgare*. Scopoletin was sorbed to a greater extent in acid soils than in alkaline soils. Correlations with soil properties indicated that the soil pH and fine (silt/clay) fraction played a primary role in the sorption of scopoletin by soils. Weak interactions controlled its sorption in acid soils, whereas stronger interactions, probably with mineral clay constituents, became more relevant in alkaline clay soils. Dissipation of scopoletin in the soils was microbial-mediated and occurred more slowly in acid than alkaline soils. As a result, the phytotoxic activity of scopoletin was expressed in acid but not in alkaline soil. The results point to the influence that soil properties are expected to exert on the expression of the phytotoxicity of scopoletin in natural and agricultural ecosystems.

Keywords Biodegradation · Bioherbicides · Hydroxycoumarins · Phytotoxicity · Plant allelochemicals · Sorption

Introduction

Allelopathy is a biological phenomenon by which plants (or other organisms) release biochemicals, known as allelochemicals, that influence the growth, survival, development, or reproduction of neighboring organisms (Cheng and Cheng 2015; Real et al. 2019). Although allelopathic interactions were initially investigated as a fundamental natural ecological process contributing to the abundance and distribution of species within plant communities and the interaction between crops and other plants, they have recently received much attention also in the applied field of pest management. The use of allelopathic plants in crop rotation, cover crops, green manure, and intercropping is gaining increasing importance (Cheng and Cheng 2015; Kong et al. 2019; Puig et al. 2019; Jin et al. 2020). Besides, allelochemicals are considered a source of natural, eco-friendly pesticides with the potential to reduce synthetic ones continuously introduced into the

environment (Farooq et al. 2011; Li et al. 2019; Macías et al. 2019).

Weeds represent a major constraint to crop yield and new products for their management are particularly needed as there have been no herbicides with new modes of action introduced in more than 30 years to help manage evolved herbicide resistance (Heap and Duke 2018). Along with their favorable toxicological profiles, allelochemicals display a high structural diversity and novel modes of action, and their potential to combat resistant weeds has been an important element driving interest in their study (Dayan and Duke 2014; Lebecque et al. 2019).

Coumarins represent an important group of plant allelochemicals of the polyphenol class (Niro et al. 2016; Real et al. 2019). They are widely distributed in the Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, and Fabaceae families of plants, and there have been many reports on the herbicidal, fungicidal, insecticidal, antibacterial, and nematocidal activity of different coumarins (Razavi 2011; Govea et al. 2020). Pan et al. (2015) screened several coumarins for phytotoxicity and studied the structure–activity relationship. A C7 hydroxyl group was considered a potentially active site that contributed significantly to the activity. In a subsequent study, they found that the modification of the C7 hydroxyl group of 7-hydroxycoumarin decreased the phytotoxicity and enhanced

Beatriz Gámiz
 bgamiz@irnas.csic.es

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain

the antifungal activity of the compound (Pan et al. 2017). The phytotoxic mechanism of 7-hydroxycoumarin appeared to involve a reactive oxygen species (ROS)-mediated regulation pathway and the inhibition of photosynthesis.

The 7-hydroxyderivatives 7-hydroxycoumarin (umbelliferone), 6,7-dihydroxycoumarin (esculetin), and 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (scopoletin) are the most widespread coumarins in nature (Jain and Joshi 2012). Scopoletin, described by Robison (1963) as the most common coumarin in higher plants, has been reported in many mono- and dicotyledonous plant species as well as rhizosphere soils (Winkler 1967; Graña et al. 2017; Liu et al. 2018). Besides being released into the rhizosphere in response to Fe limitation (Clemens and Weber 2016; Stringlis et al. 2019), the allelopathic activity of scopoletin has also been suggested (Baghestani et al. 1999; Serghini et al. 2001; Fernández-Aparicio et al. 2013; Liu et al. 2018; Ghimire et al. 2019). Graña et al. (2017), for example, showed that scopoletin induced strong phytotoxic effects on *Arabidopsis thaliana* seedlings with a mean inhibitory concentration (IC_{50}) of less than 50 μ M (9.6 mg L⁻¹). Scopoletin compromised root development by inducing wrong microtubule assembling, mitochondrial membrane depolarization, and ultimately cell death, in a similar way to auxin herbicides. Fernández-Aparicio et al. (2013) reported a scopoletin IC_{50} for radicle growth of the parasitic weed *Orobancha crenata* of 11 mg L⁻¹, with scopoletin causing a darkening of groups of radicle cells potentially due to necrosis at concentrations ≥ 7 mg L⁻¹. These results were in line with earlier studies in which inhibitory effects of scopoletin on different crop and weed species had been reported (Einhellig et al. 1970; Fay and Duke 1977; Baghestani et al. 1999).

Despite the fact that allelochemicals are substances with generally lower risk, lower requirements for registration, favorable perception by society, and potential to satisfy the demand of herbicides with new modes of action, the inconsistency in field performance they commonly present under different edaphic-climatic scenarios represents an important limitation for their wider success as pest management products (Wang et al. 2019). To face this limitation, studies on the fate of allelochemicals in the soil environment are badly needed, as soil is recognized as a “black box” with respect to understanding the bioactivity of allelochemicals on target organisms (Reigosa et al. 1999; Trezzi et al. 2016). Sorption on mineral and organic soil constituents, chemical and biological transformation processes, and transport through the soil matrix will all affect the concentration and bioavailability of allelochemicals in the soil and, consequently, their effective influence on the target plants. Even though the phytotoxicity of scopoletin is well described, its behavior in soils has not been studied. In this work, we conducted batch sorption and incubation experiments to characterize the sorption and dissipation of scopoletin in different agricultural soils, and then

designed bioassay experiments to compare its phytotoxicity under soilless (Petri dishes) and soil-pot conditions, to address the possible role of soils with different characteristics in the expression of its phytotoxic activity. The starting hypothesis was that deepening the knowledge of the soil processes that may determine the bioavailability of scopoletin in soils should help identify scenarios in which the activity of this and similar hydroxycoumarins could be better expressed.

Materials and methods

Scopoletin, soils, and model sorbents

Analytical standard-grade scopoletin with chemical purity > 99% was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). Scopoletin is a hydroxycoumarin with a molecular weight of 192.2 g mol⁻¹, experimental water solubility of 230 mg L⁻¹ at 25 °C, and pK_a of 7.4 (Ketani et al. 2001). Two 200 mg L⁻¹ stock solutions of scopoletin were prepared, one in methanol, to obtain the scopoletin standards (0–6 mg L⁻¹) and the initial solution (2 mg L⁻¹) used in the sorption experiments, and another one in water, to prepare the working solutions used in the dissipation and bioassay experiments. An additional scopoletin solution (12 g L⁻¹) was prepared in acetone to be used in the soil bioassays conducted at a high application rate of allelochemical.

Eight agricultural soils (S1–S8) from southwestern Spain were selected for this study. Samples of the soils were collected from a 0–20 cm depth, air-dried, sieved to pass a 2-mm mesh, and stored at 4 °C until used. The soils were chosen for their different texture, mineralogy, organic C (OC) content, and pH (Table 1). The methodology used for the characterization of the soils is detailed in the supporting information (Supplementary Text S1).

As model organic materials, two commercial substances were used, humic acid-acid form (HA, 48% C and 0.67% N) and humic acid sodium salt (HA-Na, 39% C and 0.68% N), both provided by Sigma-Aldrich (Spain). As model mineral soil constituents, three reference phyllosilicates, with different cation exchange capacities (CEC) and nitrogen-specific surface areas (SSA), and a poorly crystallized Fe-oxyhydroxide (ferrihydrite) were chosen. The three phyllosilicates, supplied by The Clay Minerals Society (Purdue University, USA), were KGa-2 kaolinite (CEC = 3.3 cmol kg⁻¹, SSA = 23.5 m² g⁻¹), IMt-1 illite (CEC = 26.6 cmol kg⁻¹, SSA = 20.5 m² g⁻¹), and SWy-2 montmorillonite (CEC = 76.4 cmol kg⁻¹, SSA = 31.8 m² g⁻¹). Detailed physicochemical data of these phyllosilicates can be found in The Clay Minerals Society webpage (CMS 2021). The Fe-oxyhydroxide (ferrihydrite, SSA = 346 m² g⁻¹) was prepared by increasing the pH of a 0.5 M Fe(NO₃)₃ solution with NaOH to a value of 7.5 following the procedure reported by Cruz-Guzmán et al. (2003).

Table 1 Physicochemical properties of the soils used in this work

Soil	Texture	Sand (%)	Silt (%)	Clay (K, I, M) ^a (%)	CaCO ₃ (%)	Organic C (%)	Fe (%)	Al (%)	pH
S1	Sandy loam	55 ± 1	36 ± 1	9 ± 1 (18, 74, 8) ^a	< 0.5	0.71 ± 0.02	1.73 ± 0.01	1.54 ± 0.01	6.3 ± 0.1
S2	Sandy loam	66 ± 1	23 ± 1	11 ± 1 (31, 69, 0)	0.7 ± 0.1	0.99 ± 0.01	3.74 ± 0.01	1.78 ± 0.05	5.2 ± 0.1
S3	Clay	9 ± 1	26 ± 1	65 ± 1 (15, 57, 28)	17.2 ± 0.2	1.12 ± 0.04	2.91 ± 0.01	4.00 ± 0.06	8.4 ± 0.1
S4	Clay loam	25 ± 1	45 ± 1	31 ± 1 (4, 33, 63)	22.6 ± 0.2	0.53 ± 0.01	1.94 ± 0.01	2.52 ± 0.02	8.6 ± 0.1
S5	Sandy loam	57 ± 2	24 ± 2	19 ± 1 (20, 80, 0)	3.6 ± 0.1	0.85 ± 0.01	1.77 ± 0.01	1.98 ± 0.10	8.3 ± 0.1
S6	Sandy loam	63 ± 1	19 ± 1	18 ± 1 (5, 7, 88)	17.9 ± 0.1	1.18 ± 0.01	1.16 ± 0.01	1.42 ± 0.02	8.4 ± 0.1
S7	Sandy clay loam	74 ± 1	6 ± 1	20 ± 1 (29, 19, 52)	< 0.5	0.34 ± 0.01	1.48 ± 0.01	1.56 ± 0.11	8.4 ± 0.1
S8	Loamy sand	83 ± 2	6 ± 1	11 ± 1 (20, 46, 34)	6.4 ± 0.1	0.35 ± 0.01	0.71 ± 0.03	0.76 ± 0.03	8.5 ± 0.1

^a Relative percentages of kaolinite (K), illite (I), and montmorillonite (M) in the soil clay fractions

Storage stability of scopoletin

As previous works have reported the instability of coumarins in certain aqueous media (Real et al. 2019; Gámiz et al. 2021), the effect of pH, light exposure, and presence of water-soluble soil components on the storage stability of scopoletin, as well as the performance of methanol as a stabilizing agent, was evaluated. For the stability tests, aqueous 2 mg L⁻¹ scopoletin solutions (50 mL) containing 1, 10, or 50% methanol were prepared using water or a soil extract as the aqueous phase. The soil extract was obtained by shaking, in 250-mL polypropylene centrifuge tubes, 50 g of soil S2 or S7 with 100 mL of distilled water for 24 h, centrifuging at 12,000 × g for 10 min, and filtering the supernatant solution with Whatman No. 1 filter paper. For each treatment of the stability tests, duplicate scopoletin solutions were either exposed to natural light or stored in the dark at 25 ± 2 °C. At selected times (0–7 days), aliquots of the solutions (2 mL) were taken, filtered (0.45 µm pore size GHP membrane disk filters), and immediately analyzed by HPLC to determine the evolution of the scopoletin concentration with time. Following the same procedure, the stability of scopoletin at different pH levels was also studied using an aqueous 2 mg L⁻¹ scopoletin solution (50 mL) prepared in HCl or NaOH, as appropriate, to reach pH values of 3, 10, and 11.

Sorption experiments

The batch equilibrium methodology was used to determine the sorption of scopoletin on the selected soils and model sorbents. In triplicate, samples of 3 g of each soil were weighed in 15-mL glass centrifuge tubes and then subjected to 3 autoclaving cycles to prevent the biodegradation of

scopoletin during the subsequent sorption measurement. The autoclaving processes (121 °C and 200 kPa for 20 min) were conducted on consecutive days with 24-h incubation periods at 25 °C between treatments. Even though soil sterilization procedures, including autoclaving, may lead to some alteration of soil properties (Wolf et al. 1989; Lotrario et al. 1995; Lees et al. 2018), the pre-sterilization step was necessary because scopoletin was found to be biodegraded very rapidly in most of the tested soils. Immediately after the third autoclaving cycle, 8 mL of a 2 mg L⁻¹ aqueous solution of scopoletin was added to the soils and the tubes were shaken at 25 ± 2 °C for 24 h. After equilibration, the tubes were centrifuged (2000 × g for 10 min) and 6 mL of the supernatant solution was removed, stabilized with 6 mL of methanol, filtered, and analyzed by HPLC to determine the solution concentration of scopoletin in the equilibrated suspensions, C_e (mg L⁻¹). Triplicate tubes with the initial scopoletin solution (2 mg L⁻¹) without soil were also shaken for 24 h as controls, showing no losses of scopoletin by sorption to the tubes or filter material. Scopoletin sorption on the model sorbents (non-autoclaved) was determined following the same methodology except that the mass of sorbent used was 120 mg. The sorbed amount of scopoletin, C_s (mg kg⁻¹), was calculated from the difference between the initial (C₀) and the equilibrium (C_e) solution concentrations. Distribution coefficients, K_d (L kg⁻¹), were determined as K_d = C_s / C_e.

As a measure of the reversibility of the sorption process, the extractability of the scopoletin sorbed by the soils and model sorbents was evaluated by a single-step desorption experiment with methanol. As a mild organic extractant, methanol was assured to extract the fraction of scopoletin in a potentially bioavailable form, that is, loosely bound to soil components (Kelsey et al. 1997; Khan et al. 2012). To this

aim, after removing the 6 mL of supernatant solution used for the sorption analysis, 8 mL of methanol was added to the tubes containing the remaining 2 mL of supernatant and the soil or model sorbent. The suspensions were shaken at 25 ± 2 °C for 24 h, centrifuged ($2000 \times g$ for 10 min), and filtered, and the concentration of scopoletin in the extracts, C_{ext} (mg L^{-1}), was determined by HPLC. The amount of scopoletin desorbed from the soil or model sorbent (mg kg^{-1}) was calculated as $C_{des} = (C_{ext} - C_r / 5) \times V / m$, where V (L) is the desorption volume and m (kg) the mass of sorbent. The results were expressed as percent of the amount initially sorbed, $\% \text{Des} = 100 \times (C_{des} / C_a)$.

Dissipation experiments

The persistence of scopoletin in selected soils (S1, S2, S7, and S8) was evaluated by a standard incubation experiment. Triplicate samples of 3 g of soil, either non-sterilized or sterilized according to the procedure described in the preceding section, were placed in 15-mL glass centrifuge tubes, and then 0.9 mL of a 30 mg L^{-1} aqueous solution of scopoletin was added, to give a soil water content of 30% and a scopoletin application rate of 9 mg kg^{-1} soil. The tubes were closed with screw caps and incubated in the dark at 25 ± 1 °C. At selected sampling times ($t = 0, 1, 2, 3, 4,$ and 7 days), independent triplicate tubes were taken from the incubator and frozen for subsequent extraction. For non-sterilized soil S7, additional tubes were prepared to evaluate the influence of the scopoletin application rate (2, 9, or 45 mg kg^{-1}), soil water content (10, 30, 40%), temperature (4, 25, 40 °C), and the presence of acetone (0, 1, 5%) on the scopoletin dissipation pattern. Details on the methodology used for these treatments are included in the supporting information (Supplementary Text S2).

Scopoletin residues in the frozen tubes were quantified by extraction with 8 mL of a 90:10 (v/v) methanol:0.01 M H_2PO_4 aqueous solution (pH = 2.2) mixture, shaking for 24 h, followed by centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min, filtering, and analysis of the filtered extracts by HPLC. With this procedure, the recoveries of the scopoletin freshly applied to the soils were > 85%.

Experimental data of scopoletin dissipation in soils were fit to a first-order kinetic rate:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

where C (mg kg^{-1}) and C_0 (mg kg^{-1}) are the concentration of scopoletin in the soils at time t (days) and $t = 0$, respectively, and k (day^{-1}) is the first-order dissipation rate constant. The half-lives ($t_{1/2}$) of scopoletin in the soils were calculated as $t_{1/2} = 0.693 / k$.

Bioassays

The phytotoxicity of scopoletin was assessed in both soilless (Petri dishes) and soil-pot experiments using *Eruca vesicaria* (dicot) and *Hordeum vulgare* (monocot) as model plant species.

For the soilless experiment, 12 seeds of each plant species were separately placed in 9-cm diameter Petri dishes containing one layer of filter paper (Whatman No. 1), and then 6 mL of an aqueous scopoletin solution at different concentrations (0, 7.5, 15, 30, 80, 100, 130, and 200 mg L^{-1}) was added. Each treatment was replicated in three Petri dishes. The Petri dishes were sealed with Parafilm® and incubated in a germination chamber under controlled conditions of temperature (25 ± 2 °C), humidity ($70 \pm 10\%$), and photoperiod (16:8-h light:dark). After 7 days, the number of germinated seeds (radicle length > 5 mm) and their root lengths were measured and expressed as percentages of the control (%G and %RL, respectively). A log-logistic dose-response curve was then obtained to calculate the scopoletin mean inhibitory concentration (IC_{50}) value for %G and %RL of the tested seeds (Seefeldt et al. 1995):

$$y = \frac{y_0}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}}\right)^b}$$

where y and y_0 are the %G or %RL at a specific concentration (x) of scopoletin (mg L^{-1}) and at $x = 0$, respectively.

For the soil-pot study, plastic pots of 20 cm^2 surface and 4.5 cm height, containing a layer of 30 g of sea sand at the bottom as a support, were filled with 20 g of soil (S1 or S7) and then treated with 6 mL of a 200 mg L^{-1} scopoletin aqueous solution, to give a soil moisture content of 30% and a scopoletin application rate of 6 kg ha^{-1} . Except for the presence of 20 g of soil, these conditions reproduced those of the soilless experiment conducted at a scopoletin concentration of 200 mg L^{-1} . To achieve a higher dose of scopoletin and overcome the water solubility of the compound, an additional treatment consisted of adding 200 μL of a 12 g L^{-1} scopoletin solution prepared in acetone followed by the application of 6 mL of water, thus yielding a scopoletin application rate of 12 kg ha^{-1} . Preliminary experiments had shown that the amount of acetone added to the soil (3% of the liquid phase) rapidly evaporated and had no effect on the germination or growth of the assayed plant species during the soil-pot study. Immediately after the application of scopoletin, twelve seeds of *E. vesicaria* or nine seeds of *H. vulgare* were homogeneously distributed on the soil surface and the pots were incubated in the germination chamber for 7 days. The soil moisture content was re-adjusted daily to the value of 30%, and at the end of the experiment, the number of germinated seeds and their root length and aerial biomass were determined and

expressed as percentage of those obtained for control pots treated identically, but without the addition of scopoletin. All treatments were replicated three times. Additional three replicates were prepared for each soil to determine the amount of scopoletin that remained in the soil's aqueous phase just after its application to the soil pots and at the end of the bioassay experiment. For this purpose, 10 g of soil was weighed in Macrosep® Advance Centrifugal tubes (Pall Corporation) equipped with a polyethersulfone membrane (0.45 µm), centrifuged (12,000 × *g* for 10 min), and the filtrate was collected and immediately analyzed by HPLC to quantify the amount of scopoletin in the aqueous phase.

Analysis of scopoletin

Scopoletin concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Waters 600E chromatograph coupled to a Waters 996 detector (UV) and Empower software as the data acquisition and processing control system. The column used for the analysis was a Kinetex C18 of 150 mm length × 4.6 mm internal diameter and 5 µm particle size, the mobile phase consisted of a mixture of methanol:aqueous H₃PO₄ (pH 2.2) (45:55) at a flow of 1 mL min⁻¹, the injection volume was 25 µL, and the UV detection wavelength was set at 343 nm. Under these conditions, the retention time of scopoletin was 3.3 min. The detection and quantification limits were 0.01 and 0.03 mg L⁻¹, calculated at a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively.

Data analysis

The statistical analysis was performed using SigmaPlot v. 14.0. Standard error was used to specify variability among independent replicates. Sorption, dissipation, and phytotoxicity data were compared using the Student's *t*-test to identify significant differences ($P < 0.05$) between treatments.

Results

Storage stability of scopoletin

Scopoletin was stable in water solution in a range of pH of 3–10, but degraded progressively in water at pH 11 and very rapidly in aqueous soil extracts both under light exposure and in the dark (Supplementary Fig. S1). As reported for other allelochemicals (Celis et al. 2005; Gámiz et al. 2018; Real et al. 2019), the addition of methanol at a rate ≥ 10% to the aqueous soil extracts was successful in stabilizing the allelochemical for a period of 7 days, presumably by eliminating the microbial activity in the extracts (Real et al. 2019). The stability of scopoletin thus showed a pattern similar to that

reported by Real et al. (2019) for the allelochemical umbelliferone (7-hydroxycoumarin), except that scopoletin presented greater stability than umbelliferone under light exposure (Supplementary Fig. S1). According to the results of the stability tests, the aqueous soil extracts collected in this work during the sorption and bioassay experiments were either analyzed immediately by HPLC or stabilized by the addition of methanol to obtain a 1:1 soil extract:methanol mixture that was stored in the dark for no more than one week before the analysis for scopoletin.

Sorption of scopoletin on soils and model sorbents

The K_d values obtained for the sorption of scopoletin on the soils selected for this study ranged between 0.76 and 7.96 L kg⁻¹ (Fig. 1). The acid soils (S1 and S2) displayed greater sorption compared to the alkaline soils (S3–S8) (Fig. 1, Supplementary Table S1). In fact, sorption correlations with soil properties showed a strong negative relationship between the K_d values and the pH of the soils ($r = -0.857$, $P = 0.007$), while no significant relationship was observed for the rest of soil properties (Supplementary Table S2). Considering only the alkaline soils (S3–S8), however, the K_d values correlated negatively with the sand content ($r = -0.932$, $P = 0.007$) and positively with the clay ($r = 0.950$, $P = 0.004$) and the *Fc* ($r = 0.937$, $P = 0.006$), and *Al* ($r = 0.968$, $P = 0.002$) soil contents (Supplementary Table S2). A multiple linear regression analysis to describe the K_d values of all eight soils as a function of two soil properties was also performed. The best fit was achieved combining pH and silt content ($R^2 = 0.835$) or pH and silt + clay content ($R^2 = 0.831$) as predictor variables (Fig. 2).

Additional information about the role that different soil constituents could have played in the sorption of scopoletin was obtained by comparing the affinity of the allelochemical for selected model sorbents. The sorption of scopoletin on the model sorbents decreased in the following order: humic acid (acid form) > ferrihydrite > montmorillonite > humic acid (sodium salt) ~ illite > kaolinite (Fig. 1, Supplementary Table S1). The humic acid in its acid form was the sorbent with the greatest affinity for scopoletin ($K_d = 167$ L kg⁻¹, pH = 6.4), contrasting with the low affinity of the humic acid containing Na⁺ saturating the negative charge of the sorbent ($K_d = 8.2$ L kg⁻¹, pH = 9.7) (Fig. 1). For the mineral sorbents, ferrihydrite and montmorillonite, with higher specific surface areas, sorbed more scopoletin than kaolinite and illite. Actually, the mineral constituents montmorillonite ($K_d = 20.4$ L kg⁻¹) and ferrihydrite ($K_d = 35.6$ L kg⁻¹) showed greater sorption than the humic acid sodium salt (Fig. 1).

Scopoletin displayed greater resistance to desorption from the alkaline soils than from the acid soils (Fig. 3, Supplementary Table S1). Over 70% of the scopoletin previously sorbed by soils S1 and S2 was recovered by a single

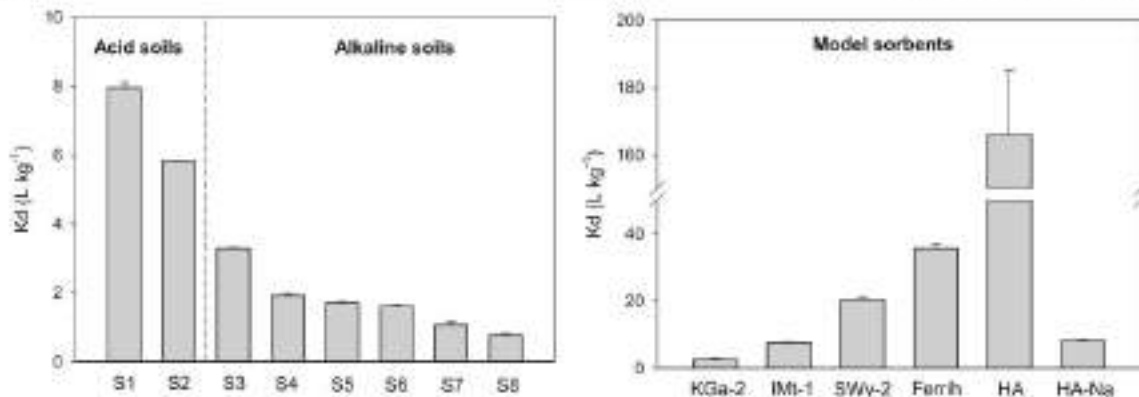


Fig. 1 Scopoletin sorption coefficients, K_d , in soils (S1–S8) and model sorbents (means and standard errors for $n = 3$). KGa-2, Georgia kaolinite; IMt-1, Montana illite; SWy-2, Wyoming montmorillonite; Ferrh, ferrihydrite; HA, humic acid (acid form); HA-Na, humic acid sodium salt

desorption step with methanol, whereas desorption values decreased to 20–50% for the alkaline soils (Fig. 3). For the alkaline soils, the residual amounts remaining sorbed after desorption increased with the clay content of the soils (Supplementary Table S1). Interestingly, similar results were found for the model sorbents, with nearly 100% desorption of scopoletin from humic acid in its acid form (low pH) and incomplete desorption (< 50%) from mineral sorbents as well as from the humic acid sodium salt (high pH) (Fig. 3, Supplementary Table S1).

Soil dissipation experiments

The dissipation curves of scopoletin in sterilized and non-sterilized samples of selected soils are shown in Fig. 4. As representatives of soils with high and low affinities for scopoletin, we chose, respectively, the two acid soils (S1 and S2) and two of the alkaline soils (S7 and S8) for the

dissipation study. The dissipation curves were all well described by single first-order dissipation kinetics, with determination coefficients $R^2 \geq 0.922$ (Fig. 4, Table 2). In non-sterilized soil samples, the dissipation of scopoletin was rapid (half-lives < 3.5 days), with the allelochemical displaying longer persistence in the acid soils (particularly in S1) compared to the alkaline soils (Fig. 4, Table 2). Dissipation in all sterilized soil samples occurred much more slowly than in the non-sterilized soils, with (extrapolated) half-lives ≥ 29 days. After 7 days of incubation, no or very little scopoletin was detected in the non-sterilized soils, while 85–90% of the initial amount remained in the sterilized soil samples (Fig. 4).

The dissipation of scopoletin in non-sterilized soil S7 under a range of different experimental conditions was also determined (Supplementary Fig. S2). The scopoletin application rate (2, 9, 45 mg kg^{-1}), the soil water content (10, 30, 40%), and the presence of acetone as a co-solvent (0, 1, 5%) had little effect on the scopoletin dissipation pattern. Some temperature changes, however, had more pronounced effects. For example, when S7 was incubated at 4 °C (in closed tubes) or 40 °C (in open tubes), the residual amount of scopoletin remaining at the end of the experiment ($t = 3$ days) was very high (> 50%). In contrast, changing the incubation temperature from 25 to 40 °C (in closed tubes) did not significantly alter the scopoletin dissipation pattern in the soil (Supplementary Fig. S2).

$$K_d \text{ (L/kg)} = 15.9 - 1.846 \cdot \text{pH} + 0.033 \cdot (\text{Silt} + \text{Clay}) \quad (R^2 = 0.821)$$

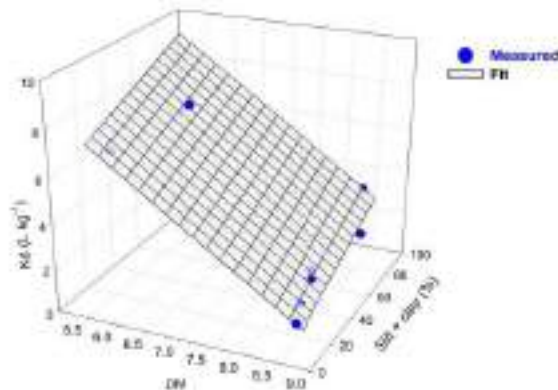


Fig. 2 Multiple linear regression plane for scopoletin K_d values measured on soils using pH and the clay + silt content of the soils as predictor variables

Bioassays

The phytotoxicity of scopoletin towards *E. vesicaria* (dicot) and *H. vulgare* (monocot) was first determined by dose-response soilless experiments in Petri dishes. The concentration of scopoletin required for 50% inhibition of germination ($IC_{50}(\text{germination})$) or root growth ($IC_{50}(\text{root growth})$), as compared to the untreated control, was calculated by fitting a log-logistic 3-parameter equation to the dose-response data (Supplementary Fig. S3). Scopoletin had a small effect on

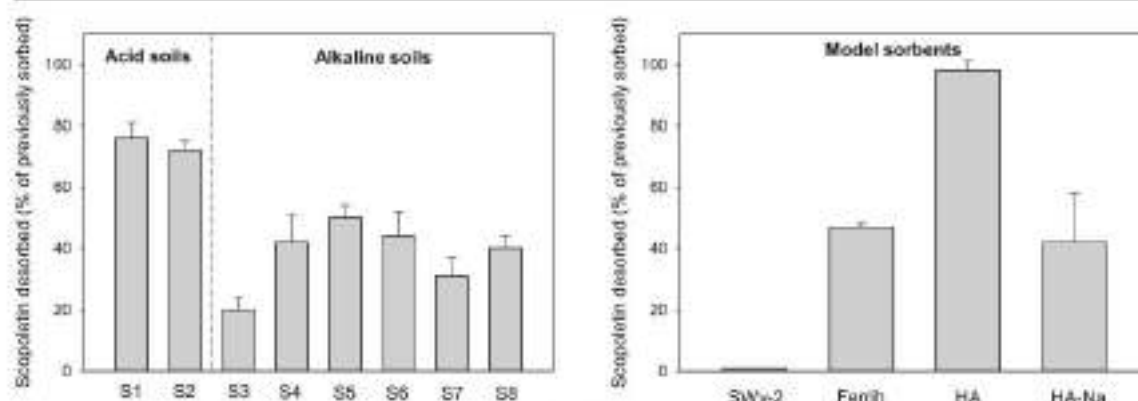


Fig. 3 Amount of scopoletin desorbed from soils and model sorbents after a single desorption step with methanol (means and standard errors for $n = 3$). Values are expressed as percentages of the amount previously sorbed in the sorption experiment

seed germination; the $IC_{50\text{-germination}}$ was not reached for any of the plant species even at the highest scopoletin concentration tested of 200 mg L^{-1} . However, the allelochemical inhibited root growth for both species. $IC_{50\text{-root growth}}$ was $135 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$ for *E. vesicaria* and $187 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$ for *H. vulgare* (Supplementary Fig. S3).

The effect of soil on the phytotoxicity of scopoletin was assessed using S1 and S7 as representatives of soils in which the allelochemical displayed different sorption and persistence (Figs. 1 and 4). The allelochemical application doses used, 6 and 12 kg ha^{-1} , corresponded to solution concentrations (without soil) of 200 and 400 mg L^{-1} , that is, one or two-fold the highest concentration used in the study in Petri dishes. Different responses on germination, root growth, and biomass were observed, depending on the soil type, allelochemical dose, and plant species (Fig. 5). For example, while the phytotoxicity of scopoletin was not expressed in soil S7, it became noticeable in soil S1 for both plant species. For *E. vesicaria*, scopoletin significantly reduced ($P < 0.05$) the root length and aerial biomass, compared to the untreated control, both at 6

and 12 kg ha^{-1} (Fig. 5). For *H. vulgare*, the treatments with scopoletin affected the root growth at 12 kg ha^{-1} ($P < 0.05$), whereas the aerial biomass was not significantly affected either at 6 or 12 kg ha^{-1} (Fig. 5). As in the soilless study, scopoletin did not affect seed germination for any of the plant species.

Discussion

Sorption experiments reflected the primary role of soil pH in the retention of scopoletin, with acid soils (S1 and S2) showing a greater affinity for the allelochemical than alkaline soils (S3–S8). At the pH of soils S1 and S2 (Table 1 and Supplementary Table S1), scopoletin ($pK_a = 7.4$) should have existed predominantly as uncharged, protonated species, while at the pH of soils S3–S8, much of the allelochemical should have dissociated into its anionic form. It is well known that the sorption of acidic organic compounds in soils is generally favored at pH levels below their pK_a , because repulsions with negatively charged surfaces of soil particles are minimized and hydrophobic partitioning on soil organic matter (SOM) is favored (Kah and Brown 2006). The anionic species of organic acids commonly sorb considerably less to SOM than their corresponding neutral species (Tülp et al. 2009; Real et al. 2019), and this is in line with the limited sorption of scopoletin displayed by the alkaline soils selected for this study.

Scopoletin, as a coumarin, derives from cinnamic acids and differs from these in loss of the carboxylic group as a result of lactonization (Benoit-Gnonlonfin et al. 2012). Interestingly, the sorption coefficients obtained in this work for scopoletin in soils S1 and S2 ($K_d = 5.9\text{--}8.0 \text{ L kg}^{-1}$) were lower than those reported by Cecchi et al. (2004) for the sorption of the cinnamic acid derivatives p-coumaric acid ($K_d = 30.0 \text{ L kg}^{-1}$) and ferulic acid (15.7 L kg^{-1}) on a (Tifton) soil with a

Table 2 Single first-order dissipation rate constants (k) and half-lives ($t_{1/2}$) for scopoletin in non-sterilized and sterilized soils

Soil	Treatment	k (d^{-1})	$t_{1/2}$ (d)	R^2
S1	Non-sterilized	0.216 ± 0.037^a	3.2	0.947
	Sterilized	0.020 ± 0.002	35	0.976
S2	Non-sterilized	1.156 ± 0.010	0.6	0.994
	Sterilized	0.023 ± 0.004	30	0.946
S7	Non-sterilized	2.041 ± 0.275	0.3	0.991
	Sterilized	0.015 ± 0.003	46	0.922
S8	Non-sterilized	5.243 ± 0.719	0.1	0.988
	Sterilized	0.024 ± 0.010	29	0.923

^a Value \pm standard error

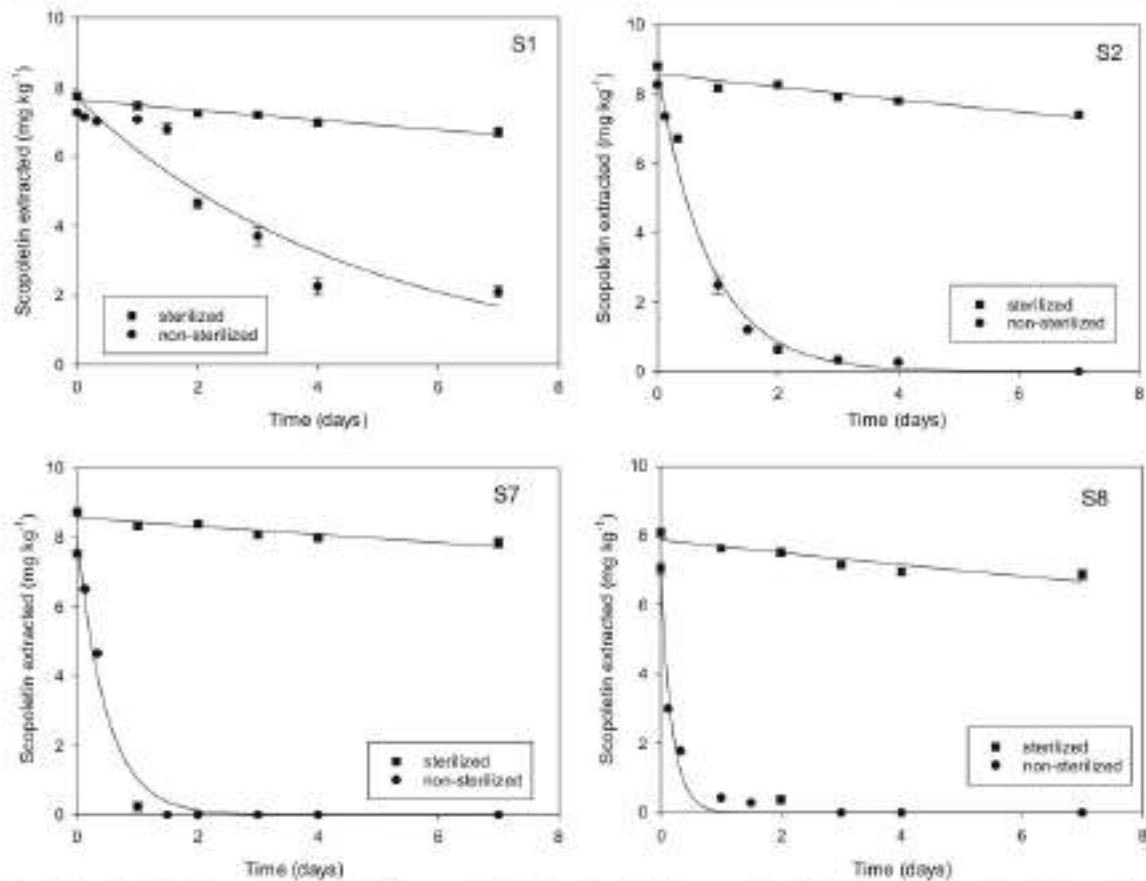


Fig. 4 Scopoletin dissipation curves in sterilized and non-sterilized soil samples. Symbols are experimental data points (means and standard errors for $n = 3$), whereas lines are the single first-order dissipation fits

pH of 5.9, organic C content of 0.7%, and clay content of 10%, under comparable experimental conditions. Tharayil et al. (2006) also reported high K_d values (8.5–92.6 L kg⁻¹) for *p*-coumaric and ferulic acids on a (Scitico) silt loam soil with pH of 5.1, at a concentration of 10 mg L⁻¹. Accordingly, Li et al. (2013) and Xiao et al. (2017) classified *p*-coumaric and ferulic acids as allelochemicals of low mobility in soil, particularly at low pH levels. Thus, lactonization appears to reduce the sorptivity of scopoletin in soil, presumably increasing its potential mobility, compared to relevant cinnamic acid precursors.

The outcomes of the sorption experiments conducted with soils and model sorbents (Fig. 1) strongly indicate that the contribution of SOM to the sorption of scopoletin should have been higher in the acid (S1 and S2) than in the alkaline soils (S3–S8), with the former facilitating weak hydrophobic interactions between the molecular form of the allelochemical and their SOM. Sorption of the molecular form of scopoletin in the acid soils could have also occurred through hydrogen bonding

with both organic and mineral soil constituents, as formation of hydrogen bonds is recognized as an important mechanism involved in the sorption of phenolic compounds by soil surfaces (Boyd 1982; Blum 1998).

Interactions with SOM were probably less favored at the alkaline conditions of soils S3–S8, in which the binding of scopoletin anions to mineral clay constituents, such as phyllosilicates or Fe/Al oxides, could have become more apparent (Blum et al. 1999; Ahmat et al. 2019). Possible interaction mechanisms include the formation of outer- or inner-sphere complexes and multivalent cation bridges, which have previously been described between phenolic compounds and metal oxide and/or clay mineral surfaces and can be of particular relevance in low organic C content soils with significant clay contents (Claisen and Fabricius 2001; Dubus et al. 2001; Celis et al. 2005; Hanna et al. 2012). These mechanisms would explain not only the outcomes of the correlation analysis but also the case with which (neutral) scopoletin desorbed from the acid soils and the resistance to desorption (anionic)

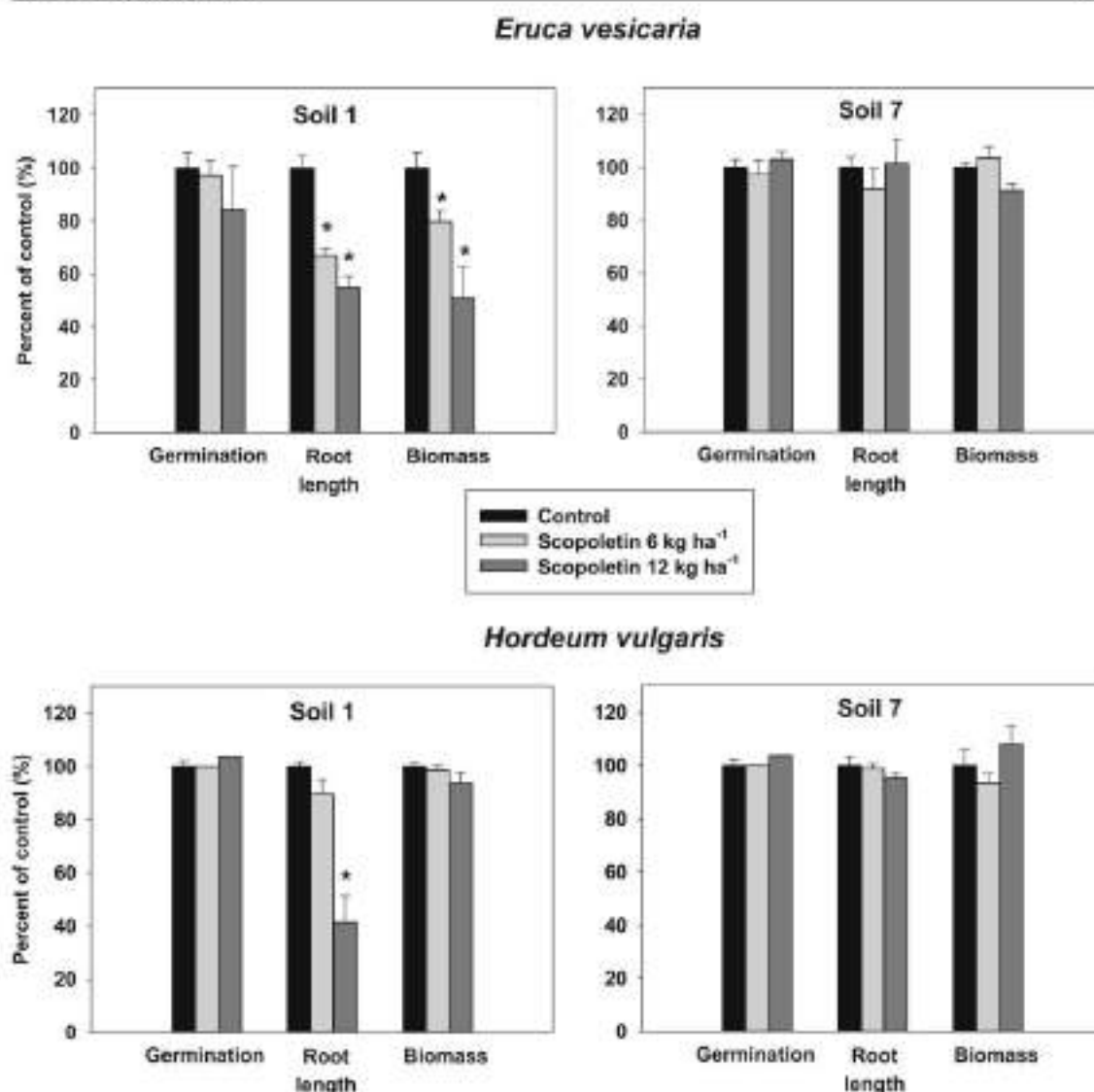


Fig. 5 Effect of two doses of scopoletin on germination, root length, and aerial biomass of *Eruca vesicaria* and *Hordeum vulgare* in soils S1 and S7. Data (means and standard errors for $n = 3$) correspond to 7 days after treatment. The asterisk indicates statistically significant difference between the treatment and the control

scopoletin displayed from the alkaline soils and the mineral sorbents using methanol as extractant (Fig. 3), as methanol is expected to extract more efficiently scopoletin loosely bound as protonated species than scopoletin anions more strongly sorbed as outer/inner sphere surface complexes or through multivalent cation bridges (Kim et al. 2012, 2013). Oxidative and polymerization reactions, a well-known transformation pathway of phenolic compounds in the presence of clay minerals and metal oxides (Wang et al. 1978; Sowhney et al. 1984; Shindo and Huang 1984; McBride and Kung

1991), could have also contributed to the interaction of scopoletin anions with soil minerals and would also be compatible with the observed resistance to desorption from the alkaline soils and model minerals (Blum et al. 1999; Clausen et al. 2001; Cecchi et al. 2004; Polubesova et al. 2010; Levy et al. 2020).

The dissipation patterns of scopoletin in non-sterilized and sterilized soil samples (Fig. 4) indicated that microbial degradation was the main dissipation route for the allelochemical. A distinctive characteristic of most allelochemicals is that they

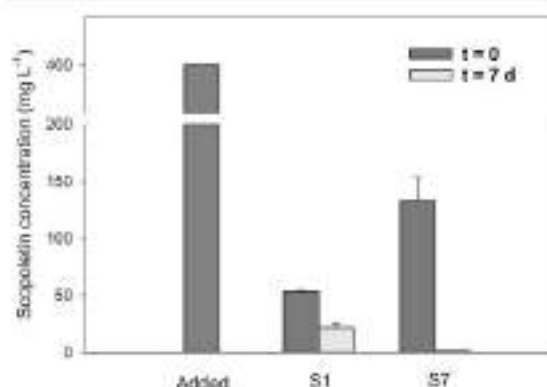


Fig. 6 Measured concentrations of scopoletin in the aqueous phase at the beginning ($t = 0$) and at the end ($t = 7$ days) of the bioassay with *Erigeron vesicarius* in soils S1 and S7 compared to the total amount of compound added for the dose of 12 kg ha^{-1} (means and standard errors for $n = 3$)

are rapidly transformed by soil microorganisms (Inderjit 2005; Gámiz et al. 2018, 2019; Real et al. 2019; Braveri et al. 2020), and biodegradation has previously been suggested to dominate the transformation of other coumarins in soils (Real et al. 2019; Gámiz et al. 2021). The slow degradation of scopoletin in the sterilized soils was in accordance with their very low dehydrogenase activity (DHA), indicative of low microbial activity (Supplementary Table S3). However, DHA values could not satisfactorily explain the high half-life scopoletin showed in non-sterilized soil S1, which could have thus in part resulted from the extensive sorption of the allelochemical in this soil (Fig. 1). Sorption of phenolic compounds has been proposed as a mechanism that can increase their soil persistence by delaying microbial degradation (Blum et al. 1999; Inderjit 2005; Tharayil et al. 2006; Gámiz et al. 2019; Real et al. 2019).

Except for severe conditions of very low temperature ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) or extensive water evaporation from the soil ($40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in open tubes), abiotic factors had, in general, little effect on the dissipation of scopoletin (Supplementary Fig. S2). Temperature affects the cell metabolism and the physicochemical properties of the environment, and the soil moisture content influences the proliferation and activity of microorganisms (Martinez et al. 2008). However, under moderate conditions of temperature ($25\text{--}40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and soil moisture content ($10\text{--}40\%$), the degradation of scopoletin occurred very rapidly independent of the specific conditions (Supplementary Fig. S2).

The presence of soil had a profound effect on the expression of the phytotoxic activity of scopoletin, specifically on its inhibitory effect on the root growth of *E. vesicaria* and *H. vulgaris* (Supplementary Figs. S4 and S5). Inhibition of root growth is a well-known phytotoxic effect of scopoletin (Graña et al. 2017). However, the fact that scopoletin was phytotoxic in soil S1 but not in soil S7 (Fig. 5) showed that the activity of this coumarin can be expressed in some soils and completely

suppressed in others. The extensive but reversible sorption of scopoletin in S1 (Fig. 1) could have contributed to delay its degradation rate (Fig. 4) while allowing the allelochemical to exert its action. Although allelochemicals in the sorbed-state are considered to be less bioavailable to target organisms than when present in the soil solution, reversible sorption could have helped replenish the soil solution with scopoletin as the allelochemical slowly dissipated by degradation, thereby prolonging its activity (Blum 1998; Kaur et al. 2009).

In spite of the fact that the low sorption of scopoletin by soil S7 (Fig. 1) implied a high concentration of bioavailable compound in the soil solution at the beginning of the bioassay experiment (Fig. 6), the allelochemical was rapidly inactivated in this soil by biodegradation (Figs. 4 and 6). In S1, the high sorption reduced the initial bioavailable fraction of allelochemical to a level lower than for soil S7 but, probably with the contribution of ready allelochemical replenishment from the soil solid phase, such level was maintained over time (Fig. 6), favoring the expression of the phytotoxic activity of scopoletin. The bioactivity of scopoletin would thus be determined by the maintenance of a phytotoxic level in the soil solution (Macias et al. 2019) which, according to our experiments, was clearly soil dependent (Fig. 6).

The mode of action of scopoletin has been proposed to be similar to that of auxinic herbicides, such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Graña et al. 2017), and monocots are usually less sensitive to auxinic herbicides than dicots (Michel et al. 2004; McSteen 2010; Song 2014). This would explain the differences in the phytotoxic effects that scopoletin produced on *E. vesicaria* and *H. vulgaris* both in the soilless study (Supplementary Fig. S3) and in the experiments with soil S1 (Fig. 5). Seedlings of *E. vesicaria* also grew more slowly and reached a smaller size than those of *H. vulgaris*, and this could have also contributed to making the effect of scopoletin on its aerial biomass more evident than for *H. vulgaris*.

Conclusion

The results of this work demonstrate that the expression of the phytotoxicity of scopoletin in soils depends on soil type because of the influence that soil characteristics can exert on the sorption and persistence of the allelochemical. By governing the (bioavailable) concentration of the compound in the soil solution, the sorption extent and mechanism appeared to play an important role in controlling the biodegradation and bioefficacy of scopoletin in the soil. In this regard, weak interactions controlled sorption in acid soils, whereas stronger interactions, probably with mineral clay constituents (phyllosilicates and Fe/Al oxides), became more relevant in alkaline clay soils. The degradation of scopoletin in soils was microbial-mediated and, except for extreme conditions of

temperature or soil moisture content, the soil type affected the persistence of scopoletin more than other variables. In the current global scenario of climate change, however, the extended persistence of scopoletin under very low temperature or soil moisture content conditions may be relevant, since it strongly indicates that the commonly short persistence of allelochemicals in soils can be unusually increased under severe environmental or climatic conditions. Overall, our results illustrate how the activity of allelochemicals can be greatly influenced by their behavior in the soil environment and show that a deep knowledge of the environmental fate of allelochemicals is of fundamental importance to understand belowground interactions in ecosystems as well as to assess the real potential of applying such interactions in crop protection strategies.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01556-2>.

Author contribution BG, RC: Conceptualization.

BG, RC: Methodology.

JAG, BG, RC: Formal analysis.

JAG: Investigation.

JAG: Writing—original draft preparation.

BG, RC: Writing—review and editing.

RC: Funding acquisition.

BG, RC: Supervision.

Funding This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities (MCIU/AEI) with FEDER-FSE funds (grant AGL2017-82141-R). J.A. Galán-Pérez also thanks MCIU/AEI for a predoctoral contract (grant PRE2018-083293) linked to project AGL2017-82141-R.

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Almoi AM, Thiebaut T, Galgou R (2019) Phenolic acids interactions with clay minerals: a spotlight on the adsorption mechanisms of gallic acid onto montmorillonite. *Appl Clay Sci* 180:105188. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105188>
- Baghestani A, Lemieux C, Lennox GD, Bazramakanga R, Simard RR (1999) Determination of allelochemicals in spring cereal cultivars of different competitiveness. *Weed Sci* 47:498–504. <https://doi.org/10.1017/s0043174500092171>
- Benoit-Grienerouffin GJ, Sami A, Briser L (2012) Review scopoletin – a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Crit Rev Plant Sci* 31:47–56. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616039>
- Blum U (1998) Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. *J Chem Ecol* 24:685–708. <https://doi.org/10.1023/A:1022394203540>
- Blum U, Shafer SR, Lehman ME (1999) Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. an experimental model. *Crit Rev Plant Sci* 18:673–693. <https://doi.org/10.1080/07352689991309441>
- Boyd SA (1982) Adsorption of substituted phenols by soil. *Soil Sci* 134:337–345
- Bravetti MMM, Carpinella MC, Palacios SM (2020) Phytotoxicity of *Cortaderia speciosa* extract, active principles, degradation in soil and effectiveness in field tests. *Chemosphere* 30:15–24. <https://doi.org/10.1007/s00049-019-00294-0>
- Cocchi AM, Koskinen WC, Cheng HH, Haider K (2004) Sorption-desorption of phenolic acids as affected by soil properties. *Biol Fertil Soils* 39:235–242. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0710-6>
- Celis R, Real M, Hermosin MC, Comajo J (2005) Sorption and leaching behaviour of polar aromatic acids in agricultural soils by batch and column leaching tests. *Eur J Soil Sci* 56:287–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2004.00676.x>
- Cheng F, Cheng Z (2015) Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Front Plant Sci* 6:1020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.011020>
- Clausen L, Fabricius I, Madsen L (2001) Adsorption of pesticides onto quartz, calcite, kaolinite, and alpha-alumina. *J Environ Qual* 30:846–857
- Clemens S, Weber M (2016) The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant Signal Behav* 11:e114197. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1114197>
- Cruz-Guzmán M, Celis R, Hermosin MC, Leone P, Nègre M, Comajo J (2003) Sorption-desorption of lead (II) and mercury (II) by model associations of soil colloids. *Soil Sci Soc Am J* 67:1378–1387. <https://doi.org/10.2136/soaj2003.1378>
- Dryan FE, Duke SO (2014) Natural compounds as next generation herbicides. *Plant Physiol* 166:1090–1105. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239061>
- Dubus IG, Barriso E, Calvet R (2001) Sorption of weak organic acids in soils: clofemot, 2,4-D and salicylic acid. *Chemosphere* 45:767–774. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00108-4)
- Einhellig FA, Rice EL, Rissler PG, Wender SH (1970) Effects of scopoletin on growth, CO₂ exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin, and chlorogenic acids in tobacco, sunflower, and pigweed. *Bull Torrey Bot Club* 97:22–33
- Farooq M, Jabran K, Cheema ZA, Wahid A, Siddique KHM (2011) The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Manag Sci* 67:493–506. <https://doi.org/10.1002/ps.2091>
- Fay PK, Duke WB (1977) An assessment of allelopathic potential in *Avena* germ plasma. *Weed Sci* 25:224–228. <https://doi.org/10.1017/s0043174500033348>
- Fernández-Aparicio M, Cirrmino A, Evidente A, Ribulkes D (2015) Inhibition of *Oryzopsis arvensis* seed germination and seedling growth by allelochemicals identified in cereals. *J Agric Food Chem* 61:9797–9803. <https://doi.org/10.1021/jf403738p>
- Gámiz B, Focanda G, Celis R (2019) Modulating the persistence and bioactivity of allelochemicals in the rhizosphere: salicylic acid, a case of study. *Arch Agron Soil Sci* 65:581–595. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1512102>
- Gámiz B, Hermosin MC, Celis R (2018) Appraising factors governing sorption and dissipation of the monoterpene carvone in agricultural soils. *Geoderma* 321:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.005>
- Gámiz B, López-Cabeza R, Velarde P, Spokas KA, Cox L (2021) Biochar changes the bioavailability and bioefficacy of the allelochemical coumarin in agricultural soils. *Pest Manag Sci* 77:834–843. <https://doi.org/10.1002/ps.6086>

- Ghimire BK, Ghimire B, Yu CY, Chung JM (2019) Allelopathic and autotoxic effects of *Medicago sativa*-derived allelochemicals. *Plants* 8:213
- Gouvea KP, Tomita Pereira RS, Oliveira de Assis MD, Alves PI, Brancaglion GA, Toyota AE, Cardoso Machado JV, Carvalho DT, de Souza TC, Beijo LA, De Oliveira Ribeiro Trindade L, Barbosa S (2020) Allelochemical activity of eugenol-derived coumarins on *Lactuca sativa* L. *Plants* 9:533. <https://doi.org/10.3390/plants9040533>
- Gralla E, Costa-Gil A, Longueira S, Celeiro M, Teixeira M, Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras AM (2017) Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *J Plant Physiol* 218:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.007>
- Hama K, Lassabriere L, Bedier B (2012) Transport of two naphthoic acids and salicylic acid in soil: experimental study and empirical modeling. *Water Res* 46:4457–4467. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.037>
- Heap I, Duke SO (2018) Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag Sci* 74:1040–1049. <https://doi.org/10.1002/ps.4760>
- Indejit (2005) Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. *Plant Soil* 274:227–236. <https://doi.org/10.1007/s11004-004-0159-x>
- Jain PK, Joshi H (2012) Coumarin: chemical and pharmacological profile. *J Appl Pharm Sci* 2:236–240. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2643>
- Jin X, Wu F, Zhou X (2020) Different toxic effects of ferulic and p-hydroxybenzoic acids on cucumber seedling growth were related to their different influences on rhizosphere microbial composition. *Biol Fertil Soils* 56:125–136. <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01408-0>
- Kah M, Brown CD (2006) Adsorption of ionizable pesticides in soils. *Rev Environ Contam Toxicol* 188:149–217. https://doi.org/10.1007/978-0-387-32964-3_5
- Kaur H, Kaur R, Kaur S, Baldwin IT, Indejit (2009) Taking ecological function seriously: soil microbial communities can obviate allelopathic effects of released metabolites. *PLoS One* 4:e4700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004700>
- Kelsey JW, Kuttler BD, Alexander M (1997) Selective chemical extracts to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ Sci Technol* 31:214–217. <https://doi.org/10.1021/es960554j>
- Ketai W, Huijao L, Xingqiao C, Yunkan Z, Zhide H (2001) Identification and determination of active components in *Angelica daburica* Bernh. and its medicinal preparation by capillary electrophoresis. *Talanta* 54:753–761. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00327-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00327-7)
- Khan MI, Cheema SA, Shen C, Zhang C, Tang X, Shi J, Chen X, Park J, Chen Y (2012) Assessment of phenanthrene bioavailability in aged and unaged soils by mild extraction. *Environ Monit Assess* 184:549–559. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-1987-9>
- Kim M, Han J, Hyun S (2013) Anion exchange of organic carboxylate by soils responsible for positive K_{oc}-f_{oc} relationship from methanol mixture. *Chemosphere* 93:133–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.005>
- Kim M, Kim J, Hyun S (2012) Solubility of organic acids in various methanol and salt concentrations: the implication on organic acid sorption in a cosolvent system. *Chemosphere* 89:262–268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.031>
- Kong CH, Xuan TD, Khanh TD, Tran HD, Trung NT (2019) Allelochemicals and signaling chemicals in plants. *Molecules* 24:2737. <https://doi.org/10.3390/molecules24152737>
- Lebecque S, Lins L, Dayan FE, Fausconier ML, Delou M (2019) Interactions between natural herbicides and lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane. *Front Plant Sci* 10:329. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00329>
- Lees K, Fitzsimons M, Snape J, Tappin A, Comber S (2018) Soil sterilisation methods for use in OECD 100: how effective are they? *Chemosphere* 209:61–67. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.073>
- Levy L, Guruv A, Radian A (2020) The effect of gallic acid interactions with iron-coated clay on surface redox reactivity. *Water Res* 184:116190. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116190>
- Li XJ, Xia ZC, Kong CH, Xu XH (2013) Mobility and microbial activity of allelochemicals in soil. *J Agric Food Chem* 61:3072–3079. <https://doi.org/10.1021/jf400994m>
- Li ZR, Amist N, Bai LY (2019) Allelopathy in sustainable weeds management. *Allelopathy* 48:109–138
- Liu J, Xie M, Li X, Jin H, Yang X, Yan Z, Su A, Qin B (2018) Main allelochemicals from the rhizosphere soil of *Saussurea lappa* (Dacn.) Sch. Bip. and their effects on plants' antioxidant systems. *Molecules* 23:2306. <https://doi.org/10.3390/molecules23102306>
- Lotario JB, Stuart BJ, Lam T, Arand RR, O'Connor GA, Kossin DS (1995) Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil: implications for sorption isotherm analyses. *Bull Environ Contam Toxicol* 54:668–675. <https://doi.org/10.1007/BF00206697>
- Macias FA, Mejias FJR, Molinillo JMG (2019) Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest Manag Sci* 75:2413–2436. <https://doi.org/10.1002/ps.5355>
- Martinez CL, de Souza Silva CMM, Fay EF, Abukerk RB, Maia AHN, Durant LR (2008) The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. *Geoderma* 147:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.07.005>
- McBride MB, Kung KH (1991) Adsorption of phenol and substituted phenols by iron oxides. *Environ Toxicol Chem* 10:441–448. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100403>
- McSteen P (2010) Auxin and monooxygenase development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001479. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001479>
- Michel A, Johnson RD, Duke SO, Schieffer BE (2004) Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method. *Environ Toxicol Chem* 23:1074–1079. <https://doi.org/10.1897/03-256>
- Niro E, Marzanti R, De Cosco S, Castaldi S, Esposito A, Fiorentino A, Rutigliano FA (2016) Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community. *Soil Biol Biochem* 95:30–39. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.028>
- Pan L, Li X, Jin H, Yang X, Qin B (2017) Antifungal activity of umbelliferone derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Microb Pathog* 104:110–115. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.024>
- Pan L, Li X, Yan Z, Guo H, Qin B (2015) Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: structure-activity relationships and action mechanisms. *Plant Physiol Biochem* 97:272–277. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.020>
- Pohribesova T, Eklad S, Chertov B (2010) Adsorption and oxidative transformation of phenolic acids by Fe(III)-montmorillonite. *Environ Sci Technol* 44:4203–4209. <https://doi.org/10.1021/es1007593>
- Paig CG, Revilla P, Barreal ME, Reigosa MJ, Pedrol N (2019) On the suitability of *Eucalyptus globulus* green manure for field weed control. *Crop Prot* 121:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.016>
- Razzavi SM (2011) Plant coumarins as allelopathic agents. *Int J Biol Chem* 5:86–90
- Rozal M, Gámiz B, López-Cabeza R, Celis R (2019) Sorption, persistence, and leaching of the allelochemical umbelliferone in soils treated with nanoengineered sorbents. *Sci Rep* 9:9764. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46031-z>

- Reigosa MU, Sánchez-Moreiras A, González L (1999) Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit Rev Plant Sci* 18:577–608. <https://doi.org/10.1080/07352689991309468>
- Robison T (1963) The organic constituents of higher plants: their chemistry and interrelationships. Burgess Publishing Company, Minneapolis
- Sawhney BL, Kozleski RK, Jaansson PJ, Gent MPN (1984) Polymerization of 2,6-dimethylphenol on smectite surfaces. *Clay Clay Miner* 32:108–114. <https://doi.org/10.1346/cmm.1984.03210204>
- Seefeldt SS, Jensen JE, Fuerst EP (1995) Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationship. *Weed Technol* 9:218–227
- Sorghini K, Pérez De Lagre A, Cárdenas-Muñoz M, García-Torres L, Jorin JV (2001) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanchae cernua* Loell.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *J Exp Bot* 52:2227–2234. <https://doi.org/10.1093/jxb/52/12/2227>
- Shindo H, Huang PM (1988) Catalytic effects of manganese (IV), iron (III), aluminum, and silicon oxides on the formation of phenolic polymers. *Soil Sci Soc Am J* 48:927–934. <https://doi.org/10.2136/soaj1984.03615995004800040045a>
- Song Y (2014) Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol* 56:106–113. <https://doi.org/10.1111/jipb.12131>
- Straglis IA, De Jonge B, Pieterse CMI (2019) The age of coumarins in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol* 60:1405–1419. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz076>
- Tharayil N, Bhowmik PC, Xing B (2006) Preferential sorption of phenolic phytotoxins to soil: implications for altering the availability of allelochemicals. *J Agric Food Chem* 54:3033–3040. <https://doi.org/10.1021/jf053167q>
- The Clay Minerals Society, CMS (2021). <https://www.clays.org/>
- Trezzi MM, Vidal RA, Balbinot Junior AA, von Herrwig BH, da Silva Souza Filho AP (2016) Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture. *J Plant Interact* 11:53–60. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1159342>
- Tülp HC, Fener K, Schwarzenbach RP, Goss KU (2009) pH-dependent sorption of acidic organic chemicals to soil organic matter. *Environ Sci Technol* 43:9189–9195. <https://doi.org/10.1021/es90272j>
- Wang TSC, Li SW, Feng YL (1978) Cationic polymerization of phenolic compounds by clay minerals. *Soil Sci* 126:15–21
- Wang X, Peter S, Liu Z, Armstrong B, Rochford S, Tang C (2019) Allelopathic effects account for the inhibitory effect of field-pea (*Pisum sativum* L.) shoots on wheat growth in dense clay subsoils. *Biol Fertil Soils* 55:649–659. <https://doi.org/10.1007/s00574-019-01384-5>
- Winkler BC (1967) Quantitative analysis of coumarins by thin layer chromatography, related chromatographic studies, and the partial identification of scopoletin glycoside present in tobacco tissue culture. Ph.D. Dissertation, University of Oklahoma, Norman
- Wolf DC, Dao TH, Scott JD, Lavy TL (1989) Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. *J Environ Qual* 18:39–44. <https://doi.org/10.2134/jeq1989.0047242801800010007x>
- Xiao Z, Li C, Xu Z, Gu Z, Lv J, Shamsi JH (2017) Vertical leaching of allelochemicals affecting their bioactivity and the microbial community of soil. *J Agric Food Chem* 65:7847–7853. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01581>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supporting Information for

Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants

José Antonio Galán, Beatriz Gámiz*, Rafael Celis

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain

***Corresponding Author:** Dr. Beatriz Gámiz

Phone: +34 954624711

E-mail: bgamiz@irnase.csic.es

Text S1 Methodology for soil characterization

The texture of the soils was determined by the hydrometer method. The carbonate content was measured by the pressure calcimeter method and the organic carbon content by dichromate oxidation. The Fe and Al contents were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) after acid digestion of the soils with a 3:1 (v:v) HCl:HNO₃ mixture (aqua regia). The relative percentages of kaolinite, illite, and montmorillonite in the soil clay fractions were determined by X-ray diffraction analysis of oriented specimens of Mg²⁺- and K⁺ saturated clay samples, solvated with liquid ethylene glycol and calcined at 550°C. respectively. Soil pH values were measured in 1:2.5 (w:v) soil:water slurries.

Dehydrogenase activity (DHA) was determined by incubating 1 g of soil with 0.2 mL of 0.4% 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT) plus 0.1 mL of water at 20 ± 2°C for 20 h in the dark. After incubation, the iodonitrotetrazolium formazan (INTF) produced was extracted with 10 mL of methanol and quantified by absorbance measurement at 490 nm. The experiment was performed in triplicate.

Text S2 Description of the different treatments conducted to assess the effect of the application rate, soil water content, temperature, and the presence of acetone on scopoletin dissipation in non-sterilized soil S7

i) Application rate: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.9 mL of an aqueous solution of scopoletin at different concentrations (6, 30, or 150 mg L⁻¹) to give application rates of 2, 9 and 45 mg kg⁻¹ soil and a soil water content of 30%. The samples were incubated in closed tubes at 25 °C for 3 days.

ii) Soil water content: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.3 mL of a 90 mg L⁻¹ aqueous solution of scopoletin plus 0, 0.6 or 0.9 mL of water, to reach a scopoletin application rate of 9 mg kg⁻¹ and soil water contents of 10, 30, or 40%, respectively. The samples were incubated in closed tubes at 25 °C for 3 days.

iii) Temperature: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.9 mL of a 30 mg L⁻¹ aqueous solution of scopoletin to give an application rate of 9 mg kg⁻¹ soil and a water content of 30%. The samples were incubated in closed tubes at 4, 25, or 40°C for 3 days. An additional treatment consisting of incubating 3 g soil spiked with 0.3 mL of a 90 mg L⁻¹ aqueous solution of scopoletin at 40 °C in open tubes (to allow water evaporation along the experiment) was also included.

iv) Presence of acetone: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.9 mL of a 30 mg L⁻¹ aqueous solution of scopoletin containing 0, 1, or 5% acetone (v:v). The samples were incubated at 25 °C for 3 days.

For all treatments, independent triplicate tubes were taken from the incubator at selected times (t= 0, 1, 2, and 3 days), and frozen for subsequent extraction as described in the main text.

Table S1 Amount of scopoletin sorbed on soils and model sorbents after the sorption and desorption steps and pH of the equilibrated solutions after sorption

	C_s sorption (mg kg^{-1}) ^a	pH ^b	C_s desorption (mg kg^{-1}) ^c
Soils			
S1	3.91 ± 0.02	6.5 ± 0.1	0.96 ± 0.09
S2	3.58 ± 0.01	6.2 ± 0.1	1.01 ± 0.12
S3	2.88 ± 0.01	7.7 ± 0.1	2.30 ± 0.10
S4	2.18 ± 0.04	7.8 ± 0.1	1.26 ± 0.15
S5	2.03 ± 0.03	7.7 ± 0.1	1.02 ± 0.07
S6	1.96 ± 0.03	7.7 ± 0.1	1.10 ± 0.19
S7	1.49 ± 0.08	7.7 ± 0.1	1.02 ± 0.01
S8	1.15 ± 0.06	8.0 ± 0.1	0.69 ± 0.10
Model sorbents			
KGa-2	4.85 ± 0.01	6.7 ± 0.1	- ^d
IMt-1	13.4 ± 0.4	7.5 ± 0.1	-
SWy-2	30.5 ± 0.5	8.3 ± 0.1	30.9 ± 1.6
Ferrihydrite	45.4 ± 1.0	4.1 ± 0.1	24.2 ± 1.0
HA	93.0 ± 3.1	6.4 ± 0.1	2.02 ± 2.66
HANa	14.4 ± 0.7	9.7 ± 0.1	8.26 ± 2.05

^a Amount of scopoletin sorbed after sorption (mean \pm standard error for $n = 3$)

^b pH of the equilibrated solution after sorption

^c Amount of scopoletin that remained sorbed after desorption with methanol

^d Not determined because of very low sorption

Table S2

Pearson correlation coefficients (r) between the scopoletin K_d values and relevant soil properties. Statistically significant ($P < 0.05$) correlations are highlighted in bold

	All soils (n = 8)		Alkaline soils (n = 6)	
	r	P	r	P
Sand	-0.138	0.744	-0.932	0.007
Silt	0.483	0.226	0.575	0.233
Clay	-0.168	0.691	0.950	0.004
CaCO ₃	-0.379	0.355	0.570	0.238
Organic carbon	0.299	0.472	0.689	0.130
Fe	0.532	0.174	0.937	0.006
Al	0.089	0.833	0.968	0.002
pH	-0.857	0.007	-0.124	0.815

Table S3 Dehydrogenase activity of the soils selected for the dissipation study

Soil	Treatment	Dehydrogenase activity (mg INTF g ⁻¹ h ⁻¹)
S1	Non-sterilized	0.57 ± 0.03 ^a
	Sterilized	< LOQ ^b
S2	Non-sterilized	0.10 ± 0.01
	Sterilized	< LOQ
S7	Non-sterilized	0.56 ± 0.01
	Sterilized	< LOQ
S8	Non-sterilized	1.22 ± 0.01
	Sterilized	< LOQ

^a Mean ± standard error for n = 3

^b Limit of quantification (LOQ) for dehydrogenase activity = 0.10 mg INTF g⁻¹ h⁻¹.

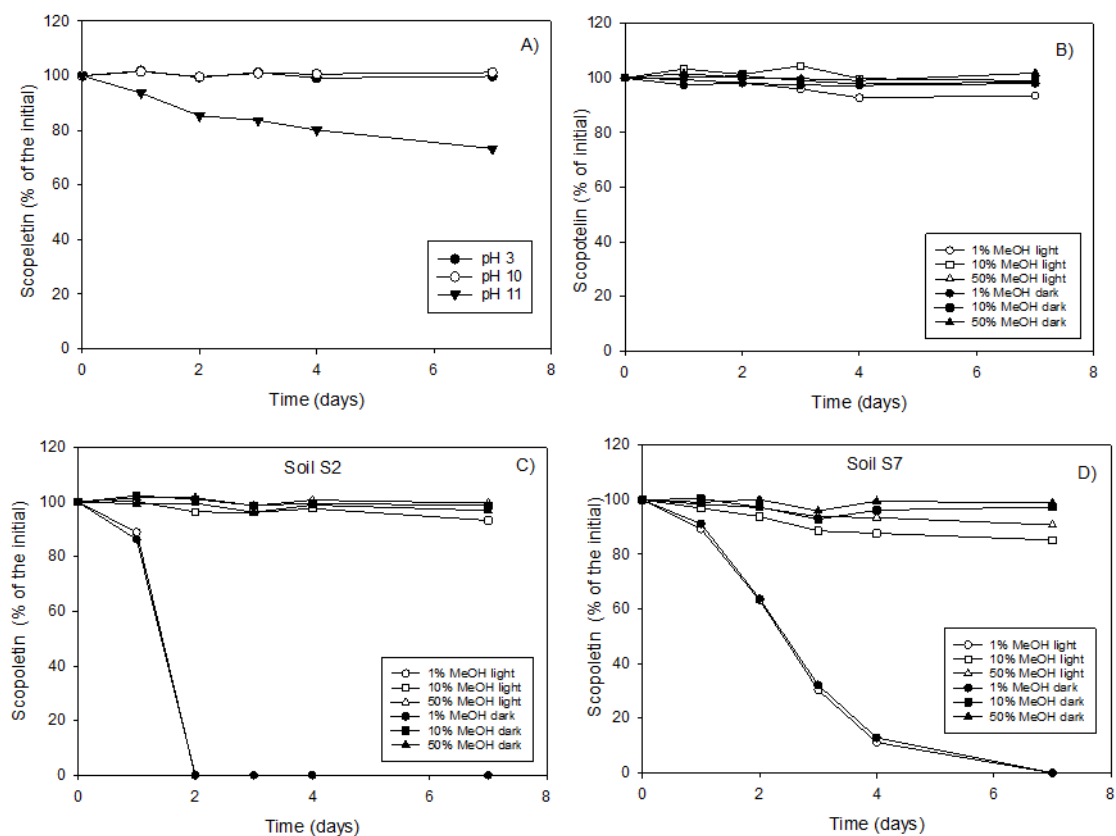


Fig S1 Stability of scopoletin in: A) water adjusted to different pH values, B) water:methanol mixtures, C) aqueous soil extract (soil S2):methanol mixtures, and D) aqueous soil extract (soil S7):methanol mixtures

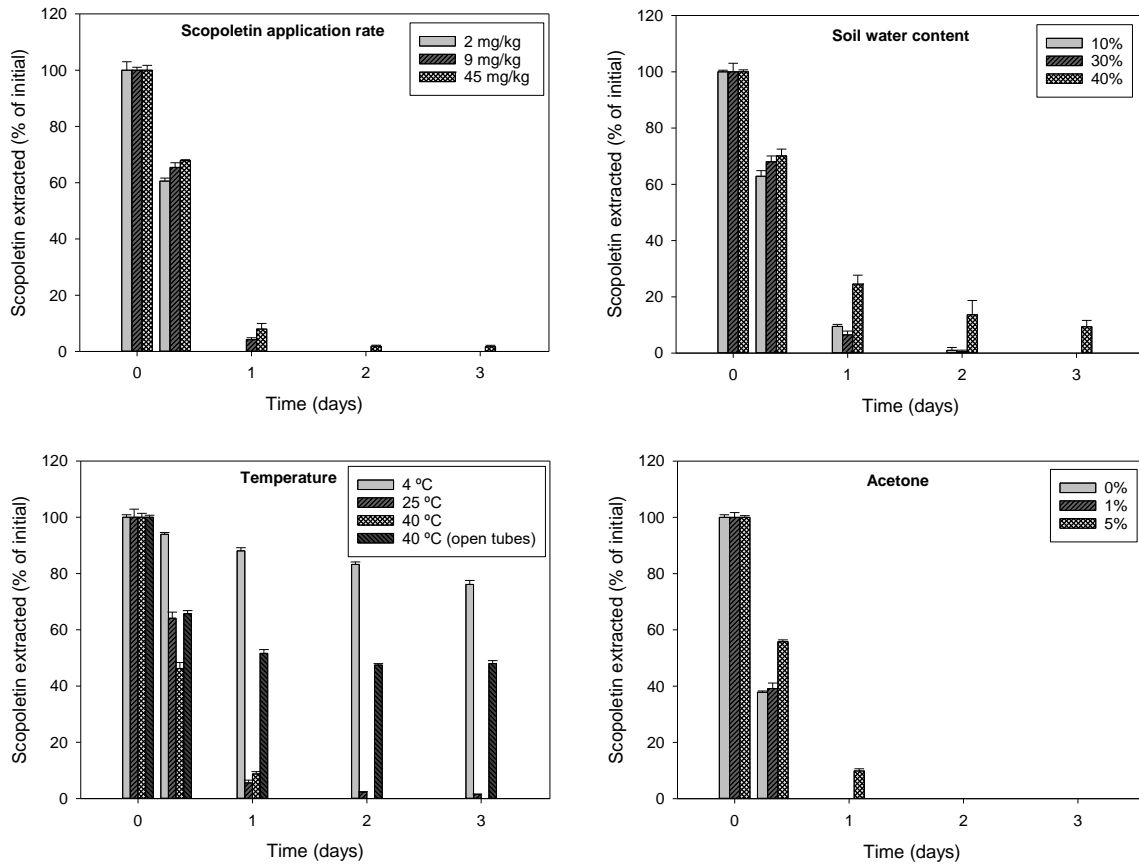


Fig S2 Effect of the application rate, soil water content, temperature, and the presence of acetone on the dissipation of scopoletin in soil S7. Treatments are described in detail in Supplementary Text S2. In all treatments, the soil water content remained constant during the experiment, except in the treatment at 40 °C (open tubes) where the soil moisture content decreased from 10 to less than 5% after one day of incubation

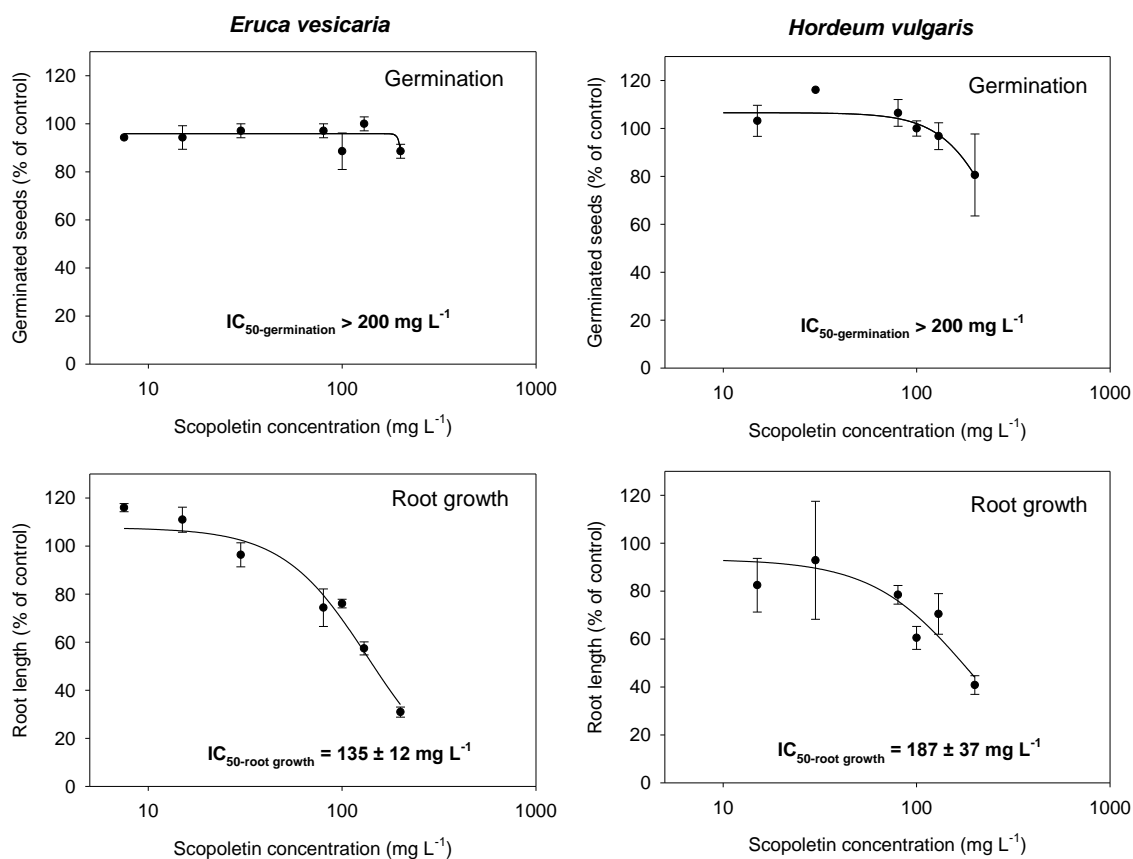


Fig S3 Dose-response curves of scopoletin on *Eruca vesicaria* and *Hordeum vulgare* obtained in Petri dishes after 7 days. Data represent experimental percentages of germination and root length compared to the control, whereas lines are the log-logistic 3-parameter fits

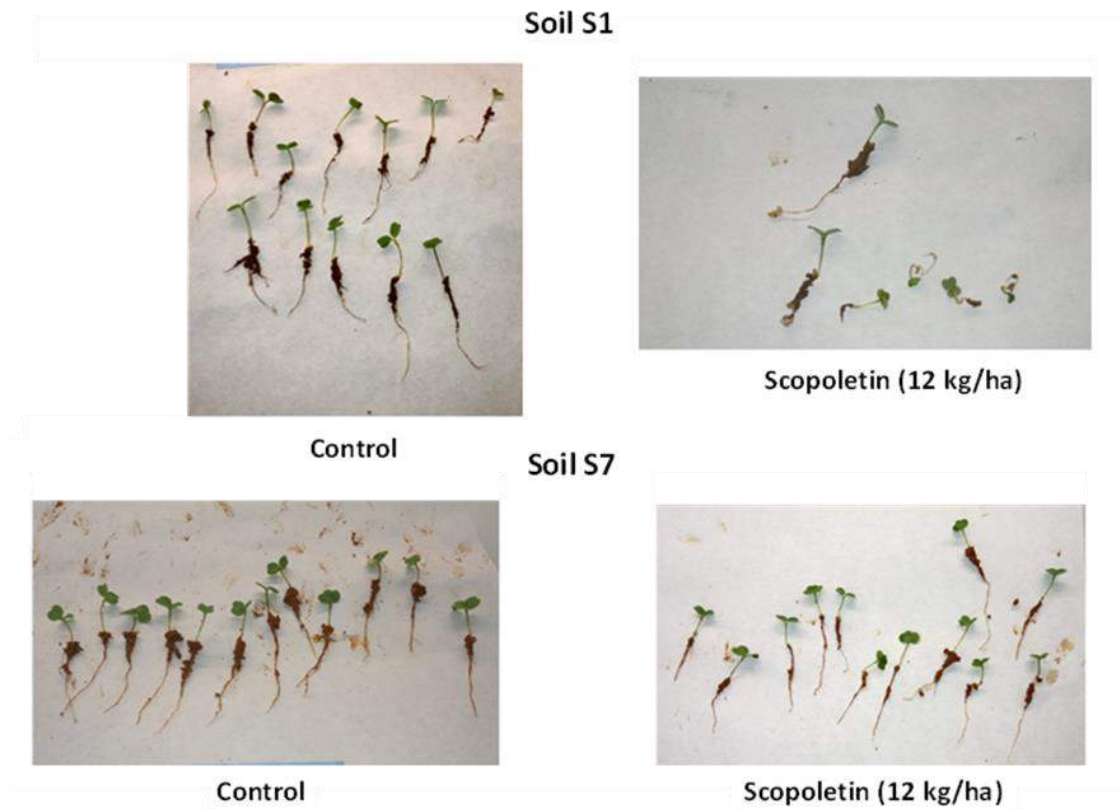


Fig S4 Phytotoxic effect of scopoletin on *Eruca vesicaria* after its application at 12 kg ha⁻¹ to soil S1 (top) compared to the lack of effect observed after its application to soil S7 (bottom)

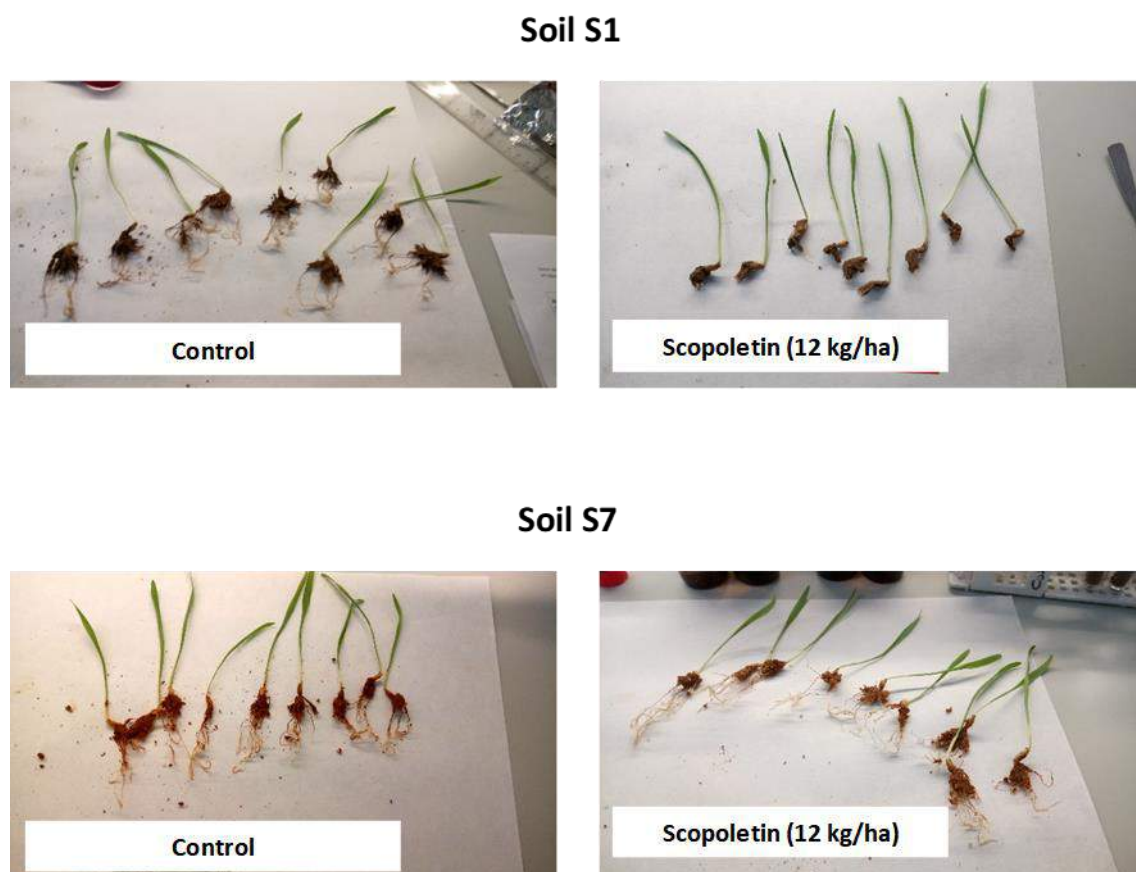


Fig S5 Inhibitory effect of scopoletin on root growth of *Hordeum vulgare* after its application at 12 kg ha⁻¹ to soil S1 (top) compared to the lack of effect observed after its application to soil S7 (bottom)

V.2. Artículo II

Título: Soil modification with organic amendments and organo-clays: Effects on sorption, degradation, and bioactivity of the allelochemical scopoletin

Autores: José Antonio Galán-Pérez, Beatriz Gámiz*, Rafael Celis

Afiliación: *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain*

Revista: Journal of Environmental Management



Editores: Raf Dewil, Jason Evans, Lixiao Zhang

Editorial: Elsevier **Categoría:** Environmental Sciences

Factor de Impacto (JCR 2021): 8.910 **Cuartil:** Q1 (34/279)

Volumen: 302 **Artículo:** 114102 **Año de publicación:** 2022

Cita:

GALÁN-PÉREZ J.A., GÁMIZ B., CELIS R.

Soil modification with organic amendments and organo-clays: effects on sorption, degradation, and bioactivity of the allelochemical scopoletin. *Journal of Environmental Management*, 302, 114102 (2022).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114102>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman

Soil modification with organic amendments and organo-clays: Effects on sorption, degradation, and bioactivity of the allelochemical scopoletin

José A. Galán-Pérez, Beatriz Gámiz^{*}, Rafael Celis

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNASA), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012, Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Allelochemicals
Biochar
Biochar/clay
Hydroxyoctanoic acid
Organic matter
Phytotoxicity

ABSTRACT

We assessed the effect of three organic amendments and two organo-clays on sorption, persistence, and phytotoxicity of scopoletin, an allelochemical compound with potential as bioherbicide, in a Mediterranean alkaline soil. The aim was to elucidate whether the phytotoxicity of scopoletin could be expressed better in amended than unamended soil. The three organic amendments were fresh solid olive-mill waste (OMW), composted solid olive-mill waste (OMWc), and biochar (BC) prepared from OMW. The two organo-clays were a commercial organo-simonsorbite (Clo10) and lab-synthesized oleate-modified hydrocalcite (HT-OLE). The amendments enhanced sorption of scopoletin by the soil consistently with their individual affinities for the allelochemical: Clo10 > OMW > BC > OMWc > HT-OLE. The soil persistence of scopoletin increased significantly because of the addition of Clo10, OMW, and BC. This increase was attributed to a combination of sorption, which protected the allelochemical from rapid biodegradation, and microbial activity changes. Although the inhibitory effect produced by the amendments themselves obscured the phytotoxicity of scopoletin to *Lactuca sativa* L. in soil treated with OMW and Clo10, applying scopoletin to BC-amended soil led to a marked reduction in root length and aerial biomass of the emerged seedlings, even though BC alone did not negatively affect these parameters. This inhibitory effect of scopoletin in BC-amended soil was in contrast to the negligible effect exerted by the allelochemical when applied to unamended soil. The results show that soils treated with suitable amendments, such as BC, might provide a scenario in which the herbicidal properties of 7-hydroxyoctanoic acids could be better expressed.

1. Introduction

The current dependence on synthetic pesticides as essential tools for crop protection may represent a threat to the sustainability of food production in the near future, as the need to increase crop yields will probably lead to an intensification in pesticide use. New strategies to protect crops from pests, diseases, and weeds with reduced reliance on synthetic pesticides are needed. In particular, the implementation of crop protection strategies based on low-risk, natural compounds would contribute to reducing the impacts of agriculture on ecosystems and adverse effects on human health (Duke et al., 2019).

In agricultural and natural ecosystems, certain biochemicals released by plants can positively or negatively influence the development of neighboring organisms through the phenomenon known as allelopathy. Of these biochemicals (allelochemicals), those that are released to suppress or eliminate neighboring competing plant species display potential for weed control and are receiving much attention as a source of

environmentally friendly, natural herbicides (Carolan et al., 2016; Li et al., 2019; Macías et al., 2019). Nevertheless, even representing a realistic opportunity for sustainable weed control, the application of allelochemicals as natural herbicides still requires particular efforts to overcome the problems associated with the short environmental half-lives and inconsistent field performance these compounds commonly present in agricultural systems (Chinchilla et al., 2015; Carolan et al., 2016). The development of strategies to tackle these problems is considered a research goal that should encourage their commercialization and use.

Soil modification with inorganic or organic amendments can impact the behavior of pesticides in soil. Although the primary purpose of adding organic amendments to agricultural soils is increasing the soil fertility, this practice often increases adsorption and reduces the mobility of pesticides, and can also accelerate or delay their biodegradation depending on the physicochemical characteristics of the pesticide, the nature of the amendment, and the soil type (López-Figueroa

^{*} Corresponding author.

E-mail address: bgamiz@iransa.csic.es (B. Gámiz).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114102>

Received 10 August 2021; Received in revised form 19 October 2021; Accepted 10 November 2021

0304-4297/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

et al., 2013; Vaziri et al., 2019). Inorganic amendments and organo-mineral complexes, such as organo-clays and similar nano-engineered sorbents, have also been shown to impact the persistence and mobility of pesticides in soil both in the laboratory and the field (Gámez et al., 2016, 2018; Huang et al., 2017; López-Gabasa et al., 2019; Rodríguez-Cruz et al., 2007). The manipulation of agroecosystems through the addition of soil amendments, including designer soil amendments, could be a useful strategy to increase the bioactivity of allelochemicals by influencing their sorption and degradation in the soil.

Coumarins are a family of naturally occurring compounds that, because of their fungicidal, bactericidal, insecticidal, nematocidal, and herbicidal properties, have been postulated as possible allelochemicals. A C7 hydroxyl group in the coumarin structure seems to contribute significantly to the herbicidal activity of this family of compounds (Fry et al., 2015). Accordingly, 7-hydroxycoumarins, such as umbelliferone, esculetin, and scopoletin, have received interest as eco-friendly herbicides. Gámez et al. (2017), for instance, observed that scopoletin, one of the most common coumarins in higher plants, displayed a strong phytotoxicity on *Arabidopsis thaliana* seedlings, and Fernández-Aparicio et al. (2013) showed its herbicidal activity towards the parasitic weed *Orobancha crenata*. These results confirmed earlier studies reporting the inhibition of various weed and crop species by scopoletin (Einhellig et al., 1970; Fry and Duke, 1977; Galán-Pérez et al., 2021).

In a previous paper, we characterized the sorption and degradation of scopoletin in soils with different characteristics and showed that the low sorption and short persistence scopoletin displayed in alkaline soils hindered the expression of its herbicidal activity by inducing a rapid depletion of its solution concentration (Galán-Pérez et al., 2021). Based on the effects organic and inorganic amendments can exert on the retention and persistence of pesticides and allelochemicals in soils (Gámez et al., 2021; Real et al., 2019; Zhong et al., 2019), here we hypothesized that the addition of organic amendments and organo-clay complexes could alter the bioavailability of scopoletin in alkaline soils and potentiate the expression of its herbicidal activity. Thus, the objectives of this paper were: i) evaluate the effects of three organic amendments and two organo-clays on sorption and persistence of scopoletin in an alkaline agricultural soil and ii) establish a link between the changes in sorption and persistence produced by the amendments and the phytotoxic activity of scopoletin in the soil. The ultimate goal was to elucidate whether amended alkaline soils could represent a scenario in which the herbicidal activity of hydroxycoumarins may become potentiated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The soil (sandy clay loam) was collected (0–20 cm) from an agricultural farm located in southern Spain (37°16′54.5″ N 6°07′59.0″ W) and was air-dried and sieved (2 mm) before use. The soil texture was determined by the hydrometer method (Gee and Bauder, 1966), and the pressure calimeter method and dichromate oxidation were used to determine the carbonate and organic carbon content, respectively (Nelson and Sommers, 1992; Nelson, 1992). Soil pH was measured in a 1 g:2.5 mL soil:water suspension. The soil analysis resulted in 74.0% sand, 5.9% silt, 20.1% clay, < 0.5% CaCO₃, 0.34% organic carbon, and pH of 8.4.

The three organic amendments used were fresh solid olive-mill waste (OMW), composted solid olive-mill waste (OMWc), and biochar (BC) obtained by pyrolysis of OMWc. OMW is the (solid) residue produced in the olive-oil extraction two-phase technology, whereas OMWc resulted from composting a fresh OMW for about 150 days. Samples of OMW and OMWc were supplied by processing factories located in southern Spain and were both air-dried and ground (2 mm) before use. The sample of biochar (BC) was obtained by heating OMWc (400 °C, 4 h) within a tubular furnace under a N₂ flow (1.5 L/min). The carbon contents of

OMW, OMWc, and BC were 46.4, 28.6, and 23.0%, respectively (Supplementary Table S1). Their nitrogen content and pH are also included in Supplementary Table S1.

The two organo-clays used in the experiments were a commercial organo-montmorillonite, Cloisite 10 A (Clo10), and a lab-synthesized organo-hydrotalcite (HT-OLE). Cloisite 10 A (BYK Additives & Instruments) was supplied by Cominex S.A. (Spain) and is a commercial organic clay (basal spacing value = 1.92 nm) obtained by modifying sodium montmorillonite (Cloisite® Na⁺ MMT, CEC = 92.6 cmol/kg) with dimethyl, benzyl, hydrogenated tallow quaternary ammonium cations at a concentration of 1.25 cmol of organic modifier per kg of clay (Supplementary Fig. S1). The elemental analysis of Clo10 yielded C and N contents of 27.0% and 1.13%, respectively (Supplementary Table S1), which were very close to the values of 27.1% C and 1.21% N expected from the organic cation loading of 1.25 cmol/kg clay reported by the manufacturer. The sample HT-OLE was prepared in our laboratory through the reconstruction method typically used to prepare organo-hydrotalcites (Castejón et al., 2006), following the steps detailed in Gámez et al. (2016). Briefly, 50 g of commercial Mg/Al hydrotalcite supplied by Sigma-Aldrich (Spain) was calcined (500 °C, 2 h) and then added to 75 g of sodium oleate (Sigma-Aldrich, Spain) pre-dissolved in deionized water (1500 mL) at 60 °C. The suspension was stirred (24 h at 60 °C), filtered (0.45 µm), and the solid obtained was oven-dried at 60 °C to produce the sample of oleate-modified hydrotalcite (HT-OLE). The elemental analysis of HT-OLE yielded a C content of 29.5% (Supplementary Table S1) and its basal spacing value, determined by X-ray diffraction, was 3.40 nm (Supplementary Fig. S1).

Analytical grade scopoletin with a purity >99.0% was supplied by Merck (Spain). Scopoletin (molecular mass = 192.2 g/mol) has a pK_a of 7.4 and a solubility in water of ca. 230 mg/L (Galán-Pérez et al., 2021; Retail et al., 2001). A stock solution (200 mg/L) prepared in methanol was used to obtain the scopoletin standards for the chromatographic analyses and the initial solution used in the sorption experiments conducted at a concentration of allelochemical of 2 mg/L. The working solutions of scopoletin used for the sorption isotherm and dissipation experiments and the bioassays conducted in Petri dishes were made from a stock solution (200 mg/L) prepared in water. A scopoletin solution of 12000 mg/L prepared in acetone was used in the bioassay conducted in soil pots.

2.2. Sorption study

The sorption of scopoletin on the sorbent materials (organic amendments and organo-clays) and on samples of non-amended and amended soil was determined by the batch equilibration methodology using 15 mL-glass centrifuge tubes. In triplicate, a 2 mg/L scopoletin aqueous solution (8 mL) was added to aliquots of the sorbent materials (40 mg), non-amended soil (1 g), or soil (1 g) amended with the sorbents (40 mg). The amount of sorbent added to the soil (40 mg/g soil) was equivalent to a field dose of 50 Mg/ha, assuming a 0–10 cm incorporation depth and a soil density of 1.3 g/cm³. To avoid biodegradation losses of scopoletin, the tubes with non-amended and amended soil were subjected to 3 autoclaving cycles (20 min at 120 °C and 200 kPa) on consecutive days before the sorption experiment. After adding the initial solution of scopoletin, the tubes were shaken (24 h), centrifuged (2000 × g, 10 min), and then an aliquot of supernatant phase (6 mL) was removed, diluted with methanol (6 mL), filtered (0.45 µm), and finally analyzed by HPLC, to measure the aqueous concentration of scopoletin, C_a (mg/L). A schematic representation of the methodology used for the sorption experiment is provided in Supplementary Fig. S2. The amount of scopoletin sorbed, C_s (mg/kg), was obtained by subtracting the equilibrated (C_a) aqueous concentration of scopoletin from its initial concentration (C₀) as:

$$C_s = \frac{C_0 - C_a}{M} \times V \quad (1)$$

where V is the volume (L) of initial solution added and m the mass (kg) of solid. The scopoletin initial solution shaken (24 h) in control tubes did not reveal significant losses of allelochemical.

The scopoletin distribution coefficient (L/kg) on each sorbent sample was calculated as:

$$K_d = \frac{C_s}{C_e} \quad (2)$$

and the sorption percentage as:

$$\%Ads = \frac{C_{in} - C_e}{C_{in}} \times 100 \quad (3)$$

For the sorbents that displayed the greater affinity for scopoletin (OMW, BC, and Clo10), the sorption study was extended to initial concentrations in the range 1–20 mg/L to obtain the corresponding sorption isotherms. These were fit to the Freundlich model:

$$C_s = K_f \times C_e^{1/n_f} \quad (4)$$

and the Freundlich constants (K_f and $1/n_f$) were calculated.

Sorption reversibility was evaluated by conducting a single extraction step with methanol immediately after measuring sorption at the concentration of 2 mg/L. To this aim, the supernatant solution which was removed for the sorption analysis (6 mL) was replaced with 8 mL of methanol. The suspensions were re-shaken (24 h), centrifuged, filtered, and the concentration of scopoletin in the extracts (C_{ext}) was determined. The amount of allelochemical desorbed (mg/kg) was calculated and expressed as percentage of that initially sorbed (%Des).

2.3. Dissipation experiment

Samples of 1 g of soil, non-amended or amended with 40 mg of the sorbents, were placed in 15 mL glass centrifuge tubes and treated with 300 μ L of an aqueous solution of scopoletin (30 mg/L) to achieve an allelochemical application dose of 9 mg/kg and a soil water content of 30%. The tubes were closed with screw caps and incubated in the dark at 25 ± 1 °C. Independent triplicate tubes were prepared to be removed from the incubator at $t = 0, 0.3, 1, 2, 3, 4,$ and 7 days and immediately frozen at -18 °C to be subsequently extracted with a methanol:10 mM *o*-phosphoric acid aqueous solution (9 + 1 by volume) mixture (8 mL), as described in Galán-Pérez et al. (2021). This extraction procedure led to recoveries >85% of the allelochemical applied to non-amended or amended soil samples.

Experimental scopoletin dissipation data were fit by a first-order kinetic equation:

$$C = C_0 \times e^{-t/d} \quad (5)$$

where C and C_0 are the concentrations of allelochemical in soil (mg/kg) at time t (d) and time zero, respectively, and the soil half-lives (d) for scopoletin were calculated ($t_{1/2} = 0.693/d$).

2.4. Soil respiration measurements

The effect of the sorbents on the soil respiration was studied using the trapping-titrimetric procedure (Ziklakis, 1994). The experiment was conducted in duplicate using 30 g of soil, untreated or treated with the sorbents at a rate of 40 mg/g. For the soil treated with OMW, the amount of soil had to be reduced to 10 g because the measured respiration was very high. The soil samples were placed in Erlenmeyer flasks containing a vial with 0.2 M NaOH (20 mL) to trap the released CO₂ and form carbonate through an acid-base neutralization. Next, the soil moisture content was adjusted (30%) and the flasks were closed hermetically and incubated at 25 °C for one week. For the soil amended with OMW, the NaOH vials were changed and back-titrated at $t = 2, 4,$ and 7 days,

whereas for the rest of the samples they were titrated at $t = 7$ days. The back-titration methodology and the procedure used to calculate the amount of CO₂ released by the soils are detailed in Giménez et al. (2019).

2.5. Bioassays

We determined the scopoletin mean inhibitory concentration (IC₅₀) value for root growth of *Lactuca sativa* L. by obtaining the dose-response curve in Petri-dishes. Twelve seeds of *Lactuca sativa* (Vilmorin, France) were placed in Petri dishes (diameter = 9 cm) containing a layer of filter paper, and next, aqueous solutions of scopoletin (6 mL) at concentrations ranging between 0 and 200 mg/L were added in triplicate. The dishes were sealed and placed in a germination room at 25 °C under a 16:8-h light:dark photoperiod. After one week, the number of germinated seeds and their root lengths were measured and expressed as percentages of the values obtained for the control. A log-logistic equation was used to obtain the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of scopoletin for root growth of the tested seed according to the expression (Gassfeldt et al., 1995):

$$y = \frac{y_0}{1 + (x/x_0)^b} \quad (6)$$

where y and y_0 are the root lengths (% of the control) at a specific concentration (x) of scopoletin (mg/L) and at $x = 0$, respectively.

Soil bioassays were conducted in triplicate using plastic pots (20 cm² surface and 5 cm height) containing 20 g of soil over 30 g of sea sand. The soil was either non-amended or amended with OMW, BC, or Clo10 at 40 mg/g soil. Next, the pots were treated with 200 μ L of a 12000 mg/L scopoletin solution prepared in acetone plus 6 mL of water, to yield an allelochemical application rate of 12 kg/ha and a water content of 30%. Under these conditions, scopoletin had previously been found to control dicotyledonous model plant species in an acid soil but not in an alkaline soil (Galán-Pérez et al., 2021). The amount of acetone added evaporated rapidly and did not have any effect on either germination or growth of the tested plant. Immediately after the application of scopoletin, twelve seeds of *Lactuca sativa* were sown and the pots were placed in the germination room for one week. The soil water content was corrected to the initial value (30%) every day. After one week, the number of germinated seeds, their root lengths, and the aerial biomass of the emerged seedlings were determined and expressed as percentages of the values obtained for control pots without scopoletin but otherwise treated identically.

The total amount of scopoletin remaining in the soil at the end of the bioassay was determined by extraction of 3 g of soil with a methanol:10 mM *o*-phosphoric acid aqueous solution (9 + 1 by volume) mixture (8 mL), as described in section 2.3 for the dissipation experiment. Additional three replicates were used to determine the concentration of scopoletin present in the soil's solution phase (i.e., in a bioavailable form) just after application of the allelochemical to the soil pots and also at the end of the bioassay. To this aim, an aliquot of ca. 10 g of soil was placed in a Macrosep® Advance Centrifugal tube (Pall Corp., USA) containing a polyether sulfone (PES) membrane (0.45 μ m), centrifuged (12000 \times g, 10 min), and the filtrate was collected and analyzed (HPLC) to determine the concentration of scopoletin.

2.6. Analysis of scopoletin

The analysis of scopoletin was carried out by HPLC under the conditions detailed in Galán-Pérez et al. (2021). Based on earlier storage stability tests, aqueous soil extracts of scopoletin were either analyzed immediately or within less than 1 week after being stabilized by the addition of methanol to obtain a 50:50 soil extract:methanol mixture (Galán-Pérez et al., 2021).

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out with SigmaPlot 14.5 for Windows. Variability among replicates are indicated by standard errors. Sorption-desorption, dissipation, and phytotoxicity data were analyzed using one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's HSD test to establish statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Sorption of scopoletin by the sorbents

The sorption distribution coefficients (K_d) of scopoletin on the sorbents, measured at an initial concentration of 2 mg/L, decreased in the following order: Cloi10 > OMW > BC > OMWc > HT-OLE (Table 1). For the sorbents displaying the highest affinity for scopoletin (Cloi10, OMW, and BC), sorption isotherms (1–20 mg/L) confirmed the sorption behavior observed at a single initial concentration of allelochemical of 2 mg/L (Fig. 1, Supplementary Table S2). For these sorbents with relevant affinities for scopoletin, sorption displayed a high reversibility, as more than 80% of the allelochemical was recovered by a single desorption step with methanol (Table 1). Consequently, weak interaction mechanisms appeared to operate in the sorption of scopoletin on Cloi10, OMW, and BC.

The two organoclays (Cloi10 and HT-OLE) greatly differed in their affinity for scopoletin. This can be explained by their structural characteristics and the key role of pH on the sorption of the allelochemical (Galán-Piña et al., 2021). At the pH measured for its equilibrated suspension with Cloi10 (pH = 7.6, Table 1), the anionic and molecular form of scopoletin ($pK_a = 7.4$) coexisted in solution, allowing hydrophobic interactions between the allelochemical and the alkyl chains of the organoclay as well as electrostatic interactions with positively charged quaternary ammonium groups of the organic modifier (Supplementary Fig. S1). Besides the alkyl moieties, it is well known that quaternary ammonium groups represent important sites for the sorption of organic anions on organoclays (Neal et al., 2019; Zhao et al., 1996) and the presence of the organic modifiers at a concentration exceeding the CEC of the clay in Cloi10 probably increased the number of these sites available for sorption. As for HT-OLE, the low sorption observed can be attributed to repulsions between scopoletin anions, predominating at the high pH value of the suspension (pH = 10.1, Table 1), and the olefinic moieties at the external surfaces of HT-OLE. It has previously been reported that upon amendment with OLE the HT surface changes from positively to negatively charged, which greatly reduces its affinity for anionic organic compounds by preventing their approach to the organo-clay surface (Galán et al., 2014).

The organic amendments (OMW, OMWc, BC) also differed in their affinity for scopoletin (Table 1). In general, sorption of organic acids by organic matter (OM) is favored at pH levels below their pK_a , as

Table 1
Sorption and desorption parameters for scopoletin on organic amendments and organo-clays.

Sample	Sorption ^a		Desorption		
	%Ads	K_d (L/kg)	$K_{d,des}$ (L/kg)	pH	%Des
Organic amendments					
OMW	25.2 ± 2.3 ^b	67.9 ± 0.5	140	5.2	113.0 ± 2.8
OMWc	6.2 ± 0.7	13.3 ± 1.6	47	8.8	n.d. ^c
BC	19.0 ± 1.3	47.1 ± 3.9	209	8.3	89.2 ± 0.7
Organo-clays					
HT-OLE	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.4	48	10.1	n.d.
Cloi10	>98	>10000	>97000	7.6	88.2 ± 2.4

^a Measured at an initial concentration of scopoletin of 2 mg/L.

^b Mean ± standard error (n = 3).

^c Not determined because of very low sorption.

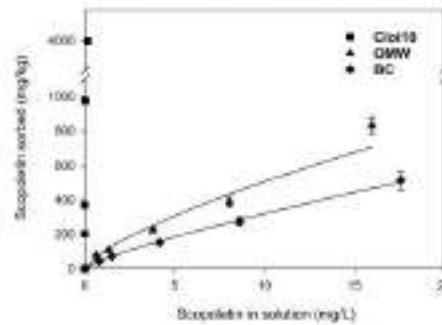


Fig. 1. Scopoletin sorption isotherms on Cloi10, OMW, and BC.

repulsions with negatively charged OM functional groups are minimized and hydrophobic partitioning is favored (Fah and Brown, 2006). This is consistent with the higher sorption of scopoletin on OMW (acidic) compared to OMWc and BC (alkaline) observed in this study (Table 1). Interestingly, whereas compositional changes upon composting, particularly the loss of labile, water-soluble phenolics and associated pH increase (Chowdhury et al., 2013), reduced the affinity of scopoletin for the olive-mill waste, pyrolysis of OMWc allowed some recovery of the sorptive properties of the material (Table 1). Pyrolysis of biomass leads to an increase in aromatic carbon, loss of surface polar functionalities, and development of microporosity (Xiao et al., 2010), which improved the affinity of BC for scopoletin compared to its feedstock material (OMWc). In fact, expressing the sorption distribution coefficients on a carbon content basis (K_{oc}) revealed that the organic C in BC could have displayed a higher affinity for scopoletin than that of OMWc and even OMW (Table 1).

3.2. Sorption of scopoletin on unamended and amended soil

The alkaline soil selected for this study had a low affinity for scopoletin ($K_d = 0.38$ L/kg, Table 2). Previous studies have reported low sorption of hydroxycoumarins by alkaline soils because anionic hydroxycoumarin species predominating at alkaline pH levels typically

Table 2
Sorption and desorption parameters for scopoletin on unamended and amended soil.

Sample	Sorption ^a		Desorption	
	%Ads	K_d (L/kg)	$K_{d,des}$ (L/kg)	pH %Des
Soil	4.5 ± 0.5 ^b	0.38 ± 0.04	0.38	8.4 88.6 ± 21.5
Soil + Organic amendments				
Soil + OMW	34.9 ± 1.8	8.14 ± 0.29	2.98	7.9 87.0 ± 0.9
Soil + OMWc	11.4 ± 0.4	0.99 ± 0.04	0.08	6.3 76.0 ± 1.7
Soil + BC	16.7 ± 0.9	1.54 ± 0.10	2.18	6.6 81.3 ± 1.6
Soil + Organo-clays				
Soil + HT-OLE	<2	<0.15	0.08	9.1 n.d. ^c
Soil + Cloi10	94.8 ± 1.7	44.6 ± 2.6	>985	6.4 84.0 ± 0.2

^a Measured at an initial concentration of scopoletin of 2 mg/L.

^b $K_d-cal = K_d-soil \times 0.96 + K_d-sorbent \times 0.04$, where K_d-soil and $K_d-sorbent$ are the individual K_d values measured for scopoletin on the soil and pure sorbent, and 0.96 and 0.04 correspond to the fraction of soil and sorbent in the mixture, respectively.

^c Value ± standard error (n = 3).

^d Not determined because of very low sorption.

soil to soil particles to a lesser extent than neutral species. Beal et al. (2019), for example, studied the sorption of umbelliferone on seven agricultural Mediterranean soils and found that sorption was noticeable only on acid soils, whereas alkaline soils yielded K_d values < 0.5 L/kg. Galán et al. (2021) observed that scopoletin sorption on alkaline soils was also very limited, particularly when the alkaline soils were also poor in fine (silt/clay) constituents.

The addition of the organic amendments and organo-clays altered the sorption of scopoletin by the soil (Table 2). In general, the sorbents enhanced sorption of scopoletin consistently with their individual affinities for the allelochemical: Clo10 > OMW > BC > OMWc > HT-OLE. The increase in K_d produced by the addition of organic amendments and organo-clays to the soil was up to 10-fold for OMW and 100-fold for Clo10. On the other hand, most of the allelochemical (>75%) was desorbed by a single desorption step with methanol (Table 2), revealing that the reversibility of scopoletin sorption observed for the pure sorbents remained for the amended soil.

Along with the experimental K_d values obtained for the amended soil samples, Table 2 also includes the expected values of K_d ($K_{d,add}$) calculated assuming independent and linear sorption of scopoletin on the two constituents of the mixture (Gómez et al., 2010; Beal et al., 2019; Rodríguez-Cruz et al., 2007; Voudrias, 2002). The increase in sorption produced by BC, HT-OLE, and Clo10 was less pronounced than expected from the individual sorption constants of the mixture constituents (Table 2). This indicated that BC and the organo-clays lost some of their sorption performance in the presence of the soil. Most likely, the interaction between BC and the organo-clays with soil constituents resulted in competition with scopoletin for sorption sites (or blockage of access to such sorption sites), which reduced their performance as sorbents of scopoletin. The effect was particularly pronounced for Clo10, a behavior that agrees with the strong loss in sorptivity shown by other organo-clays upon their addition to soils (Gómez et al., 2010). Conversely, mixing the soil with OMW and OMWc had little effect (OMWc) or synergistically enhanced (OMW) the sorption of scopoletin (Table 2). It is known that the soluble organic matter of OMW can interact with soil particles either blocking surfaces or creating new ones (organic matter coatings) available for pesticide sorption depending on the particular soil-pesticide system considered (Gelin et al., 1997; Cox et al., 2000, 2007). Generation of new sorption sites could have predominated in our soil-OMW system, enhancing the originally poor sorption of scopoletin on the pristine soil surfaces.

3.3. Effect of the amendments on scopoletin dissipation

Scopoletin displayed a very short persistence in the tested soil ($t_{1/2} = 0.38$ d) (Fig. 2, Table 3). One day after treatment, the soil concentration of scopoletin had decreased to a non-detectable level (Fig. 2). This result is in agreement with our previous findings showing that, under similar experimental conditions, the dissipation of scopoletin in non-sterilized soil samples was rapid ($t_{1/2} < 3.5$ days), with the allelochemical displaying a particularly short persistence ($t_{1/2} < 1$ day) in scarcely sorptive, alkaline soils (Galán-Pérez et al., 2021). Microbial degradation appeared to be the principal mechanism responsible for the rapid dissipation of scopoletin, as more than 85% of the initial amount of the allelochemical remained after seven days of incubation when the soil samples were pre-sterilized (Galán-Pérez et al., 2021).

The addition of the amendments altered the scopoletin dissipation patterns to an extent that depended on the amendment (Fig. 2). Thus, while the dissipation curves of scopoletin in soil amended with OMWc or HT-OLE were very similar to that measured in unamended soil, the soil persistence of the allelochemical increased significantly by the addition of OMW, BC, or Clo10. The fact that these amendments were those providing the largest increase in scopoletin sorption by the soil indicated that sorption could have provided the allelochemical with some protection from microbial degradation (Báum, 1990; Balazs, 2005). However, as the amendments also impacted the soil respiration (Fig. 3),

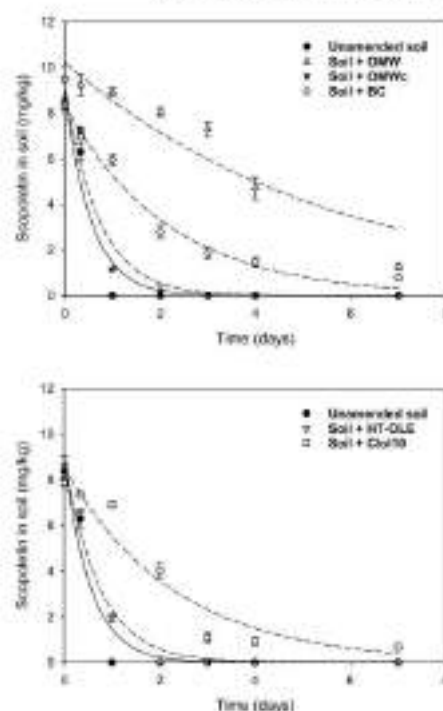


Fig. 2. Scopoletin dissipation curves in unamended and amended soil samples. Symbols represent experimental data points (means and standard errors for $n = 3$), whereas lines are the first-order dissipation fit.

Table 3

Single first-order dissipation constants (k_d) and half-lives ($t_{1/2}$) for scopoletin in unamended and amended soil samples.

Sample	C_0 (mg/kg)	k_d (days ⁻¹)	$t_{1/2}$ (days)	R^2
Unamended soil	Soil	0.9 ± 0.9^a	1.015 ± 0.403	0.20
	Soil + Organic amendments			
Soil + OMW	10.2 ± 0.7	0.179 ± 0.031	3.67	0.659
Soil + OMWc	9.2 ± 0.0	1.390 ± 0.322	0.50	0.952
Soil + BC	0.4 ± 0.4	0.463 ± 0.041	1.50	0.990
Soil + Organo-clays				
	Soil + HT-OLE	0.9 ± 0.5	1.255 ± 0.101	0.51
Soil + Clo10	0.5 ± 0.7	0.492 ± 0.006	1.59	0.929

^a Value \pm standard error.

an additional effect of the amendments on the activity or preference of soil microorganisms to degrade scopoletin cannot be discarded. OMW, for example, increased the persistence of scopoletin to a greater extent than Clo10 (Fig. 2, Table 3) despite being ten times less effective ($K_d = 4.14$ L/kg) than the organo-clay ($K_d = 44.6$ L/kg) in increasing the sorption of the allelochemical (Table 2). It is known that fresh OMWs contain easily degradable, low molecular weight organic constituents that represent a readily available form of C for soil microorganisms (Cox et al., 2000; Reguá et al., 2017). Rapid mineralization of OMW constituents, as reflected by the high respiration value measured for the OMW-amended soil sample (Fig. 3), could have delayed the degradation of scopoletin in the OMW-amended soil by the preferential use of OMW as a C source by soil microorganisms (Gómez et al., 2013; Beal et al., 2021). A combination of sorption and microbial activity changes could thus have determined the overall effect of the amendments observed in

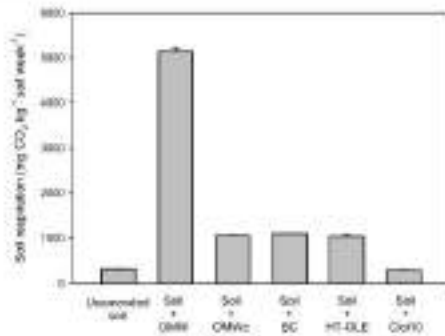


Fig. 3. Soil respiration values (means and standard error for $n = 3$) for unamended and amended soil samples.

Fig. 7.

3.4. Effect of the amendments on the expression of scopoletin phytotoxicity in soil

The phytotoxicity of scopoletin to *Lactuca sativa* was first assessed by a dose-response experiment conducted in Petri dishes. In this experiment, the allelochemical did not affect germination of *Lactuca sativa* seeds, but inhibited radicle elongation (Fig. 4). The mean inhibitory concentration (IC_{50}) was 57 ± 12 mg/L, that is, between the IC_{50} values of 9.6 and 11 mg/L previously reported for the inhibitory effect of this allelochemical on *Arabidopsis thaliana* and *Oryzanthus cresson* (Fernández-Aparicio et al., 2013; Gómez et al., 2017) and those of 135 and 187 mg/L we previously mentioned for *Eruca vesicaria* and *Hordeum vulgare* (Galán-Pérez et al., 2021).

In Galán-Pérez et al. (2021), we showed that the presence of soil had a marked effect on the expression of the phytotoxicity of scopoletin. Applied at 12 kg/ha, equivalent to a free concentration of 400 mg/L, the phytotoxicity of scopoletin to *Eruca vesicaria* and *Hordeum vulgare* was not expressed in alkaline soil because the allelochemical solution concentration was rapidly depleted by microbial degradation. This result was reproduced here when *Lactuca sativa* seeds were sown in alkaline soil treated with 12 kg/ha of scopoletin (Supplementary Fig. S3). Even though the dose of scopoletin applied corresponded to seven-fold the IC_{50} value for *Lactuca sativa*, no effect on root growth was observed and just a minor decrease in total biomass was identified in the soil pots treated with the allelochemical (Supplementary Fig. S3).

The effects of OMW, Clo10, and BC on the expression of the phytotoxicity of scopoletin in the soil are summarized in Fig. 5. To identify potential phytotoxic effects of the amendments, unamended and amended soil controls without scopoletin were prepared. Germination of *Lactuca sativa* was completely inhibited in OMW-amended soil

both untreated and treated with scopoletin. This result can be attributed to the presence of phytotoxic constituents (e.g., phenolics) in olive-mill wastes, which are known to have strong seed germination inhibitory effects (Andriawan et al., 2008). Even though scopoletin appeared to remain at phytotoxic levels in the OMW-amended soil pots during the bioassay (Table 4), its phytotoxicity was obscured by the strong inhibitory effect produced by the OMW constituents themselves.

The organo-clay, Clo10, did not affect germination of the *Lactuca sativa* seeds, but its addition to the soil led to a strong reduction in root length and aerial biomass of the germinated seedlings (Fig. 5). Similar to OMW, this effect obscured the possible inhibitory effect caused by scopoletin, which should have also remained in Clo10-amended soil at significantly higher concentrations than in unamended soil at the earlier stages of the experiment (Fig. 2, Table 4).

The outcomes of the bioassay with BC reflected a more conclusive pattern concerning the allelochemical's activity, because BC did not negatively affect germination, root growth, or aerial biomass of *Lactuca sativa* while the addition of scopoletin to BC-amended soil led to a marked reduction in root length and aerial biomass of the emerged seedlings. This result contrasted with the negligible effect exerted by the allelochemical when it was applied to unamended soil (Supplementary Fig. S3). Biochar has previously been shown decrease or increase the phytotoxicity of allelochemicals in soil depending on how it changed the allelochemical's soil persistence and bioavailable concentration (Gómez et al., 2021; Zhang et al., 2017). It appears that here BC increased the allelochemical's persistence (Fig. 3) while maintaining a bioavailability level (Table 4) that was sufficient for the allelochemical's activity to be expressed.

4. Conclusions

The addition of organic amendments and organo-clays altered the source sorption ($K_d < 0.5$ L/kg) and low persistence ($t_{1/2} < 0.5$ d) the allelochemical scopoletin displayed in a sandy clay loam Mediterranean soil. In general, the amendments increased sorption of scopoletin consistently with their individual affinities for the allelochemical, although the interaction between the amendments with the soil constituents provoked alterations in the sorption behavior of the two components of the mixtures. Sorption and microbial activity changes both appeared to contribute to increasing the persistence of the allelochemical in amended soil. This increase in persistence favored the expression of the phytotoxic activity of scopoletin in soil treated with certain amendments, such as biochar. Combining allelochemical-based weed control strategies with the addition of suitable soil amendments may represent a way of taking better advantage of the bioactivity of allelochemicals for eco-friendly weed control.

Credit author statement

José A. Galán-Pérez: Investigation, Formal analysis, Writing –

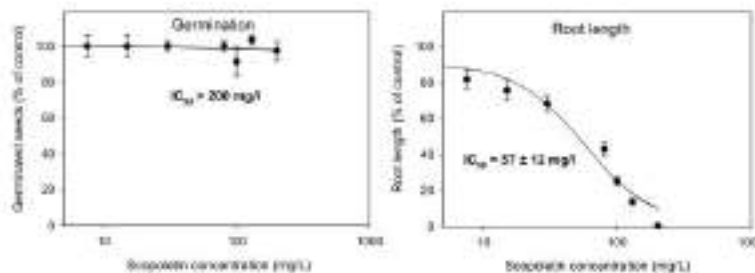


Fig. 4. Dose-response curves of scopoletin on *Lactuca sativa* obtained in Petri dishes after 7 days. Symbols represent experimental percentages of germination and root length of germinated seeds compared to the control (means and standard errors for $n = 5$), whereas lines are the log-logistic 5-parameter fit.

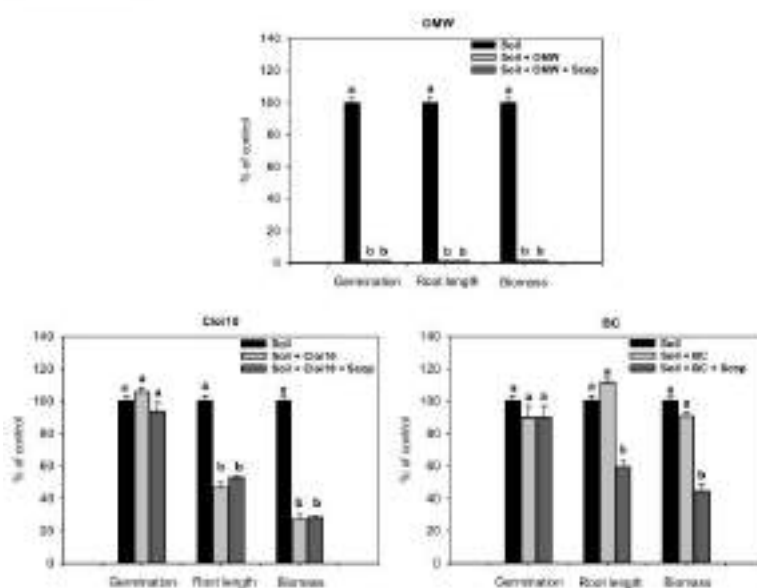


Fig. 5. Effect of scopoletin applied at 12 kg/ha to amended soil pots on germination, root length, and aerial biomass of *Lactuca sativa*. Data (means and standard errors for $n = 5$) correspond to 7 days after treatment and are expressed as percent of the value obtained for the unamended soil control. The effect of the amendments (without scopoletin addition) on germination, root length, and aerial biomass is also shown. Different letters indicate statistically significant differences between treatments.

Table 4

Total and solution concentrations of scopoletin at $t = 0$ and $t = 7$ days of the biomass in unamended and amended soil pots.

	Sample	Total ^a (µg/kg)	In solution ^b (µg/L)
$t = 0$	Unamended soil	120	79.3 ± 1.9
	Soil + OMW	120	37.8 ± 5.2
	Soil + BC	120	41.1 ± 8.1
	Soil + Clo16	120	1.3 ± 0.9
$t = 7$ d	Unamended soil	< LOQ ^c	< LOQ
	Soil + OMW	41.5 ± 5.8	20.4 ± 2.7
	Soil + BC	4.7 ± 0.9	< LOQ
	Soil + Clo16	1.4 ± 0.2	< LOQ

^a Total amount of scopoletin added ($t = 0$) and extracted at the end of the experiment ($t = 7$ d).

^b Concentration of scopoletin measured in the soil solution at the beginning ($t = 0$) and at the end ($t = 7$ d) of the experiment.

^c Below the limit of quantification.

original draft, Beatriz Giménez: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision, Rafael Celis: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCIN/AEI grant PID2020-112563RB-00) and Junta de Andalucía (JA grant P20-00746), with EU FEDER funds. J.A. Galán-Pérez also thanks MCIN/AEI for a pre-doctoral contract (grant PRE2019-003293) linked to project AGL2017-82141-B and cofinanced with FSE funds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114102>.

References

- Askegaard, K., Carrión, M., Di Simola, I., Le Gall, S., Marotta, S., Piro, G., Tullio, A., 2020. Effect of combined physico-chemical processes on the phytotoxicity of olive mill wastewater. *Water Res.* 42, 1694–1692. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.016>.
- Bian, U., 1995. Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. *J. Chem. Ecol.* 24, 685–703. <https://doi.org/10.1023/A:102234201540>.
- Celis, R., Adalberto, M.A., Giménez, B., Hernández, M.C., Koshman, W.C., Cornejo, J., 2014. Nanotoxicity of Mg/Al layered double hydroxide and long-chain (C18) unsaturated fatty acid anionic structures and sorption properties. *Appl. Clay Sci.* 96, 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.03.026>.
- Celis, R., Cox, L., Hernández, M.C., Cornejo, J., 1997. Sorption of herbicides by clay and layered silicate nanomaterials. *J. Environ. Qual.* 26, 473–479.
- Chavallita, N., María, D., Olivares-Barreda, A., Meléndez, J.M.G., María, P.A., 2015. Soil biodegradation of a benzoxazinone analog proposed as a natural product-based herbicide. *Plant Soil* 393, 207–214. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0463-6>.
- Cherubary, A.K.M.M.R., Akarso, C.S., Vayssan, D.Y., Finko, S., 2013. Olive mill waste composting: a review. *Int. Biodegrad. Biotechnol.* 95, 103–119. <https://doi.org/10.1016/j.ibi.2013.06.018>.
- Corfesa, S., Trödel, M., Weyman, S., Steinberg, C., Gullerud, J.P., 2018. Herbicide-tolerant in the control: A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protect.* 17, 44–63. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.07.016>.
- Cornejo, J., Celis, R., Fariñas, I., Urbani, M.A., 2006. Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review. *Clay Miner.* 41, 155–179. <https://doi.org/10.1186/claymin.2006.41.3.151>.
- Cox, L., Celis, R., Hernández, M.C., Cornejo, J., Zookay, A., Keller, E., 2008. Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Bioresour. Soil Technol.* 24, 4650–4655. <https://doi.org/10.1016/j.biosystec.2008.07.005>.
- Cox, L., Fernández, M.C., Zookay, A., Hernández, M.C., Cornejo, J., 2004. Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: effect on pesticide adsorption behavior. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5695–5697. <https://doi.org/10.1021/jf020822t>.
- Cox, L., Velasco, P., Celis, R., Fariñas, I., Hernández, M.C., Cornejo, J., 2007. Dissolved organic carbon interactions with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils. *Eur. J. Soil Sci.* 58, 714–721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2380.2006.00838.x>.
- Duke, S.O., Evidente, A., Vanzo, M., 2009. Natural products in pest management: innovative approaches for increasing their use. *Pest Manag. Sci.* 75, 2299–2306. <https://doi.org/10.1002/ps.2332>.

- Sheldahl, T.A., Blay, S.L., Rouse, P.G., Wenzel, S.H., 1979. Effects of azoxystrobin on growth, CO₂ exchange rates, and concentrations of azoxystrobin, spirodic, and chlorogenic acids in tobacco, cauliflower, and pigeonpea. *Soil. Vervey Soc. Camb* 97, 22–34.
- Sig, P.E., Duke, W.R., 1977. An assessment of allelopathic potential in seven grass plants. *Weed Res.* 25, 224–228. <https://doi.org/10.1017/S004317-0000000000>.
- Peralado-Aparicio, M., Castejón, A., Trubiano, A., Bakula, D., 2013. Inhibition of *Cyrtospora cruenta* seed germination and radicle growth by allelochemicals identified in *Secoia*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8747–8664. <https://doi.org/10.1021/jf401779g>.
- Gelín-Fernández, J.A., Ocaña, J., Gelín, K., 2021. Determining the effect of soil properties on the stability of azoxystrobin and its toxicity to target plants. *Soil. Fertil. Soils* 57, 645–655. <https://doi.org/10.1007/s00574-021-01756-2>.
- Gelín, K., Gelín, R., Herrero, M.C., Castejón, J., 2010. Azoxystrobin as soil amendment to increase its efficacy and reduce the environmental impact of the herbicide flumetsulfuron in agricultural soils. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7893–7901. <https://doi.org/10.1021/jf102746g>.
- Gelín, K., Ferrando, G., Gelín, R., 2018. Modulating the persistence and bioactivity of allelochemicals in the rhizosphere: salicylic acid, a case of study. *Arch. Agron Soil Sci.* 65, 361–369. <https://doi.org/10.1080/03603909.2018.1512102>.
- Gelín, K., López-Cabeza, R., Ferrando, G., Velasco, P., Herrero, M.C., Gao, L., Gelín, R., 2016. Effect of synthetic clay and biochar addition on desorption and crumblability of tebuconazole and azoxystrobin in an agricultural soil: laboratory and field experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 230, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.02.017>.
- Gelín, K., López-Cabeza, R., Velasco, P., Serrano, R.A., Gao, L., 2021. Biochar changes the bioavailability and bioactivity of the allelochemicals in agricultural soils. *Front. Plant Sci.* 12, 634–643. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634643>.
- Gao, L., Bradford, J., 1985. Phytolite-size analysis. In: Elz, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis*, Part 1. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 393–411.
- Guzón, E., Gómez-Gil, A., Lozano, S., Celada, M., Tejedor, M., Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A.M., 2017. Acid-like effects of the natural exudate scopoletin on *Aschalepis* cell structure and morphology. *J. Plant Physiol.* 218, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.007>.
- Huang, J., Jiang, C., Sheng, X., 2017. Effects of nano-SiO₂ on the adsorption of chlorpyrifos in agricultural soils. *Environ. Pollut.* 225, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.066>.
- Isaev, 2005. Soil microorganisms as important determinants of allelopathic activity. *Plant Soil* 274, 227–236. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0159-z>.
- Kak, M., Bhatia, C.D., 2006. Adsorption of ionizable pesticides in soils. *Rev. Environ. Contam. Technol.* 100, 140–217. <https://doi.org/10.1007/s10704-0-107-0296-4>.
- Kasai, M., Hatanaka, L., Kiyosaki, C., Yoshida, T., Shiba, H., 2001. Identification and determination of active components in *Angelica dahurica* roots and its medicinal preparation by capillary electrophoresis. *Talanta* 54, 755–761. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00027-7).
- Li, E.B., Anwar, M., Pui, L.Y., 2018. Allelopathy in sustainable weed management. *Allelopathy* 7, 45–109–118.
- López-Cabeza, R., Polgar, T., Castejón, J., Gelín, R., 2019. A clay-based formulation of the herbicide flumetsulfuron containing exclusively the biologically active enantiomer. *Front. Plant Sci.* 10, 1099–1061. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01099>.
- López-Pérez, A., Ferrín, D., Alhama, A., Becerra, D., Sánchez-Biosca, J., 2013. Sorption, leaching and persistence of azoxystrobin in Mediterranean soils amended with olive mill waste of different degrees of organic matter maturity. *J. Environ. Manag.* 122, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.006>.
- Molina, P.A., Mejías, F.A.R., Molinillo, J.M.G., 2019. Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Front. Plant Sci.* 10, 2413–2430. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01430>.
- Palmer, D., Stumm, L., 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page, A.L., Miller, M., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, Part 2. ASA, Madison, WI, pp. 1309–1320.
- Palmer, R., 1982. Carbons and oxygen. In: Page, A.L., Miller, M., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, Part 2. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 101–107.
- Pan, L., Li, X., Tian, Z., Gao, H., Qiu, B., 2015. Hysteresis of azoxystrobin and its analogs: structure-toxicity relationships and action mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* 97, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.020>.
- Pani, M., Ferrando, G., Gelín, K., 2021. Sorption and desorption of the allelochemicals azoxystrobin and salicylic acid in a Mediterranean soil and environment: effect of olive-mill waste addition. *Sci. Total Environ.* 774, 146027. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146027>.
- Pani, M., Ocaña, J., López-Cabeza, R., Gelín, K., 2018. Sorption, persistence, and leaching of the allelochemical azoxystrobin in soils treated with nanosized iron oxides. *Sci. Rep.* 9, 9794. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40831-z>.
- Pérez, L., Serrano, L., Serrano, A., Monzó, L., Aguiló, A., Prost, P., 2017. Long term association with fresh and composted cold olive mill waste on olive grove affects carbon sequestration by grasses, fruits, and soil. *Front. Plant Sci.* 7, 2042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02042>.
- Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martin, M.J., Aneliche, M.S., Sánchez-Cameros, M., 2007. Modification of clay minerals with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils. *J. Hazard Mater.* 146, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.042>.
- Sankhita, S.S., James, J.E., Foster, S.P., 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9, 219–227.
- Vajtai, S., Kovacs, G., Benc, E.R., 2019. Development in biochar application for pesticide remediation: current knowledge and future research directions. *J. Environ. Manag.* 231, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.11.045>.
- Vandier, C.A., 2002. The concept of a sorption chemical barrier for improving effectiveness of landfill liners. *Waste Manag. Res.* 20, 251–258. <https://doi.org/10.1177/073424200202000202>.
- Xiao, Y., Chen, B., Chen, Z., Wu, L., Schaefer, J.L., 2018. Insight into multiple and multilevel structures of biochars and their potential environmental applications: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 52, 5027–5047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04073>.
- Zhang, Z., Chen, L., Wang, J., Yao, J., Li, J., 2016. Biochar preparation from *Solidago canadensis* and its alleviation of the inhibition of tomato seed germination by allelochemicals. *Sci. Adv.* 3, 12378–12375. <https://doi.org/10.1098/rsadv.2016.0044>.
- Zhao, H., Jirassakuldech, M.F., Yoon, G.S., 1998. Sorption of the herbicide organic compound, fluralone (3-(4-chlorophenyl)-2-methylbutanoic acid), by organo-clays. *Chemosphere* 37, 2009–2100.
- Zilinski, L., 1984. Carbon mineralization. In: Weaver, R., Angle, S., Parton, D., Bertness, D., Smith, S., Tabataba, A., Walker, A. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. SSSA, Madison, WI, pp. 829–833.

Supplementary material for

Soil modification with organic amendments and organo-clays: effects on sorption, degradation, and bioactivity of the allelochemical scopoletin

José A. Galán-Pérez, Beatriz Gámiz*, Rafael Celis

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Seville, Spain

***Corresponding Author:** B. Gámiz

Address: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC

Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Seville, Spain

Phone: +34 954624711

E-mail: bgamiz@irnase.csic.es

Table S1. Properties of the organic amendments and organo-clays.

Sample	C (%)	N (%)	pH ^a
Organic amendments			
OMW	48.4 ± 0.2 ^b	1.52 ± 0.16	4.8 ± 0.1
OMWc	28.6 ± 0.2	2.38 ± 0.04	9.7 ± 0.1
BC	23.0 ± 0.8	1.33 ± 0.01	9.5 ± 0.1
Organo-clays			
HT-OLE	29.5 ± 0.2	< 0.05	10.1 ± 0.1
Cloi10	27.0 ± 0.1	1.13 ± 0.01	9.6 ± 0.1

^a Measured in a 40 mg:8 mL solid:water suspension.

^b Value ± standard error.

Table S2. Freundlich coefficients for scopoletin sorption on OMW, BC, and Cloi10.

	K_f ($\text{mg}^{1-1/n_f} \text{L}^{1/n_f} \text{kg}^{-1}$)	$1/n_f$	R^2	pH
OMW	96.2 (86.6-106.8) ^a	0.72 ± 0.06^b	0.978	4.7-5.3
BC	50.7 (49.5-51.9)	0.80 ± 0.01	0.999	8.1-8.5
Cloi10	- ^c	-	-	8.0-8.8

^a Values in parentheses correspond to the standard error range about the mean.

^b Value \pm standard error.

^c Not determined because of complete sorption of scopoletin by this sorbent.

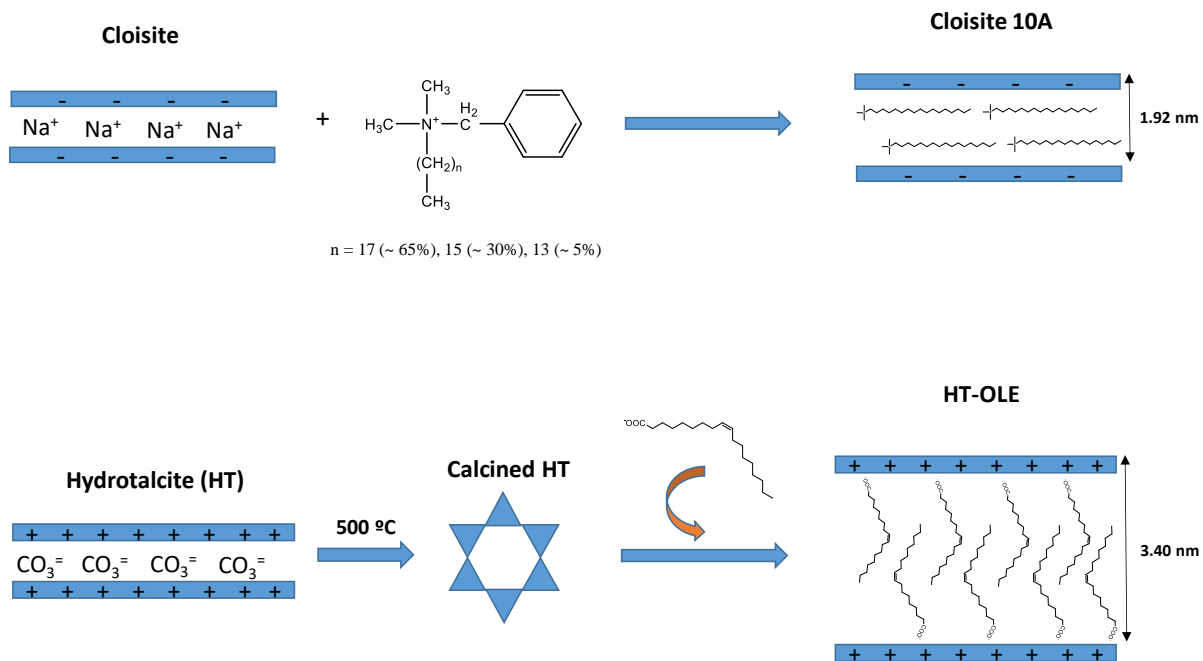


Fig. S1. Schematic representation of the reactions leading to the formation of the organoclays Cloisite 10A and HT-OLE.

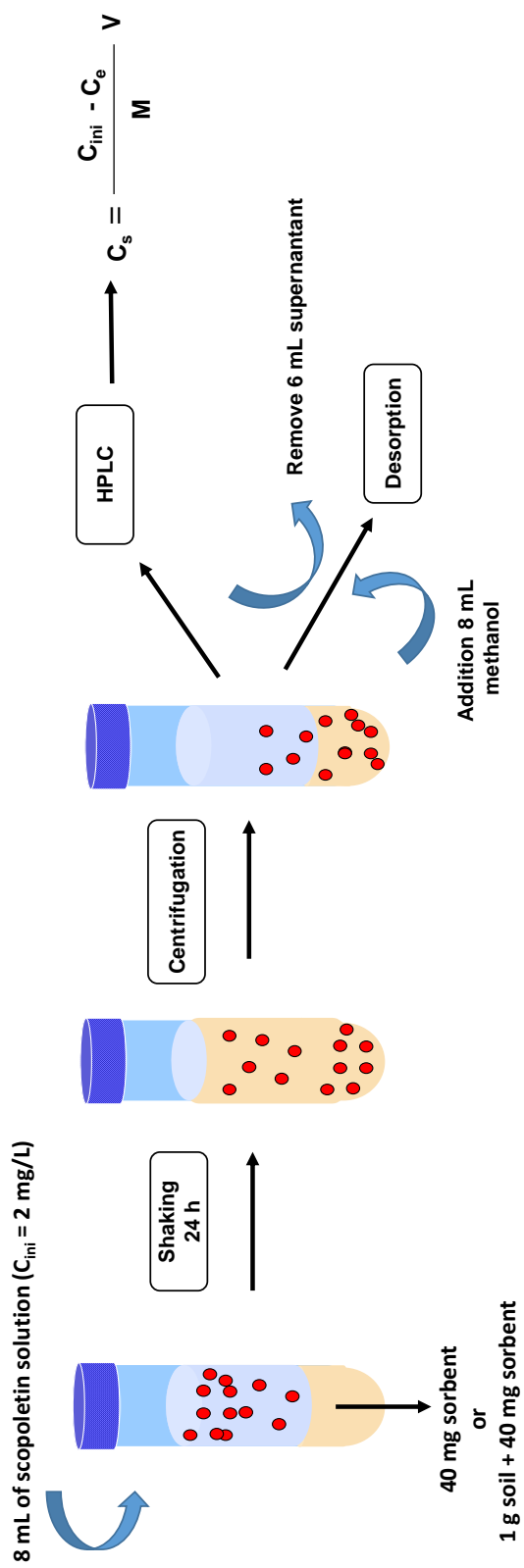


Fig. S2. Schematic representation of the sorption experiment methodology.

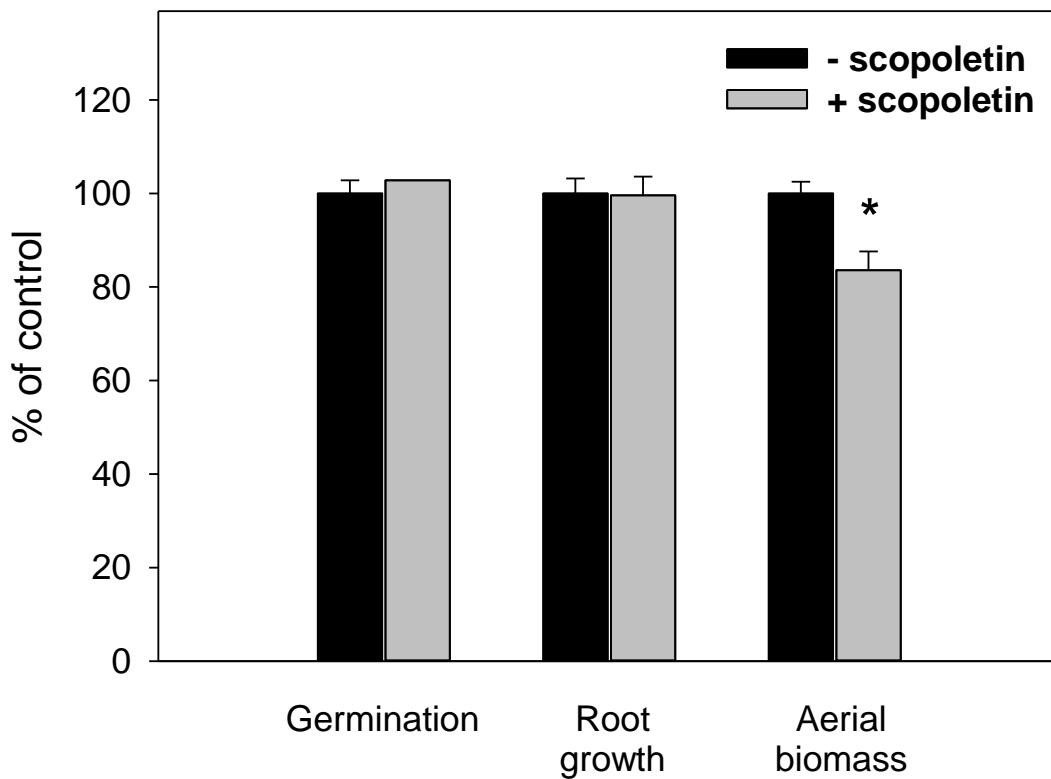


Fig. S3. Effect of scopoletin applied at 12 kg/ha to unamended soil pots on germination, root length, and aerial biomass of *Lactuca sativa*. Data (means and standard errors for n = 3) correspond to 7 days after treatment and are expressed as percent of the value obtained for the untreated control. The asterisk indicates statistically significant difference between the scopoletin-treatment and the untreated control.

V.3. Artículo III

Título: Granulated organoclay as a sorbent to protect the allelochemical scopoletin from rapid biodegradation in soil

Autores: Jose Antonio Galán-Pérez, Beatriz Gámiz*, Rafael Celis

Afiliación: *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain*

Revista: Environmental Technology & Innovation



Editores: Ravi Naidu, Duc Long Nghiem, Kirk Semple

Editorial: Elsevier **Categoría:** Environmental Sciences

Factor de Impacto (JCR 2021): 7.758 **Cuartil:** Q1 (42/279)

Volumen: 28 **Artículo:** 102707 **Año de publicación:** 2022

Cita:

GALÁN-PÉREZ J.A., GÁMIZ B., CELIS R.

Granulated organoclay as a sorbent to protect the allelochemical scopoletin from rapid biodegradation in soil. *Environmental Technology & Innovation* 28, 102707 (2022).

<https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102707>



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Technology & Innovation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eti

Granulated organoclay as a sorbent to protect the allelochemical scopoletin from rapid biodegradation in soil



Jose Antonio Galán-Pérez, Beatriz Gámiz^{*}, Rafael Celis

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 February 2022

Received in revised form 24 May 2022

Accepted 24 May 2022

Available online 2 June 2022

Keywords:

Allelochemicals

Bioherbicides

Granules

Hydroxycoumarins

Nanoclays

Phytotoxicity

ABSTRACT

Allelochemicals have been proposed as environmentally friendly bioherbicides, but their short persistence in soils often limits their performance as natural weed management products. In this study, incorporation into organoclay granules was investigated as a strategy to protect the allelochemical scopoletin from rapid biodegradation and prolong its persistence in soil. The commercial organoclay Cloisite[®] 10A, in its raw powder form, was used to prepare the granules. A kinetic study revealed slower sorption of scopoletin on the granules than on the organoclay powder and indicated an intraparticle pore diffusion mechanism. The half-life of scopoletin in soil under laboratory conditions increased significantly by incorporating the allelochemical into the organoclay granules, from 0.34 to 14.4 days. A field experiment was also conducted to assess whether the increase in soil half-life measured under controlled laboratory conditions translated to field conditions and to compare the phytotoxicity of the granulated allelochemical with that of its free (dissolved) form. The addition of scopoletin-loaded organoclay granules to soil plots rendered a field half-life for the allelochemical of 20.1 d, in contrast to the value of 0.54 d obtained for its free form. The granules also favored the expression of the phytotoxicity of scopoletin, reducing germination and root growth of *Lactuca sativa* L. to a greater extent than free scopoletin. The results of this work indicate that incorporation into organoclay granules could be a suitable technological approach to provide allelochemicals with protection from rapid biodegradation losses in soil, which may help increase their persistence for a better performance as crop protection products.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

In agricultural systems, weeds are a primary cause of crop yield losses since they compete for water, nutrients, light, and other growth resources (de Mastro et al., 2021; Hasan et al., 2021; Nichols et al., 2015). The intensive application of synthetic herbicides to reach a proper level of weed control has led to human health and environmental contamination problems, continuing weed resistance, and loss of soil biodiversity (Abbas et al., 2021; Cordeau et al., 2016; Gámiz and Celis, 2021; Yusá et al., 2022). Hence, there is a prevailing need to look for alternative weed management products, which should fulfill the conditions of being effective, non-contaminant, and economically affordable (Duke et al., 2019; Korres et al., 2019; Serino et al., 2021).

Allelopathy consists of the release of biochemicals by microorganisms or plants with a concomitant direct or indirect effect on the growth of neighboring plants or microorganisms in a given natural or agricultural system (Korres et al., 2019).

^{*} Corresponding author.

E-mail address: bgamiz@irnas.csic.es (B. Gámiz).

<https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102707>

2352-1864/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Accordingly, allelopathic compounds have been suggested as a tool in the frameworks of integrated weed management and organic farming based on the fact that many of them display phytotoxic properties (Céspedes et al., 2014; de Mastro et al., 2021; Galán-Pérez et al., 2021; Gámiz and Celis, 2021; Jilani et al., 2008; Macías et al., 2019; Domingues and Santos, 2019; Trezzi et al., 2016). Nevertheless, the identification of allelopathic activity in the laboratory does not always translate to the field (Nichols et al., 2015). This is because the herbicidal activity is strongly dictated by the dynamics of the allelochemical in the soil environment, where it usually suffers transport and transformation processes that can restrain its bioactivity within hours or a few days (Bravetti et al., 2020; Gámiz et al., 2018; Gimsing et al., 2009; Macías et al., 2019).

Scopoletin belongs to the family of hydroxycoumarinic allelochemicals, for which the presence of a hydroxyl group in the C7 position has been suggested to contribute to their phytotoxicity (Pan et al., 2015). Hydroxycoumarins have been proposed as potential surrogates for synthetic herbicides because they appear to have similar activity to auxinic herbicides, such as 2,4-D or MCPA (Graña et al., 2017). In former studies, we found that the phytotoxicity of scopoletin depended on soil type and specifically on how sorption and persistence affected its bioavailability. For example, scopoletin did not express its phytotoxicity in alkaline soils because these favored a fast decrease of its soil concentration (Galán-Pérez et al., 2021, 2022). Hence, controlling the bioavailability of scopoletin in the soil environment appears a critical step for the use of this and similar hydroxycoumarins as bioherbicides.

Nanotechnology has been proposed as a tool to overcome the limitations associated with the use of natural compounds as bioherbicides (Jilani et al., 2008; Korres et al., 2019). The advantages ascribed to its use include the modulation of the release of the compound into the environment, the optimization of the application doses, and the reduction of chemical losses by volatilization or leaching, for example, through nanoformulation of the active ingredient (Vurro et al., 2019). Numerous matrixes have been proposed for this aim, such as nanoparticles, nanocapsules, nanoclays, or liposomes, which can protect the compound against degradation, volatilization, or leaching (de Mastro et al., 2021; Pérez-de Luque and Hermosín, 2013). Specifically, organically-modified clays show exceptional properties as sorbents of organic compounds (Saleh et al., 2020; Sarkar et al., 2012; Slaný et al., 2019). The commercial organophilic clay Cloisite[®] 10A, for instance, was found to increase the persistence of scopoletin in alkaline soil by enhancing its sorption (Galán-Pérez et al., 2022). As reversible sorption has traditionally dominated the interactions between organoclays and organic compounds (Gámiz et al., 2019; Sarkar et al., 2012), the bioaccessibility of allelochemicals sorbed on organoclays may still allow the expression of their biological activity.

One of the main disadvantages of the direct use of organoclays as sorbents or carriers lies in the fact that the handling of powdered materials is problematic because of the risk of drift and inhalation of small particles (Du et al., 2017). It has also been observed that, once in the soil, powdered organoclays may rapidly lose some of their sorption capacity (Gámiz et al., 2017). To circumvent these limitations, the granulation of organoclays to agglomerate fine particles into larger ones and improve their physical features, such as permeability, sorption, and bulk density, has been recommended (Bueno et al., 2021; Du et al., 2017; Huang et al., 2013; Jiang et al., 2015; Vesavale et al., 2007). Recently, we successfully prepared granules based on Cloisite 10A and used them as carriers of the monoterpene S-carvone. The prepared granules behaved as a slow-release system, reducing transport losses of the allelochemical and prolonging its phytotoxic effect in laboratory tests (Gámiz and Celis, 2021).

Based on the hypothesis that granules of the commercial organoclay Cloisite 10A could perform better than its powder form in enhancing the persistence of the hydroxycoumarin scopoletin in alkaline soils, the objectives of this work were: (1) to compare the ability of powder and granules of Cloisite 10A to sorb the allelochemical scopoletin; (2) to evaluate the effect of different coapplication forms of the organoclay and scopoletin on the allelochemical dissipation rate in an alkaline soil under controlled laboratory conditions; (3) to evaluate the behavior of scopoletin-loaded organoclay granules under field conditions in terms of persistence and phytotoxic activity of the allelochemical. This work fundamentally advances in the interaction between organoclays and natural organic compounds and its application in the search for strategies to implement the use of allelochemicals as potential bioherbicides.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin) was purchased from Merck (Spain) with a purity > 99.0%. The compound has a molecular mass of 192.17, pK_a of 7.4 (Ketari et al., 2001), and its experimentally-determined water solubility was 230 mg L⁻¹ at 25 °C. All diluted solutions of scopoletin used in the experiments were obtained from a 200 mg L⁻¹ stock solution prepared in water. Fig. 1 shows the chemical structure of scopoletin.

The soil sample used in the laboratory experiment was taken from the top 20 cm of a field area located at the CSIC Experimental Station in Seville, Spain (37°16'54.5"N 06°03'59.0"W). Once in the laboratory, it was air-dried, sieved using a 2 mm diameter sieve, and analyzed by the Soil Analysis Service of IRNAS (CSIC). The soil was a sandy loam containing 75% sand, 6% silt, 19% clay, 0.34% organic carbon, and had a pH of 8.4 (determined in a 1 g:2.5 mL soil:water slurry).

The commercial organoclay Cloisite[®] 10A (BYK Additives & Instruments, Wesel, Germany) was used in its raw (powdered) form for the preparation of sorbent granules. The organoclay Cloisite 10A has a basal spacing value of 1.92 nm, and its elemental analysis revealed a C content of 27.0% and a N content of 1.13%, corresponding to the presence of dimethyl, benzyl, hydrogenated alkyl tallow quaternary ammonium cations as modifiers at a loading of ca. 125 cmol kg⁻¹ clay (Galán-Pérez et al., 2022). The structure of the interlayer cation and additional characteristics of Cloisite 10A can be found elsewhere (Galán-Pérez et al., 2022; Pastor et al., 2020).

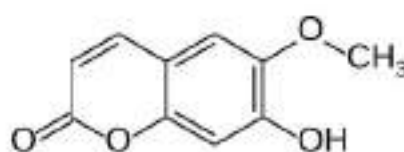


Fig. 1. Chemical structure of scopoletin.

2.2. Granulation of Cloisite 10A

The granulation procedure consisted of introducing 50 g of organoclay in a rolling drum granulator (model DGI-01, Languedoc Scientifique, Rivesaltes, France) where the organoclay was moistened with 50 mL of distilled water, used as a liquid binder for agglomeration. The water was sprayed with a nebulizer while breaking big granules with a spatula to control the snowball effect. The obtained granules were dried at 60 °C overnight and then sieved to select those with sizes between 63 µm and 2 mm.

2.3. Scopoletin sorption kinetics on powder and granules of Cloisite 10A

The kinetics of sorption of scopoletin on raw (powdered) and granulated Cloisite 10A were compared to get insight into the effect of granulation on the sorption rate and extent. For this purpose, 320 mg of Cloisite 10A, as powder or granules, were placed in 500 mL-amber glass bottles with screw caps and 250 mL of a scopoletin aqueous solution with an initial concentration of 2 mg L⁻¹ were added. The bottles were incubated at 25 ± 1 °C and, at different times (t = 0, 8, 24, 48, and 72 h), aliquots of 4 mL of the supernatant solution were taken, filtered, and stabilized with 4 mL of methanol before analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) following the protocol for sample storage described by Galán-Pérez et al. (2021). The experiment was performed in duplicate. The amount of scopoletin sorbed at different times was calculated from the difference between the initial and final concentration of allelochemical in solution.

2.4. Scopoletin dissipation in soil under controlled laboratory conditions

The dissipation of scopoletin in soil was evaluated through an incubation experiment performed in 15 mL-Pyrex[®] centrifuge tubes. Four treatments were established: (1) untreated soil + scopoletin, (2) soil + raw (powdered) Cloisite 10A + scopoletin, (3) soil + granules of Cloisite 10A + scopoletin, and (4) soil + granules of Cloisite 10A preloaded with scopoletin. For treatments (1), (2), and (3), 0.3 mL of an aqueous solution of scopoletin of 30 mg L⁻¹ was mixed with 1 g of soil samples, either unamended or previously amended with 20 mg of Cloisite 10A in powder or granulated form. For treatment (4), the scopoletin solution (0.3 mL, 30 mg L⁻¹) was preincubated with the granules of Cloisite 10A (20 mg) for three days, and then the suspension was mixed with the soil. Under these conditions, the initial concentration of scopoletin in all treatments was 9 mg kg⁻¹ soil, the soil humidity was 30%, and the organoclay was present at 2% (20 mg per gram of soil) in treatments (2), (3), and (4). For each treatment, 21 tubes were prepared and incubated at 25 ± 1 °C in darkness after being hermetically closed. At selected times (t = 0, 0.3, 1, 2, 3, 4, and 7 days), three tubes of each treatment were taken from the incubator (SalvisLab, Rotkreuz, Switzerland) and frozen at -18 °C for subsequent extraction and analysis by HPLC. The extracting solution was the same as that reported in Galán-Pérez et al. (2021), i.e., 8 mL of 90:10 (v/v) methanol:0.01 M o-phosphoric acid (pH = 2.2), which rendered recoveries > 85%.

2.5. Preparation of granules of Cloisite 10A loaded with scopoletin for their use in the field experiment

Based on the results of the dissipation experiment, granules of Cloisite 10A preloaded with scopoletin were prepared for their use in the field experiment. The scopoletin-loaded granules were obtained by soaking 65 g of granules of Cloisite 10A in 1.5 L of an aqueous solution of scopoletin of 200 mg L⁻¹, to give an allelochemical content of 4.6 mg g⁻¹ of granules. After 72 h, the supernatant solution was removed and the granules were dried at 60 °C. Extraction of 20 mg of granules with 8 mL of a 90:10 (v/v) methanol:diluted H₃PO₄ (pH = 2.2) solution revealed that their actual content in scopoletin was 4.4 ± 0.3 mg g⁻¹.

2.6. Field trial

The field experiment was performed in an area adjacent to the point where the soil sample used in the laboratory dissipation experiment was collected (37°16'60"N, 06°03'58"W). The soil was a sandy loam with 63% sand, 21% silt, 16% clay, 1.42% organic carbon, and a pH of 8.3. The trial design comprised six plots of 0.25 m² (0.5 × 0.5 m) demarcated with woody frames of 20 cm height with a distance among them of 0.25 m (Supplementary Fig. S1). In duplicate, three treatments randomly distributed were established: (1) two untreated soil plots (controls), (2) two soil plots treated with a scopoletin solution, and (3) two soil plots treated with organoclay granules preloaded with scopoletin as described

in Section 2.5. Treatment (1) received 1.5 L of water, treatment (2) received 1.5 L of a 200 mg L⁻¹ aqueous scopoletin solution, whereas treatment (3) received 85 g of scopoletin-loaded organoclay granules plus 1.5 L of water. In this way, the application rate of scopoletin achieved for treatments (2) and (3) was 12 kg ha⁻¹. This application rate had previously been found to control scopoletin-target plant species in acid soil but not in alkaline soils (Galán-Pérez et al., 2021, 2022). The granules were mixed within the top 1 cm of soil using a rake to achieve a homogeneous distribution and yield an organoclay content of 2% (assuming a soil bulk density of 1.3 g cm⁻³). In addition, all plots received 3 g of seeds of *Lactuca sativa* L. (Vilmorin, La Méniltré, France), which was selected as a model, scopoletin-sensitive plant species (Galán-Pérez et al., 2022) to compare the expression of the phytotoxicity of scopoletin applied to the field plots in a free (immediately available) and granulated form. For this purpose, the total number of germinated seeds and the root length of twelve emerged seedling samples were measured for each plot at the end of the experiment ($t = 7$ days). The application was carried out on September 27, 2021. At days 0, 2, 4, and 7 after application, triplicate subsamples for each plot were collected from the first 5 cm of soil with a 2.5 cm internal-diameter auger, until completing six observations per treatment. The soil subsamples were separately packed in plastic bags, introduced into an icebox, and, once in the lab, frozen at -18 °C until their analysis. Extraction of scopoletin was conducted by shaking (24 h) triplicate 3 g aliquots of each soil subsample with 15 mL of the extracting solution described in Section 2.4 and the extracts were analyzed by HPLC. The water content of the soil subsamples was also measured by drying 1 g of soil at 105 °C for 24 h.

2.7. Analysis of the allelochemical

The analysis of scopoletin was conducted by HPLC using a high-performance liquid chromatograph (Waters, Barcelona, Spain) with UV detection, following the conditions detailed in Galán-Pérez et al. (2021). Briefly, the column used was a Kinetex C18 (150 mm length × 4.6 mm i.d. and 5 μm of particle size, Phenomenex, Madrid, Spain), the mobile phase was methanol:0.01 M *o*-phosphoric acid (45:55) at a flow rate of 1 mL min⁻¹, and quantification was carried out at a wavelength of 343 nm.

2.8. Data treatment

The Weber & Morris (W&M) intraparticle diffusion model was used to fit the scopoletin sorption kinetic data on the granules:

$$q_t = k_{WM} \cdot t^{0.5} + C \quad (1)$$

where q_t (mg kg⁻¹) is the amount of scopoletin sorbed at time t (h), k_{WM} is the W&M parameter, and C represents the boundary layer effect or surface sorption (Weber and Morris, 1963; Schwaab et al., 2017).

Laboratory and field soil dissipation data were described by a first-order equation:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

where C_t (mg kg⁻¹) is the concentration of scopoletin in soil at time t (days), C_0 (mg kg⁻¹) is the concentration of scopoletin in soil at $t = 0$, and k is the first-order dissipation rate constant, which was used to calculate the soil half-lives of scopoletin as $t_{1/2} = (\ln 2)/k$.

In the sorption, dissipation, and seed germination experiments, standard errors were used to indicate variability among replicates. Significant differences were established at the 95% confidence level using the *t*-test, when two treatments were compared (sorption and field dissipation data), or analysis of variance (ANOVA) followed by LSD post-hoc test, when more than two treatments were compared (dissipation in the laboratory and seed germination in the field). Data distribution for the root length of emerged seedling samples in the field experiment was analyzed using box and whisker plots.

3. Results and discussion

3.1. Scopoletin sorption kinetics on powder and granules of Cloisite 10A

The amount of scopoletin sorbed on powder and granules of Cloisite 10A as a function of time during the sorption kinetic experiment is shown in Fig. 2a. The rapid sorption of the allelochemical on the powdered organoclay contrasted with its slower sorption on the granules. For the powder, there was almost immediate sorption of ca. 50% of the allelochemical initially present in solution, and the maximum uptake (86%, 1340 mg kg⁻¹) was reached within 8 h, yielding a sorption distribution coefficient $K_d = 4800$ L kg⁻¹. The amount of scopoletin immediately sorbed by the granules was negligible, and only after 72 h, sorption became similar to that observed by the powder (Fig. 2a). Interestingly, the scopoletin sorption kinetic data on the granules were very well described by an intraparticle diffusion model (Eq. (1)), with the plot of the amount of scopoletin sorbed (q_t) against $t^{0.5}$ giving a straight line ($k_{WM} = 125 \pm 4$ mg kg⁻¹ h^{-0.5}, $R^2 = 0.997$) that passed through the origin (Fig. 2b). This strongly indicated that intraparticle diffusion was the rate-controlling process in the sorption of scopoletin on the granulated organoclay (Wang and Guo, 2020). Formerly, we had observed that raw (powdered) Cloisite 10A was an excellent sorbent for scopoletin from aqueous solution (Galán-Pérez et al., 2022). Hydrophobic interactions between scopoletin and the alkyl chains of the organoclay supplemented by polar interactions between scopoletin anions and the positively charged ammonium groups of the organic modifier were proposed as potential interaction mechanisms (Galán-Pérez et al., 2022). It appears that the major effect of granulating the organoclay was to reduce the availability of sorption sites, with intragranule diffusion becoming the sorption rate-controlling step.

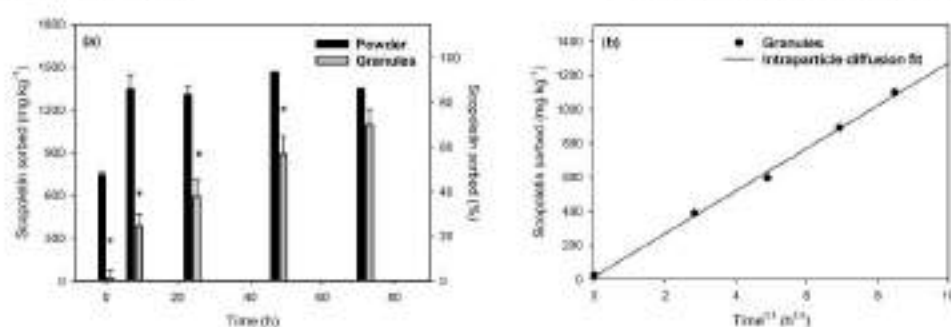


Fig. 2. Scopoletin sorbed on powder and granules of Cloisite 10A as a function of time during the sorption kinetic experiment (a) and fit of the sorption kinetic data obtained for the granules by the Weber & Morris intraparticle diffusion model (b). The asterisk indicates that the difference in sorption is statistically significant at the $P < 0.05$ level.

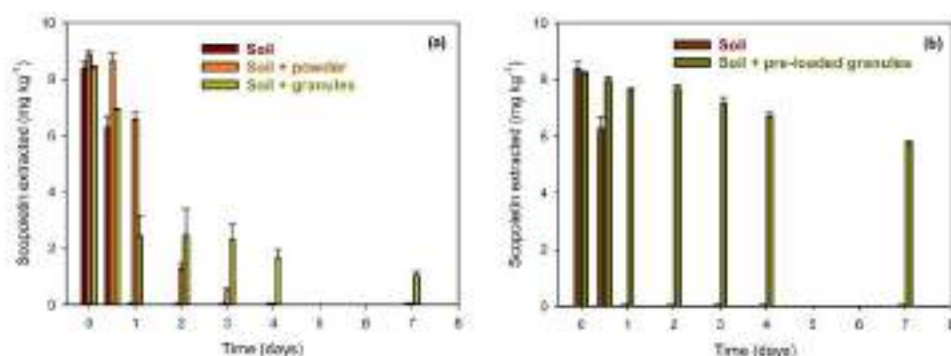


Fig. 3. Scopoletin dissipation data in soil treated with powder and granules of the organoclay Cloisite 10A (a) and in soil treated with granules of the organoclay preloaded with the allelochemical (b) under laboratory conditions.

3.2. Dissipation of scopoletin in soil under laboratory conditions

The effect of powder and granules of Cloisite 10A on the dissipation of scopoletin in soil under controlled laboratory conditions is summarized in Fig. 3 and detailed in Supplementary Table S1. Scopoletin was added either as an immediately available aqueous solution of allelochemical (for the “soil”, “soil + powder”, and “soil + granules” treatments) or as allelochemical-preloaded organoclay granules (for the “soil + preloaded granules” treatment). The parameters obtained after fitting a first-order dissipation equation to the experimental data are given in Table 1.

Scopoletin dissipation data reflected a very rapid disappearance of the allelochemical in untreated soil ($k = 2.059 \text{ d}^{-1}$, $t_{1/2} = 0.34 \text{ d}$), with scopoletin residues decreasing to non-detectable levels just one day after its application to the soil (Fig. 3 and Supplementary Table S1). Allelochemicals commonly display a fast dissipation in soils because their (natural) chemical structures are readily degradable by soil microorganisms (Dalton et al., 1989; Inderjit, 2005). Indeed, we have previously shown that the degradation of scopoletin in soil is predominantly a rapid, microbial-mediated process, particularly in soils with low sorption capacities, where the high fraction of allelochemical remaining in the soil solution can be readily degraded by soil microorganisms (Galán-Pérez et al., 2021, 2022).

All organoclay treatments increased the persistence of scopoletin in the soil ($P < 0.05$) (Supplementary Table S1), but the specific dissipation patterns were strongly dependent on the form the organoclay and allelochemical were added to the soil (Fig. 3, Table 1). A key observation was that the organoclay powder was more effective than the granules in increasing the soil persistence of scopoletin at short incubation times ($t \leq 1 \text{ day}$) while this effect was reversed at longer incubation times ($t \geq 2 \text{ days}$) (Fig. 3a and Supplementary Table S1). Even though this behavior resulted in similar half-lives for scopoletin in the “soil + powder” and “soil + granules” treatments ($t_{1/2} = 0.99\text{--}1.17 \text{ d}$, Table 1), it indicated that the high availability of (external) sorption sites in the powdered organoclay [Fig. 2] led to a rapid protection from biodegradation, but also to a high bioaccessibility of the sorbed fraction to be subsequently degraded by soil microorganisms (Semple et al., 2004). The reduced availability of sorption sites in the granules led to slower sorption and a concomitant lower protection at short incubation times but, once a fraction of the allelochemical reached the (intraparticle) sorption sites, it became strongly protected from degradation (Fig. 3a). Highly reversible, external surface sorption of allelochemicals in soil

Table 1
First-order laboratory dissipation constants for scopoletin in untreated soil and in soil treated with powder, granules, and preloaded granules of the organoclay.

	k (days ⁻¹)	t _{1/2} (days)	R ²
Soil	2.059 ± 0.449 ^a	0.34 (0.28–0.43) ^a	0.969
Soil + powder	0.699 ± 0.153	0.99 (0.61–1.27)	0.941
Soil + granules	0.591 ± 0.161	1.17 (0.92–1.61)	0.863
Soil + preloaded granules	0.048 ± 0.004	14.4 (13.3–15.7)	0.971

^aStandard error range of the calculated coefficients.

Table 2
First-order dissipation constants for scopoletin applied to field plots as a free compound or pre-sorbed on organoclay granules.

	k (days ⁻¹)	t _{1/2} (days)	R ²
Free scopoletin	1.282 ± 0.305 ^a	0.54 (0.44–0.71) ^a	0.992
Granules	0.034 ± 0.003	20.1 (18.4–22.3)	0.983

^aStandard error range of the calculated coefficients.

amended with powdered organoclays has previously been described and shown to promote rapid loss of the organoclay sorption capacity with time (Gómez et al., 2017; Real et al., 2019).

The soil dissipation pattern for the scopoletin-preloaded organoclay granules confirmed the afore-mentioned protection mechanism, as it revealed that scopoletin already sorbed on intraparticle sorption sites of the granulated organoclay dissipated very slowly in the soil (Fig. 3b). The half-life of scopoletin increased from 0.34 d, when applied as an immediately available aqueous solution to the soil, to 14.4 d, when applied as allelochemical-preloaded organoclay granules (Table 1). For the preloaded granules, at $t = 7$ d, scopoletin residues still represented 70% of the amount of allelochemical initially added to the soil. Intraparticle pore diffusion of scopoletin hampered desorption, delaying biodegradation and increasing the persistence of scopoletin in the soil.

3.3. Field experiment

Weather conditions monitored during the field experiment are compiled in Table S2 of the Supporting Information. The maximum daily temperatures varied between 23.1 and 32.3 °C, with an average of 29.5 °C, whereas the minimum daily temperatures ranged between 12.0 and 15.2 °C, with an average of 14.1 °C (Supplementary Table S2). Warm temperatures and the absence of rain made the soil plots become noticeably dry during the experiment whereby, daily, we moistened them with 3 mm of water to facilitate the soil sampling and favor seed germination. At $t = 7$ d, this was not necessary since a natural rainfall episode of a similar amount of water occurred shortly before sampling (Supplementary Table S2).

The soil concentrations of scopoletin (mg kg⁻¹ dry soil) applied to the plots as free (dissolved) compound or pre-sorbed on granules, measured at different sampling times after application, are shown in Fig. 4. A first observation was that the initial concentration ($t = 0$) of scopoletin in soil differed notably between treatments (Fig. 4). For the plots treated with the free compound, the amount of allelochemical extracted at $t = 0$ was 5.2 ± 0.3 mg kg⁻¹, whereas a value of 26.7 ± 4.0 mg kg⁻¹ was obtained for the plots treated with the granules. Considering the bulk density (1.3 g cm⁻³) and humidity (12%) of the soil samples collected at $t = 0$, we expected a concentration of ca. 21 mg kg⁻¹, a value close to that obtained for the plots treated with the granules but much greater than that measured for the plots treated with the free allelochemical (Fig. 4). The most likely explanation for this result is that scopoletin, added as a free compound, biodegraded very rapidly as soon as it reached the soil, a behavior previously observed for other allelochemicals (Real et al., 2021). Interestingly, the application of scopoletin preloaded on organoclay granules was very efficient in preventing this rapid initial loss of allelochemical.

Fig. 4 shows that the dissipation of scopoletin in the field occurred at a slower rate when it was applied pre-sorbed on granules compared to the free compound (Fig. 4 and Table 2). For instance, seven days after treatment, we measured a soil concentration of scopoletin of 21.1 ± 4.2 mg kg⁻¹, compared to the value of 0.16 ± 0.08 mg kg⁻¹ obtained for the free compound (Fig. 4). The half-life of free scopoletin in field plots ($t_{1/2} = 0.54$ d) was similar to that measured in the laboratory experiment ($t_{1/2} = 0.34$ d) (Tables 1 and 2). Likewise, the persistence of scopoletin applied as organoclay granules under field conditions ($t_{1/2} = 20.1$ d) was only slightly higher than that measured under laboratory conditions ($t_{1/2} = 14.4$ d). Thus, the dissipation patterns observed under controlled laboratory conditions were reproduced in the field. It should be taken into account that a slower release of the allelochemical could have occurred in the field because of less favorable (fluctuating) temperature and humidity conditions for the release of the bioherbicide than under controlled laboratory conditions, and that temperature and water content changes could have also impacted the activity of soil microbial degraders (Chowdhury et al., 2021; Galán-Pérez et al., 2021; Real et al., 2021). Based on the weather conditions occurring during the field experiment (Supplementary Table S2), it is not likely that processes such as leaching or runoff, which often play a relevant role in the field dissipation of agrochemicals, contributed significantly to the dissipation of scopoletin in our field experiment.

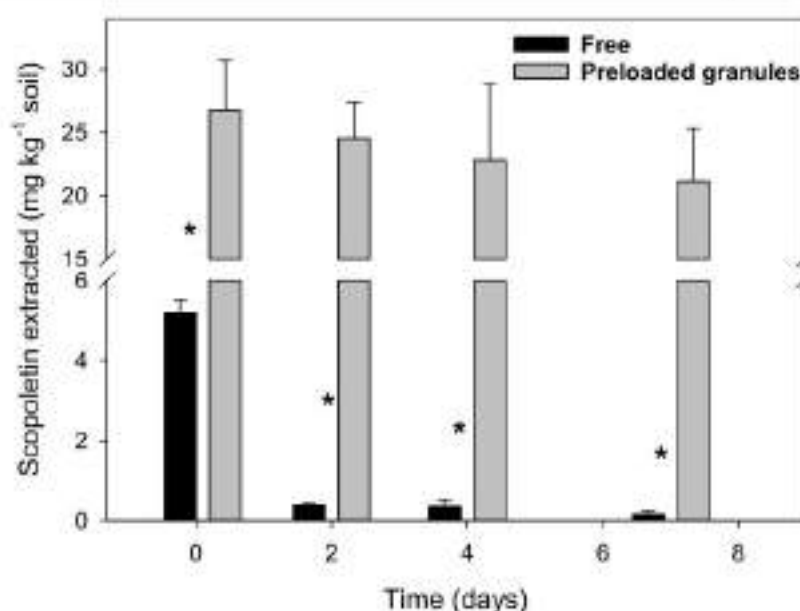


Fig. 4. Dissipation data for scopoletin applied to field plots as a free compound or pre-sorbed on organoclay granules. The asterisk indicates that the difference in the soil concentration of scopoletin is statistically significant at the $P < 0.05$ level.

The number of germinated seeds and the root length of emerged seedling samples of *Lactuca sativa* in the plots treated with free scopoletin and with scopoletin pre-sorbed on organoclay granules were compared with the values obtained for untreated control plots (Fig. 5). The aim was to address the question of whether the extended persistence of the allelochemical in the granulated formulation favored the expression of its phytotoxicity in the soil. In contrast to previous laboratory bioassays reporting negligible effects of scopoletin on germination of target plant species (Galán-Pérez et al., 2021; Graña et al., 2017), we observed that scopoletin affected the germination of *Lactuca sativa* seeds in field plots, particularly when it was applied as organoclay granules, where a reduction in seedling emergence of 80% was observed (Fig. 5a). A possible explanation for this finding is that the effect of scopoletin on germination became more apparent under less favorable, field conditions than under laboratory conditions, as the latter are often optimized to favor seedling emergence.

The data distribution for the root length of emerged seedling samples was analyzed using box and whisker plots (Fig. 5b). Medians and means for root length values decreased in the following order: Control \geq Free scopoletin $>$ Preloaded granules (Fig. 5b). Interestingly, the median and mean for the plots treated with the free allelochemical (5.1 and 4.9 cm, respectively) were similar to those for the control plots (5.0 and 5.3 cm), whereas the plots treated with the granules preloaded with scopoletin yielded statistically significant lower values of 3.8 cm and 3.5 cm (Fig. 5b).

For the control plots, a positively skewed box with upper/lower quartiles at 7.0 and 3.8 cm was observed, whereas for the granules, a negatively skewed box with upper/lower quartiles at 4.7 and 2.0 cm was obtained. As we previously checked that the granules themselves had no significant effect on germination or growth of *Lactuca sativa* after their application to the tested soil (Supplementary Fig. S2), the reduction in germination and root growth observed for scopoletin applied as granules, compared to the free form of the allelochemical, was attributed to the greater persistence of the allelochemical when it was applied in granulated form (Fig. 4).

4. Conclusions

The interaction of scopoletin with granules of the organoclay Cloisite 10A satisfactorily protected the allelochemical against rapid biodegradation in an alkaline soil, both under laboratory and field conditions. A superior protective effect was observed when scopoletin was pre-sorbed on the organoclay granules before being applied to the soil. Intraparticle diffusion through the granules limited the availability of the allelochemical to soil microorganisms, increasing its soil persistence and favoring the expression of its phytotoxicity under a real environmental conditions in the field.

The outcomes from this study support that incorporation into granulated nanoclays can be a useful technological approach to increase the persistence and bioactivity of allelochemicals in soils. Nevertheless, to translate our findings to a real weed management agricultural scenario, the proposed formulation would need to be optimized in terms of cost and bioactivity to specific target weeds, with a particular focus on minimizing the amount of allelochemical

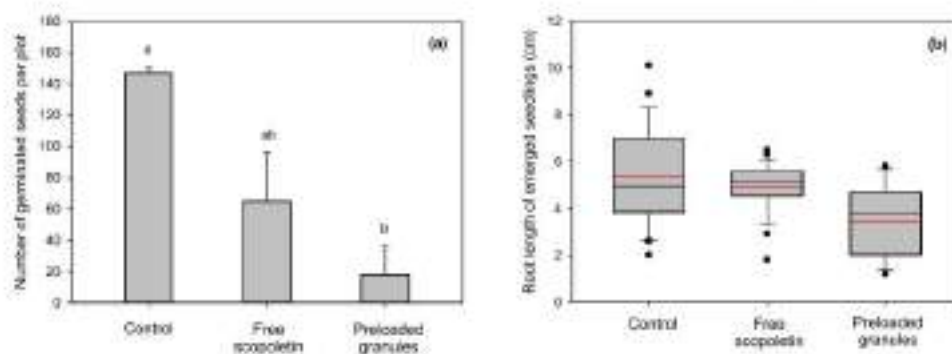


Fig. 5. Effect of scopoletin applied to field plots as a free compound or presorbed on organoclay granules on germination (a) and the root length of emerged seedlings (b) of *Lactuca Sativa* L. Different letters above the seed germination bars indicate statistically significant differences at the $P < 0.05$ level. For root lengths, boxes indicate the limits for the upper and lower quartiles, whiskers indicate the 90th and 10th percentiles, symbols represent outlying data, and black and red lines inside the boxes correspond to median and mean values, respectively. [For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.]

and granulated carrier per hectare needed for weed control. The results of previous works demonstrating a strong phytotoxic effect of scopoletin to weed species such as *Orobanchie crenata* and *Arabidopsis thaliana* under soilless laboratory conditions (Fernández-Aparicio et al., 2013; Graña et al., 2017) encourage higher-tier assessments directed to optimize the formulation proposed in this work for practical use. As a possible matter of further investigation, increasing the content of scopoletin in the granules would not only reduce the amount of granulated formulation required to achieve the same herbicide application rate, but could also increase the herbicidal activity of the allelochemical in the formulation, as herbicide molecules present at high loadings in organoclays are commonly more loosely bound than those present at low loadings (Celis et al., 2005). Further potentially useful optimization approaches include tuning the nature of the organoclay and the physical characteristics of the granules, such as their particle and pore size. This might contribute to the standardization of strategies for the implementation of allelochemicals as potential bioherbicides.

CRediT authorship contribution statement

Jose Antonio Galán-Pérez: Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Beatriz Gómiz:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Rafael Celis:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Visualization, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCIN/AEI/10.13039/501100011033), through grants AGL2017-82141-R, co-financed with EU (FEDER) funds, and PID2020-112563-100 and by Junta de Andalucía, Spain, through grant P20-00746, co-financed with EU (FEDER) funds. The authors thank I. Girón for his assistance during the field experiment. J.A. Galán-Pérez also thanks MCIN for a predoctoral contract [grant PRE2018-093293] linked to project AGL2017-82141-R and co-financed with EU (FSE) funds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102707>.

References

- Abbas, T., Zahir, Z.A., Naveed, M., Abbas, S., Basra, S.A. 2021. Weed antagonistic bacteria stimulate growth, physiology and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) in multiple field experiments: A study of selectivity for sustainable weed control. *Environ. Technol. Innov.* 24, 101974. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101974>.
- Bravetti, M., Mdel M., Cargnelli, M.C., Palacios, S.M. 2020. Phytotoxicity of *Conoclinium speciosum* extract, active principles, degradation in soil and effectiveness in field tests. *Chemoecology* 30, 15–24. <https://doi.org/10.1007/s00049-019-00294-0>.

- Bueno, S., Durán, E., Gámiz, B., Hermosín, M.C., 2021. Formulating low cost modified bentonite with natural binders to remove pesticides in a pilot water filter system. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 104523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2020.104023>.
- Celis, R., Facenda, G., Hermosín, M.C., Cornejo, J., 2005. Assessing factors influencing the release of hexazinone from clay-based formulations. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85, 1153–1164. <http://dx.doi.org/10.1080/03067310500273302>.
- Céspedes, C.L., Salazar, J.R., Ariza-Castro, A., Yamaguchi, L., Ayala, J.G., Aqueveque, P., Kato, I., Alarcón, J., 2014. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environ. Res.* 132, 391–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.04.003>.
- Chowdhury, I.F., Rohan, M., Stodart, B.J., Chen, C., Wu, H., Doran, G.S., 2021. Persistence of atrazine and trifluralin in a clay loam soil undergoing different temperature and moisture conditions. *Environ. Pollut.* 276, 116687. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116687>.
- Cordreau, S., Triollet, M., Wayman, S., Steinberg, C., Guillemin, J.P., 2016. Bioherbicides: Deal in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Prot.* 87, 44–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>.
- Dalton, B.R., Blum, U., Weed, S.B., 1989. Differential sorption of exogenously applied ferulic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic, and vanillic acids in soil. *Soil Sci. Am. J.* 53, 757–762. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1989.03615905005300030021>.
- de Mastro, G., el Mahdi, J., Ruta, C., 2021. Bioherbicidal potential of the essential oils from Mediterranean Lamiaceae for weed control in organic farming. *Plants* 10, 818. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10040818>.
- Domingues, P.M., Santos, L., 2019. Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegiun*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. *Ind. Crops Prod.* 139, 111534. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111534>.
- Du, J., Chadolavada, S., Naidu, R., 2017. Synthesis of porous bentonite organoclay granule and its adsorption of tributyltin. *Appl. Clay Sci.* 148, 131–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2017.07.023>.
- Duke, S.O., Evidente, A., Vurro, M., 2019. Natural products in pest management: innovative approaches for increasing their use. *Pest Manage. Sci.* 75, 2299–2300. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5552>.
- Fernández-Aparicio, M., Cirriano, A., Evidente, A., Rubiales, D., 2013. Inhibition of *Drosera rotundifolia* seed germination and radicle growth by allelochemicals identified in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9797–9803. <http://dx.doi.org/10.1021/jf403738p>.
- Galán-Pérez, J.A., Gámiz, B., Celis, R., 2021. Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants. *Biol. Fertil. Soils* 57, 643–655. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-021-01556-2>.
- Galán-Pérez, J.A., Gámiz, B., Celis, R., 2022. Soil modification with organic amendments and organo-clays: Effects on sorption, degradation, and bioactivity of the allelochemical scopoletin. *J. Environ. Manag.* 302, 114102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114102>.
- Gámiz, B., Celis, R., 2021. S-carvone formulation based on granules of organoclay to modulate its losses and phytotoxicity in soil. *Agronomy* 11, 1503. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy11081503>.
- Gámiz, B., Cox, L., Hermosín, M.C., Spokas, K., Celis, R., 2017. Assessing the effect of organoclays and biochar on the fate of abscisic acid in soil. *J. Agric. Food Chem.* 65, 29–38. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b0366k>.
- Gámiz, B., Facenda, G., Celis, R., 2019. Nanoengineered sorbents to increase the persistence of the allelochemical carvone in the rhizosphere. *J. Agric. Food Chem.* 67, 589–596. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05652>.
- Gámiz, B., Hermosín, M.C., Celis, R., 2018. Appraising factors governing sorption and dissipation of the monoterpene carvone in agricultural soils. *Geoderma* 321, 61–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.005>.
- Gansing, A.L., Baham, J., Dayan, F.E., Locke, M.A., Sejara, L.H., Jacobson, C.S., 2009. Mineralization of the allelochemical sorgoleone in soil. *Chemosphere* 75, 1041–1047. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.048>.
- Gazta, E., Costas-Gil, A., Longueira, S., Celeiro, M., Tejera, M., Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A.M., 2017. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *J. Plant Physiol.* 218, 45–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.007>.
- Hasan, M., Ahmad-Hamidani, M.S., Razi, A.M., Hamdan, H., 2021. Bioherbicides: An eco-friendly tool for sustainable weed management. *Plants* 10, 1212. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10081212>.
- Huang, A., Huang, Z., Dong, Y., Chen, L., Fu, L., Li, L., Ma, L., 2013. Controlled release of phosim from organobentonite based formulation. *Appl. Clay Sci.* 80–81, 63–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2013.06.010>.
- Inderjit, S., 2005. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. *Plant Soil* 274, 227–236. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-004-0159-x>.
- Jiang, L., Mo, J., Kong, Z., Qin, Y., Dai, L., Wang, Y., Ma, L., 2015. Effects of organobentonites on imidacloprid release from alginate-based formulation. *Appl. Clay Sci.* 105–106, 52–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.12.023>.
- Jilani, G., Mahmood, S., Chaudhry, A.N., Hussain, I., Akram, M., 2008. Allelochemicals: Sources, toxicity and microbial transformation in soil – A review. *Ann. Microbiol.* 58, 351–357. <http://dx.doi.org/10.1007/s00375007528>.
- Kotai, W., Hantao, L., Xingqun, C., Yunfeng, Z., Zhude, H., 2001. Identification and determination of active components in *Angelica dahurica* benth and its medicinal preparation by capillary electrophoresis. *Talanta* 54, 753–761. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00327-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00327-7).
- Korres, N.E., Burgos, N.R., Travlos, I., Vurro, M., Gtsopoulos, T.K., Varanasi, Y.K., Duke, S.O., Kudsk, P., Brabham, C., Rouse, C.E., Salas-Perey, R., 2019. New directions for integrated weed management: Modern technologies, tools and knowledge discovery. *Adv. Agron.* 155, 243–319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bsa.2019.01.006>.
- Pérez-de Luque, A., Hermosín, M.C., 2013. Nanotechnology and its use in agriculture. In: Bagchi, D., Bagchi, M., Moriyama, H., Shahidi, F. (Eds.), *Bio-nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA, pp. 383–398.
- Martín, F.A., Mojás, F.J.R., Molinillo, J.M.C., 2019. Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest Manage. Sci.* 75, 2413–2436. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5355>.
- Nichols, V., Verhulst, N., Cox, R., Govaerts, B., 2015. Weed dynamics and conservation agriculture principles: A review. *Field Crops Res.* 183, 56–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2015.07.012>.
- Pan, L., Li, X., Yan, Z., Guo, H., Qin, B., 2015. Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: Structure-activity relationships and action mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 97, 272–277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.023>.
- Pastor, A., Gámiz, B., Cruz-Yusta, M., Sánchez, L., Pavlovic, I., 2020. Carbendazim-clay complexes for its potential use as antimicrobial additives in mortars. *BUILD. Environ.* 183, 107214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.buildenv.2020.107214>.
- Real, M., Facenda, G., Celis, R., 2021. Sorption and dissipation of the allelochemicals umbelliferone and salicylic acid in a Mediterranean soil environment: Effect of olive-mill waste addition. *Sci. Total Environ.* 774, 145027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145027>.
- Real, M., Gámiz, B., López-Cabeza, R., Celis, R., 2019. Sorption, persistence, and leaching of the allelochemical umbelliferone in soils treated with nanoengineered sorbents. *Sci. Rep.* 9, 9764. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-49031-2>.
- Saleh, I.A., Zouari, N., Al-Ghouthi, M.A., 2020. Removal of pesticides from water and wastewater: Chemical, physical and biological treatment approaches. *Environ. Technol. Innov.* 19, 101026. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2020.101026>.
- Sarkar, B., Xi, Y., Megharaj, M., Krishnamurti, G., Bowman, M., Rose, H., Naidu, R., 2012. Bioactive organoclay: A new technology for environmental remediation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42, 37–41. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2010.518524>.
- Schwab, M., Steffani, E., Barbosa-Coutinho, E., Severo Júnior, J.B., 2017. Critical analysis of adsorption/diffusion modelling as a function of time square root. *Chem. Eng. Sci.* 173, 179–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2017.07.037>.
- Semple, K.T., Dold, R.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harris, H., 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38, 228A–231A. <http://dx.doi.org/10.1021/es040548w>.

- Serino, N., Boari, A., Santagata, G., Masi, M., Malinconico, M., Evidente, A., Vurro, M., 2021. Biodegradable polymers as carriers for tuning the release and improve the herbicidal effectiveness of *Ditrichlo viscosa* plant organic extracts. *Pest Manage. Sci.* 77, 640–658. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.6123>.
- Slaný, M., Jankovič, L., Madejová, J., 2019. Structural characterization of organo-montmorillonites prepared from a series of primary alkylamines salts: Mid-IR and near-IR study. *Appl. Clay Sci.* 176, 11–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2019.04.015>.
- Trezza, M.M., Vidal, R.A., Balbinot Junior, A.A., von Hertwig Bittencourt, H., da Silva Souza Filho, A.P., 2016. Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture. *J. Plant Interact.* 11, 53–60. <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2016.1159342>.
- Visavale, G.L., Nair, R.K., Kamath, S.S., Sawant, M.R., Thorat, B.N., 2007. Gaseoliation and drying of modified clay incorporated pesticide formulation. *Drying Technol.* 25, 1369–1376. <http://dx.doi.org/10.1080/07372930701438980>.
- Vurro, M., Miguel-Rejas, C., Pérez-de laque, A., 2019. Safe nanotechnologies for increasing effectiveness of environmentally friendly natural agrochemicals. *Pest Manage. Sci.* 75, 2403–2412. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5348>.
- Wang, J., Guo, X., 2020. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. *J. Hard Mater.* 390, 122156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122156>.
- Weber, W.J., Morris, J.C., 1963. Kinetics of adsorption on carbon from solution. *J. Sanit. Eng. Div.* 89, 31–59. <http://dx.doi.org/10.1061/JSEDAJ.0000430>.
- Yusá, V., F. Fernández, S., Duvalde, P., López, A., Lacomba, I., Couñilá, C., 2022. Exposure to non-persistent pesticides in the spanish population using biomonitoring: A review. *Environ. Res.* 205, 112437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2021.112437>.

Supplementary Information

Granulated organoclay as a sorbent to protect the allelochemical scopoletin from rapid biodegradation in soil

José Antonio Galán-Pérez, Beatriz Gámiz*, Rafael Celis

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain

***Corresponding Author:** Dr. Beatriz Gámiz

Phone: +34 954624711

E-mail: bgamiz@irnase.csic.es

ORCID:

José Antonio Galán-Pérez: 0000-0002-5819-603X

Beatriz Gámiz: 0000-0002-7244-778X

Rafael Celis: 0000-0002-0548-0774

Table S1. Amount of scopoletin extracted from soil, soil treated with powder or granules of Cloisite 10A, and soil treated with granules of Cloisite 10A preloaded with the allelochemical after different incubation times under laboratory conditions. Different letters within the same row indicate significant differences at the $P < 0.05$ level.

Incubation time (days)	Scopoletin extracted (mg kg^{-1} soil)			
	Soil	Soil + powder	Soil + granules	Soil + preloaded granules
0	8.40 ± 0.27 a	8.88 ± 0.17 a	8.41 ± 0.06 a	8.22 ± 0.08 a
0.3	6.28 ± 0.4 a	8.67 ± 0.23 b	6.93 ± 0.04 a	7.98 ± 0.13 b
1	0 a	6.58 ± 0.26 b	2.44 ± 0.73 c	7.64 ± 0.07 b
2	0 a	1.28 ± 0.20 ab	2.46 ± 0.95 b	7.70 ± 0.12 c
3	0 a	0.50 ± 0.09 a	2.33 ± 0.51 b	7.17 ± 0.21 c
4	0 a	0 a	1.68 ± 0.30 b	6.71 ± 0.15 c
7	0 a	0 a	1.05 ± 0.17 b	5.76 ± 0.09 c

Table S2. Weather data recorded during the field experiment.

Date	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	Average wind speed (m s ⁻¹)	Solar radiation (MJ m ⁻² day ⁻¹)	Watering (mm)
September 27	14.3	30.5	1.4	19.5	6.0
September 28	13.9	29.6	1.6	18.9	3.0
September 29	14.5	32.3	1.7	19.1	3.0
September 30	13.9	31.5	1.2	18.0	0
October 1	15.2	30.3	1.8	17.8	3.0
October 2	14.7	29.0	2.3	18.1	3.0
October 3	12.0	23.1	2.9	8.6	3.8 ^a

^a Natural rainfall



Fig. S1. Picture of the soil plots established for the field experiment.

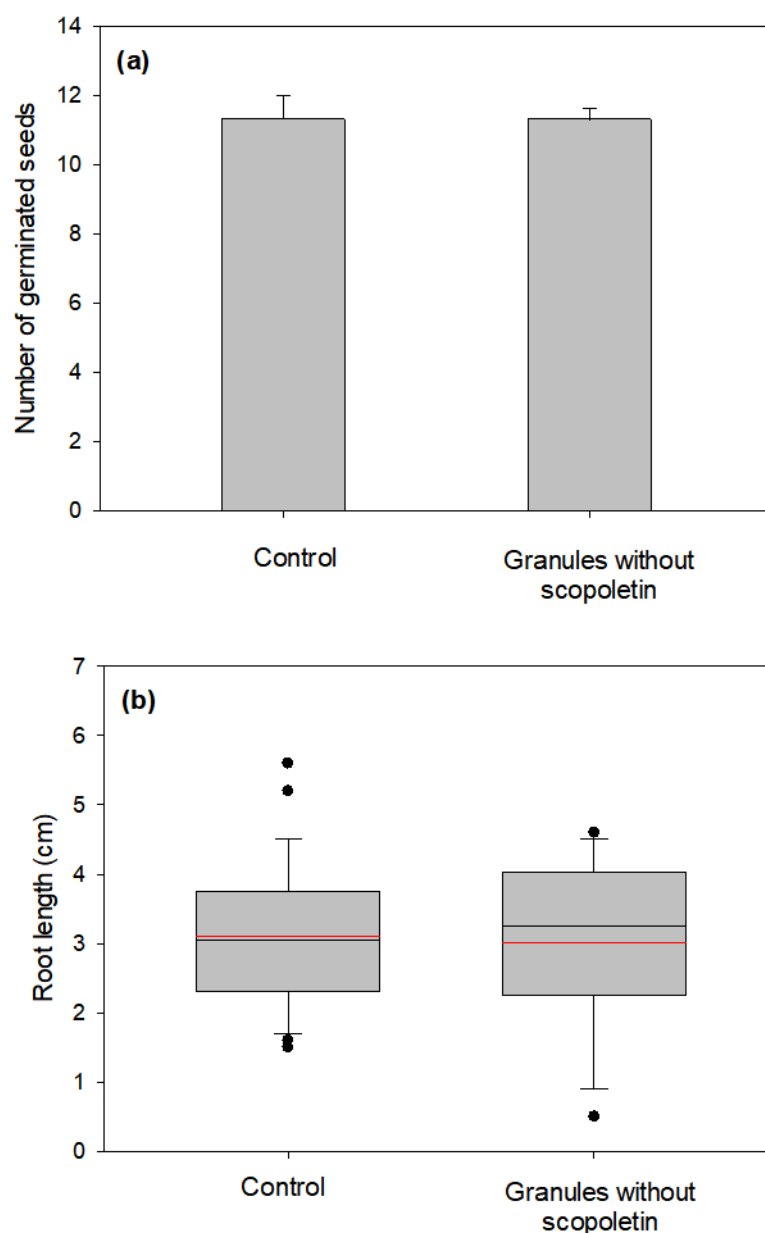


Fig. S2. Effect of granules of the organoclay Cloisite 10A (without scopoletin) on germination (a) and root growth (b) of *Lactuca sativa* L. in soil pots. For the experiment, twelve seeds of *Lactuca sativa* were sown in 20 cm²-surface pots containing 20 g of soil (unamended or amended with organoclay granules at 2%) and incubated in a growth chamber for 7 days. The water content of the soil was adjusted daily to a value of 30% and the experiment was conducted in triplicate pots.

V.4. Artículo IV

Título: Enantiomer-selective characterization of the adsorption, dissipation, and phytotoxicity of the plant monoterpene pulegone in soils

Autores: Jose Antonio Galán¹, Beatriz Gámiz^{1,*}, Ivana Pavlovic², Rafael Celis¹

Afiliación:

¹*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain*

²*Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUIQFN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

Revista: Plants



Editores: Peng Wang, Hua Shao, Weiwei Gao

Editorial: MDPI **Categoría:** Plant Sciences

Factor de Impacto (JCR 2021): 4.658 **Cuartil:** Q1 (39/238)

Volumen: 11 **Artículo:** 1296 **Año de publicación:** 2022

Cita:

GALÁN-PÉREZ J.A., GÁMIZ B., PAVLOVIC I., CELIS R.

Enantiomer-selective characterization of the adsorption, dissipation, and phytotoxicity of the plant monoterpene pulegone in soils. *Plants*, 11, 1296 (2022).

<https://doi.org/10.3390/plants11101296>

Article

Enantiomer-Selective Characterization of the Adsorption, Dissipation, and Phytotoxicity of the Plant Monoterpene Pulegone in Soils

 Jose Antonio Galán-Pérez ¹, Beatriz Gámiz ^{1,*}, Ivana Pavlovic ² and Rafael Celis ¹
¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain; jgalan@irnas.csic.es (J.A.G.-P.); roelis@irnas.csic.es (R.C.)

² Departamento de Química Inorgánica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUQFNI), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain; ivana.pavlovic@uco.es

* Correspondence: bgamiz@irnas.csic.es; Tel.: +34-954-624-711

Abstract: Plant monoterpenes have received attention for their ecological functions and as potential surrogates for synthetic herbicides, but very little is known about the processes that govern their behavior in the soil environment, and even less about the possible enantioselectivity in the functions and environmental behavior of chiral monoterpenes. We characterized the adsorption and dissipation of the two enantiomers of the chiral monoterpene pulgone in different soils, and their phytotoxicity to different plant species through Petri dish and soil bioassays. R- and S-pulegone displayed a low-to-moderate non-enantioselective adsorption on the soils that involved weak interaction mechanisms. Soil incubation experiments indicated that, once in the soil, R- and S-pulegone are expected to suffer rapid volatilization and scarcely enantioselective, biodegradation losses. In Petri dishes, the phytotoxicity of pulgone and its enantioselectivity to *Lactuca sativa*, *Hieracium vulgare*, and *Erucasation* was species-dependent. *Lactuca sativa* was the most sensitive species and showed higher susceptibility to S- than to R-pulegone. Biodegradation and volatilization losses greatly reduced the phytotoxic activity of S-pulegone applied to soil, but the addition of a highly-adsorptive organoclay stabilized the monoterpene and increased its phytotoxic effect. Stabilization by adsorption may represent an important mechanism by which the bioactivity of plant monoterpenes in soils can be increased.

Keywords: allelochemicals; bioherbicides; monoterpenes; organoclays; phytotoxicity; soil



Citation: Galán-Pérez, J.A.; Gámiz, B.; Pavlovic, I.; Celis, R. Enantiomer-Selective Characterization of the Adsorption, Dissipation, and Phytotoxicity of the Plant Monoterpene Pulegone in Soils. *Plants* **2022**, *11*, 1296. <https://doi.org/10.3390/plants11101296>

Academic Editors: Peng Wang, Hua Shao and Weibei Guo

Received: 26 April 2022

Accepted: 30 May 2022

Published: 12 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Allelopathy, the ecological phenomenon by which an organism affects neighboring organisms through the release of biochemicals (allelochemicals), represents an important environment-mediated plant–plant interaction mechanism [1,2]. Plant allelochemicals that reach the soil may directly affect seed germination, cell division, or seedling growth of target plant species, or impact abiotic or biotic soil processes with subsequent effects on the development of target plants [1–3]. In both cases, once in the soil, allelochemicals suffer adsorption, transport, and transformation processes which will ultimately dictate their bioactivity, and its changes with time [4–7].

Adsorption has been described as a key process determining the final fate of plant allelochemicals in the soil [8]. Depending on the mechanism, magnitude, and reversibility of the soil adsorption process, the activity of an allelochemical could decline if its fraction in the soil solution is not maintained at a bioactive level [9]. Transport and degradation losses can also reduce the concentration and bioactivity of allelochemicals in soils [10]. Very often, compounds that are highly phytotoxic under soilless laboratory conditions show much less activity in the presence of the soil, as a result of their rapid biodegradation [9,11,12]. In

fact, the short half-lives that allelochemicals commonly display in soils, which prevents their accumulation in environmental compartments and subsequent effects on non-target organisms [13], represents one of the reasons why plant allelopathy has received the attention of the scientific community as an ecofriendly tool for weed management [9,14]. Allelochemical-based crop protection strategies can help overcome the negative impact of synthetic herbicides on the environment and human health, and deal with herbicide resistance problems [15,16]. Nevertheless, studies on the environmental factors and different interactions that regulate the behavior of allelochemicals in the soil have progressed slowly, and more work is needed to fill this knowledge gap [14,17].

Monoterpenes (C₁₀ hydrocarbons derived from two C₅ isoprene units) constitute a major group of plant allelochemicals [18]. They are volatile organic compounds dominating the composition of many plant essential oils [19,20], particularly in families such as *Pinaceae*, *Umbelliferae*, and *Lamiaceae* [21,22]. One of the most interesting facets of monoterpenes lies in their phytotoxicity, since they have been shown to be potent inhibitors of germination and growth of several plant species [23–25]. Monoterpenes that contain oxygen in their structure have greater water solubility and inhibitory activity than hydrocarbon monoterpenes [23,24,26,27], and, accordingly, have been particularly targeted for their ecological role and potential as surrogates for synthetic herbicides [26].

Pulegone (5-methyl-2-propan-2-ylidenecyclohexan-1-one) is an oxygenated monoterpene and one of the main components in essential oils from species of *Mentha* [28,29]. Different bioactivities have been described for pulegone, such as antifeedant; a biocidal against bacteria, fungi, and yeasts; and insect repellency activity [29–32]. Pulegone has also been shown to display a strong phytotoxic activity, suppressing germination and seedling growth of several plant species, such as *Lactuca sativa* and *Cucumis sativus* [23,24]. Very little is known, however, about the processes governing the behavior of pulegone in soils and about how soil processes can influence its phytotoxic activity. On the other hand, due to the presence of an asymmetric carbon in its structure, pulegone can exist as two enantiomers, R- and S-pulegone (Figure 1), with the R-enantiomer being more abundant in plants than the S-pulegone, but the latter predominating in the essential oils of some species, such as *Agathosma betulina* [33]. R-pulegone has been classified as “extremely active” and “strongly active” for germination and seedling growth of *Lactuca sativa*, respectively [24], and S-pulegone has been found to be less toxic to humans compared to R-pulegone [34]. Accordingly, the enantioselective behavior of this monoterpene should be considered, both to understand its ecological functions, and if intended to be used as a natural herbicide.

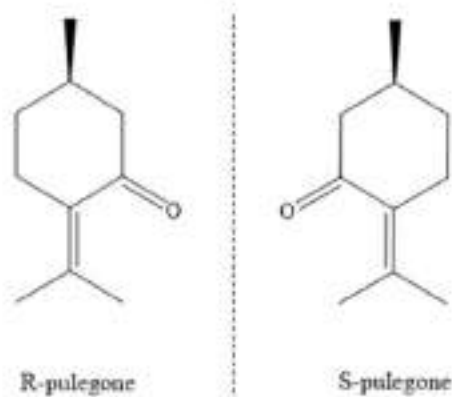


Figure 1. Structure of the two enantiomers of pulegone.

Given that monoterpenes are, in general, labile in the environment, their activities may be constrained by their susceptibility to volatilize [35] and by their short-half-lives in soils [6,31]. On the starting hypothesis that a deep understanding of the soil processes that

dictate the behavior of monoterpenes in the soil environment will help a better assessment of their real ecological function and potential as ecofriendly herbicides, the objectives of this work were: (i) to characterize the adsorption and dissipation of the two enantiomeric forms of the monoterpene pulegone in soils with different physicochemical characteristics; (ii) to assess their phytotoxicity to different plant species through Petri dish and soil bioassays; and (iii) to demonstrate that reducing the dissipation losses of pulegone by enhancing the soil adsorption process can increase its phytotoxic activity and may represent a mechanism by which the bioactivity of monoterpenes in the soil environment can be potentiated.

2. Results and Discussion

2.1. Adsorption of Pulegone on the Soils and Model Soil Constituents

The adsorption coefficients for (R+S)-pulegone on the soils (K_d), their organic carbon-normalized values (K_{oc}), and the fraction of R-enantiomer (EF) measured in the aqueous phase after adsorption are compiled in Table 1. EF values in the range 0.497–0.503 revealed that the initial rac-pulegone solution (EF = 0.5) remained racemic after equilibration with the soils. This indicated that adsorption was a non-enantioselective process, with R-pulegone being adsorbed to the same extent as S-pulegone. Even though soils are known to contain chiral mineral and organic constituents with the potential to display selective affinities for enantiomeric forms of organic molecules [36,37], batch adsorption studies rarely reveal this phenomenon [38–42]. A possible explanation is that soil adsorption sites displaying no or little enantiomeric selectivity may predominate over enantiomer selective sites. An alternative explanation is that a high heterogeneity of soil adsorption sites could lead to global compensation of the enantioselective processes that might be occurring at the microscale, resulting in an apparent lack of enantioselectivity at the macroscopic scale at which adsorption is evaluated, using the batch equilibration procedure [43].

Table 1. Soil properties and coefficients for rac-pulegone adsorption.

Soil	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	CaCO ₃ (%)	Organic C (%)	pH	K_d (L/kg)	K_{oc} ¹ (L/kg)	EF ²	Des ³ (%)
1	83	6	11	6.4	0.35	8.5	0.31 ± 0.11	89	0.498	108 ± 25
2	74	4	22	0.6	0.17	8.0	0.32 ± 0.02	94	0.497	90 ± 6
3	66	23	11	0.7	0.99	5.2	1.02 ± 0.01	103	0.503	96 ± 7
4	63	19	18	17.9	1.18	8.4	0.63 ± 0.07	53	0.497	102 ± 5
5	57	24	19	3.6	0.85	8.3	0.73 ± 0.03	86	0.499	89 ± 7
6	55	36	9	n.d. ⁴	0.71	6.3	0.52 ± 0.02	73	0.501	106 ± 7
7	25	45	31	22.6	0.53	8.6	0.78 ± 0.03	147	0.498	90 ± 3
8	9	26	65	17.2	1.12	8.4	1.31 ± 0.03	117	0.498	67 ± 2

¹ K_d value normalized to the organic carbon content of the soil; ² Fraction of R-enantiomer in the equilibrated solution; ³ Percent of pulegone desorbed; ⁴ Not detected.

Since the adsorption of pulegone on the soils was non-enantioselective, the K_d values for the R- and S-pulegone enantiomers coincided with those given in Table 1 for (R+S)-pulegone. K_d values, ranging between 0.31 and 1.31 L/kg, indicated a low to moderate affinity of R- and S-pulegone for the soils and were comparable to those previously reported for the oxygenated monoterpene carvone in similar soil samples [6]. Linear correlations with soil properties (Supplementary Materials, Table S1) revealed a lack of statistically significant relationships between the K_d values and the silt, clay, carbonate, or pH of the soils, but significant correlations between the K_d values and the organic carbon ($r = 0.735$, $p = 0.038$) and sand ($r = -0.766$, $p = 0.027$) contents, even though these two soil properties were not significantly intercorrelated ($r = -0.415$, $p = 0.306$). As the negative relationship with the sand content of the soils implied a positive relationship with their silt + clay content, we concluded that organic matter (OM) together with the minerals present in the fine (silt/clay) fraction could both have been important in the adsorption of R- and S-pulegone by the tested soils. On the other hand, the extensive desorption of the enantiomers (% Des), measured in an extraction step conducted with methanol immediately after the

adsorption experiment (Table 1), reflected that weak interaction mechanisms operated in the binding of R- and S-pulegone to the soils.

Additional insight into the contribution of different soil constituents to the adsorption of R- and S-pulegone was obtained from the use of model soil constituents (Figure 2). As found for the soils, the adsorption of pulegone was non-enantioselective and, thereby, the K_d values reported in Figure 2 for (R+S)-pulegone accurately represented those corresponding to the individual R- and S-pulegone enantiomers. Interestingly, the K_d values obtained for the organic constituents (HA-acid form and HA-sodium salt, $K_d = 61\text{--}163\text{ L/kg}$) were about 10–20 times greater than those obtained for the mineral constituents (SWy-2, IMt-1, KGa-2, Ferrih; $K_d = 7.4\text{--}8.8\text{ L/kg}$). This supported the importance of soil OM as a major contributor to the adsorption of pulegone enantiomers, but also revealed that the role of soil minerals typically existing in the fine (silt/clay) fraction may become relevant in low OM content soils rich in silt and clay. Using an organic carbon to OM conversion factor of 1.7 to calculate the OM content, we obtained that the silt + clay content of the soils used in this study was between 20 (soil 4) and 90 (soil 2) times greater than their OM content (Table 1). This would explain a relevant contribution of the minerals present in the fine (silt/clay) fraction to the adsorption of pulegone enantiomers, as suggested by the outcomes of the correlation analysis.

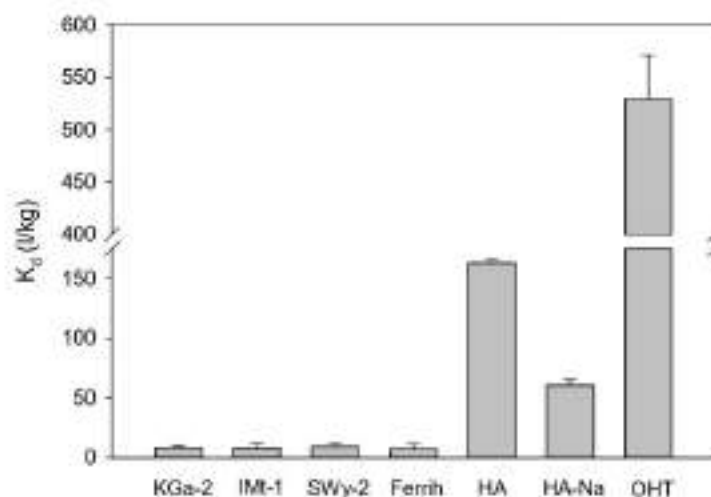


Figure 2. Distribution coefficients for mac-pulegone on model soil constituents and on OHT. KGa-2: Georgia kaolinite; IMt-1: Morviana illite; SWy-2: Wyoming montmorillonite; Ferrih: ferrihydrite; HA: humic acid (acid form); HA-Na: humic acid (sodium salt); OHT: olefin-modified hydrotaclite.

2.2. Soil Dissipation

Under conditions preventing volatilization losses (hermetically sealed tubes), R- and S-pulegone dissipated rapidly in non-autoclaved soils, while showing a high stability in autoclaved soils (Figure 3). This behavior was indicative that microbial processes, rather than non-microbial ones, governed the degradation of R- and S-pulegone in the soils. In all non-autoclaved soils, R- and S-pulegone dissipated, following sigmoidal curves, to negligible residual concentrations at the end of the experiment. Accordingly, a three parameter-sigmoidal equation (Equation (3)) accurately described the experimental dissipation data ($R^2 > 0.993$) and was used to calculate the time required for the concentration of R- or S-pulegone to decrease to half of their initial concentration (DT_{50}) (Figure 3, Supplementary Materials, Table S2). Sigmoidal dissipation patterns are typical of compounds at relatively high concentrations in soil that are utilized as energy and carbon sources by soil microorganisms [44].

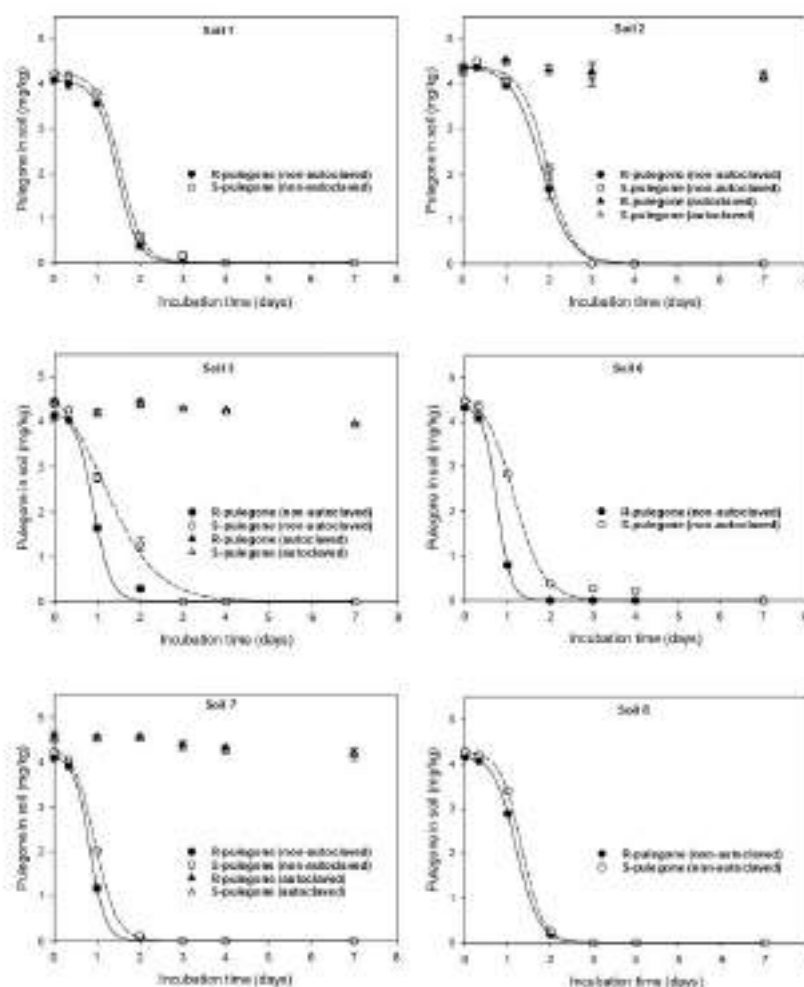


Figure 3. Dissipation patterns of R- and S-pulegone in non-autoclaved and autoclaved soils. Symbols indicate experimental data points whereas lines correspond to the fits of a sigmoidal three-parameter equation to the experimental data. Error bars denote standard errors of triplicate measurements.

The different properties of the soils had little impact on both the DT_{50} values of R- and S-pulegone ($DT_{50} = 0.76$ – 1.96 days) and the scarce enantioselectivity of the biodegradative processes. Nevertheless, the R-enantiomer appeared to be degraded faster than the S-enantiomer in some soils, particularly in the acid ones (Figure 3). In an earlier study, Camiz et al. [6] compared the dissipation of the oxygenated monoterpene carvone in acid and alkaline soils, and assessed the effect of acidifying the alkaline soil on the rate and enantioselectivity of the dissipation process. Contrasting with the results obtained here for pulegone, soil acidity made the biodegradation of carvone slower and less enantioselective, which suggests that small differences in the structure of monoterpenes can significantly impact their biodegradation patterns in soil.

The effect of different factors on the dissipation of R- and S-pulegone in non-autoclaved soil 2 was also assessed (Supplementary Materials, Figure S1). The initial concentration, soil water content, temperature, and aeration all affected the dissipation rate. The effects were

similar on both enantiomers, with a reduced dissipation rate at higher initial enantiomer concentration, at very high (40%), or limited (10%) soil humidity, and at low temperature (4 °C), probably reflecting the effect of these parameters on the activity of the soil microbial degraders. For example, under incubation conditions of 25 °C and 30% soil water content in sealed tubes, 3 days after treatment the residues of R- and S-pulegone applied at 5 mg/kg to the soil had become negligible. In contrast, they remained close to 70% of the amount initially added when the application dose was increased to 20 mg enantiomer/kg soil, to 25% when the soil water content was increased to 40%, and to 100% when the temperature was reduced to 4 °C (Supplementary Materials, Figure S1). Interestingly, a comparison of the dissipation patterns of S- and R-pulegone in open versus hermetically closed tubes revealed significantly higher losses of both enantiomers in the open tubes (Supplementary Materials, Figure S1). After 24 h, for example, losses increased from 10% in sealed tubes to 40% in open tubes. We attributed this effect to volatilization, which is known to represent a major dissipation route for monoterpenes in the environment [45,46].

2.3. Petri Dish Phytotoxicity Tests

The results obtained in the phytotoxicity tests of R- and S-pulegone to *Lactuca sativa*, *Erica sativa*, and *Hordeum vulgare* conducted in Petri dishes are summarized in Table 2. The dose-response curves for the effect of each enantiomer on germination, root length, and shoot biomass of each plant species are detailed in Figure S2 of the Supplementary Materials. We observed that the phytotoxicity of pulegone and its enantioselectivity was species-dependent. For all germination and growth parameters studied, IC_{50} values increased in the order: *Lactuca sativa* \leq *Hordeum vulgare* < *Erica sativa* for both enantiomers (Table 2). *Erica sativa* was the least sensitive species to R- and S-pulegone and displayed a characteristic hormetic response, by which R- and S-pulegone at concentrations around 100 mg/L stimulated the root growth (Supplementary Materials, Figure S2) [47,48]. This effect was not observed for *Lactuca sativa* or *Hordeum vulgare* (Supplementary Materials, Figure S2). On the other hand, the S-enantiomer of pulegone was noticeably more phytotoxic than the R-enantiomer to *Lactuca sativa* but not to the other two species. The lowest IC_{50} was observed for the effect of S-pulegone on the shoot biomass of *Lactuca sativa*, $IC_{50} = 11$ mg/L, a value 3 and 20 times lower than those obtained for *Hordeum vulgare* and *Erica sativa*, respectively (Table 2). The activity of monoterpenes has previously been reported to be species-selective, even within the same family or genus [24], and enantiomer-selective phytotoxic effects have been observed for other chiral monoterpenes, such as carvone and citronellal [26].

Table 2. Inhibitory concentrations (IC_{50}) of R-pulegone and S-pulegone required to reduce germination, root length, and shoot biomass of *Lactuca sativa*, *Hordeum vulgare*, and *Erica sativa* to 50% after 5 days of exposure in Petri dishes.

	IC_{50} Germination (mg/L)		IC_{50} Root Length (mg/L)		IC_{50} Shoot Biomass (mg/L)	
	R-Pulegone	S-Pulegone	R-Pulegone	S-Pulegone	R-Pulegone	S-Pulegone
<i>Lactuca sativa</i>	60 ± 5	19 ± 1	37 ± 2	14 ± 1	25 ± 2	11 ± 1
<i>Hordeum vulgare</i>	55 ± 21	44 ± 9	56 ± 27	29 ± 7	35 ± 9	29 ± 6
<i>Erica sativa</i>	312 ± 16	320 ± 21	-	-	257 ± 22	256 ± 17

2.4. Soil Bioassay: Effect of Oleate-Modified Hydrated Silica as a Soil Improver

Based on the results of the bioassay conducted in Petri dishes, the S-enantiomer of pulegone and *Lactuca sativa* were selected as the best system to observe phytotoxic effects under soil conditions. The results of the phytotoxicity tests conducted with S-pulegone applied to soil 2 at a dose of 12 kg/ha are summarized in Figure 4. Considering the water content of the soil during the bioassay (30%), an application dose of 12 kg/ha corresponded to an initial aqueous concentration of 400 mg/L, i.e., the highest concentration tested in the Petri dish bioassay (Supplementary Materials, Figure S2). This concentration was 20 to

40 times greater than the IC_{50} values measured for S-pulegone on germination and seedling growth parameters of *Lactuca sativa* in the Petri dish bioassay (Table 2).

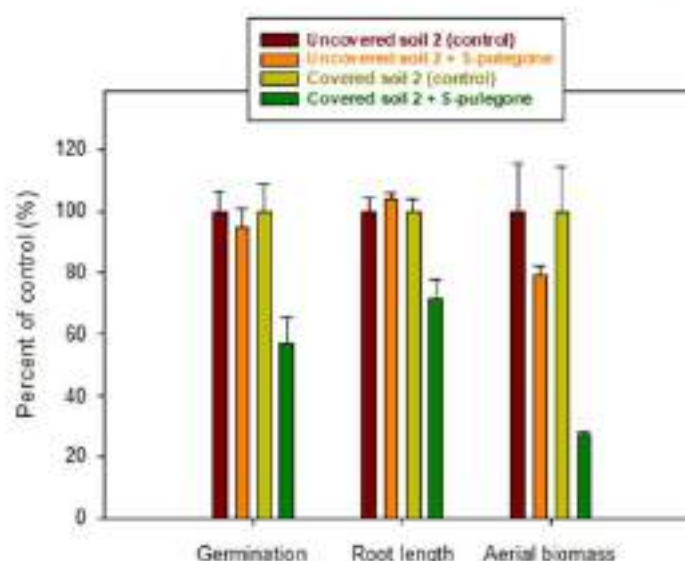


Figure 4. Effect of S-pulegone applied at 12 kg/ha on germination, root length, and aerial biomass of *Lactuca sativa* sown in pots filled with soil 2. The effect of covering the soil pots with plastic films to reduce volatilization losses of S-pulegone is shown in the graphs. Error bars correspond to the standard errors of triplicate measurements.

Figure 4 shows that the phytotoxicity of S-pulegone under soil conditions decreased drastically compared to that observed in the Petri dish study. Applied to soil pots, S-pulegone did not affect the germination or root growth of *Lactuca sativa*, and reduced only slightly the emerged seedling aerial biomass. According to the distribution coefficients reported in Table 1, adsorption was expected to reduce the bioavailable concentration of S-pulegone in the soil's aqueous phase from 400 to 200 mg/L, a value still well above the IC_{50} of S-pulegone on *Lactuca sativa* germination and seedling growth ($IC_{50} = 11\text{--}19$ mg/L, Table 2). We concluded that rapid biodegradation and volatilization losses (Figures 3 and S1) drastically reduced the phytotoxicity of S-pulegone applied to the soil. The effect of volatilization was evidenced by the finding that covering the soil pots with plastic films led to a significant increase in phytotoxicity (Figure 4).

On the assumption that a reduction in the biodegradation and volatilization losses of S-pulegone could lead to a better expression of its phytotoxicity, we assayed the addition of a highly adsorptive organoclay material (OHT) as a strategy to stabilize the monoterpene in the soil through an enhancement in the adsorption process. Organically modified clays are known to be very good adsorbents of organic compounds [49] and have previously been successfully applied to increase the soil persistence of allelochemicals by protecting them from rapid leaching and degradation losses [50,51]. OHT was selected here for displaying a particularly high affinity for pulegone compared to similar organoclays (Supplementary Materials, Figure S3). The K_d value of pulegone on OHT ($K_d = 525$ L/kg, Figure 1) was three orders of magnitude greater than that on soil 2 ($K_d = 0.32$ L/kg, Table 1), whereby being applied at 1%, the material was expected to produce a 16-fold increase in the adsorption (K_d) of pulegone by the soil. Figure 5 shows that the addition of OHT indeed reduced the biodegradation and volatilization losses of S-pulegone in soil 2, and Figure 6 shows how this resulted in an enhanced expression of its phytotoxicity in the soil.

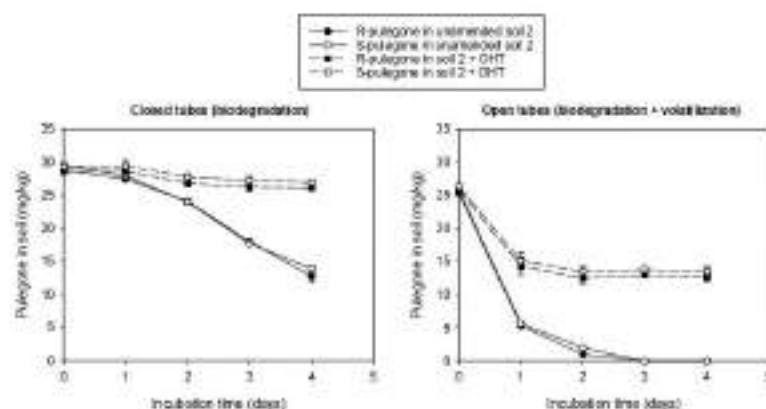


Figure 5. Dissipation curves of R- and S-pulegone in unamended and OHT-amended soil 2, measured in closed and open tubes. Error bars correspond to the standard errors of triplicate measurements.

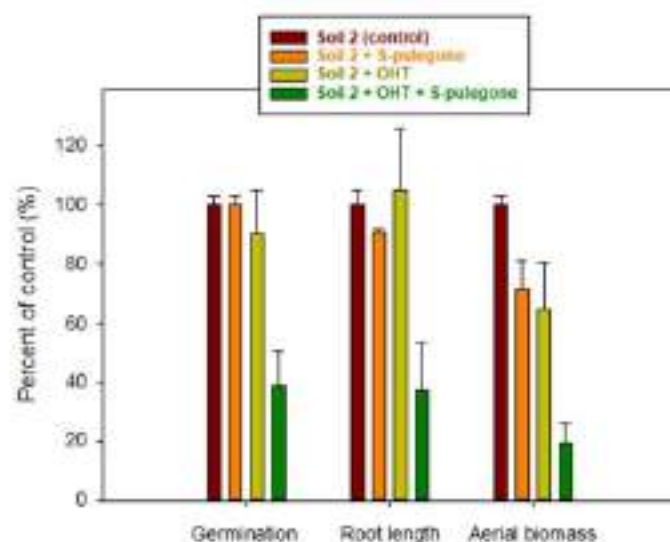


Figure 6. Effect of S-pulegone applied at 12 kg/ha on germination, root length, and aerial biomass of *Lactuca sativa* sown in non-covered pots filled with unamended and OHT-amended soil 2. Error bars correspond to the standard errors of triplicate measurements.

3. Materials and Methods

3.1. Pulegone, Soils, Model Soil Constituents, and Adsorbent Material

R- and S-pulegone (Figure 1) were purchased as enantiopure compounds (purity > 98%) from Merck (Madrid, Spain). Pulegone enantiomers have a molecular mass of 152.2, a vapor pressure of 17 Pa at 25 °C [52], and a water solubility close to 400 mg/L [27]. The racemic (rac) aqueous solutions of pulegone used in the adsorption and dissipation experiments were obtained by diluting a stock rac-pulegone aqueous solution containing 200 mg/L of each enantiomer. The enantiopure pulegone aqueous solutions used in the bioassays were obtained from 400 mg/L individual stock solutions of R- or S-pulegone prepared in water.

Eight soil samples from southern Spain were selected for the study. All of them were collected from a 0–20 cm soil depth. Once in the lab, the soil samples were air-dried, sieved (2 mm), and kept at 4 °C until used. Their main properties are included in Table 1. The texture

of the soil samples was determined by the hydrometer method [53], their carbonate content by the pressure calcimeter method [54], and their organic carbon content by dichromate oxidation [55]. The pH values were measured in 4 g/10 mL soil: water slurries.

The model soil constituents used were three phyllosilicates (SWy-2 montmorillonite, IMt-1 illite, and KGa-2 kaolinite), a two-line ferrihydrite (Ferrih), and two humic acids (HA-acid form and HA-sodium salt). The phyllosilicates were supplied by The Clay Minerals Society (CMS, Chantilly, VA, USA) and their properties are available at the CMS webpage [56]. The two-line ferrihydrite was prepared by precipitating a $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ solution with NaOH, as described in Cruz-Guzmán et al. [57]. The humic acid samples were provided by Merck (Spain) and had organic carbon contents of 40.1% (HA-acid form) and 33.3% (HA-sodium salt).

The adsorbent material used as a soil modifier was an oleate-modified hydrotalcite (OHT), prepared by the reconstruction method commonly employed to obtain organo-hydrotalcites [49]. The preparation procedure is described in Gámiz et al. [40] and schematized in Figure S4 of the Supplementary Materials. Briefly, 50 g of commercial hydrotalcite (ref. 652288, Merck, Spain) was heated for 2 h at 500 °C, and then added to a solution containing 75 g of sodium oleate (ref. 26125, Merck, Spain) pre-dissolved in 1.5 l of water at a temperature of 60 °C. The suspension was stirred at 60 °C for 24 h and then filtered to recover the OHT solid sample. The analysis of OHT revealed a carbon content of 30.0% and a basal spacing value of 34.0 Å (Supplementary Materials, Figure S4).

3.2. Adsorption-Desorption Experiments

The adsorption of pulegone on the soil samples was measured in 14 mL-glass centrifuge tubes by equilibrating in an end-over-end shaker (24 h) 3 g of soil with 8 mL of a racemic solution of pulegone containing 1 mg/L of each enantiomer. In order to avoid biodegradation losses of pulegone, the soils were pre-autoclaved three times at 121 °C and 200 kPa for 20 min before the experiment [9]. After equilibration, the tubes were centrifuged (15 min at 2000 × g) and 6 mL of the supernatant solutions were removed, stabilized with methanol (6 mL), filtered (GHP Acrodisc, 0.45 µm, Pall Corp. Madrid, Spain), and analyzed by HPLC to determine the individual concentrations of R-pulegone and S-pulegone remaining in solution. The amount of each enantiomer adsorbed by the soil was calculated from the difference between its initial and final concentration in solution. Control solutions (without soil) indicated that losses of the monoterpene as a result of processes other than adsorption to the soils were negligible. The adsorption of R- and S-pulegone on the model soil constituents and on OHT was measured following an identical methodology, but using 40 mg of adsorbent.

Desorption from the soils was evaluated by replacing the supernatant solution that was removed for the adsorption analysis with 8 mL of methanol. Subsequently, the tubes were re-equilibrated by shaking (24 h), centrifuging, filtering, and the concentrations of R- and S-pulegone in the extracts (C_{ext}) were measured by HPLC. The amount of pulegone desorbed was expressed as a percentage of that previously adsorbed (% Des).

3.3. Soil Dissipation Experiments

The dissipation of pulegone in selected soils was studied through an incubation experiment conducted in 14 mL-glass centrifuge tubes, where 3 g of soil (non-autoclaved or autoclaved, according to the conditions detailed in Section 3.2) were treated with 0.9 mL of a solution of rac-pulegone containing 15 mg/L of each enantiomer. This yielded an initial (R+S) pulegone concentration in soil of 9 mg/kg and a soil humidity of 30%. Independent triplicate tubes were prepared, hermetically sealed, and incubated at 25 ± 1 °C in the dark to be removed from the incubator at selected times. Immediately after being removed, the tubes were frozen for subsequent extraction. For extraction, each tube was treated with methanol (8 mL), shaken for 24 h, centrifuged (15 min at 2000 × g), and the supernatant was filtered and analyzed by HPLC to determine the concentration of R-pulegone and S-pulegone. This extraction procedure yielded recoveries >90% for the tested

soils. For soil 2, we also evaluated the influence of the initial concentration of rac-pulegone (2, 9, or 40 mg/kg soil), the soil water content (40, 30, 10%), temperature/aeration (4 °C/non-aerated, 25 °C/non-aerated, 25 °C/aerated), and the addition of OHT at a rate of 1% on the pulegone enantiomers' dissipation patterns. The methodology used for these treatments is detailed in the Supplementary Materials (Text S1).

3.4. Bioassays

We first compared the phytotoxicity of R- and S-pulegone to two dicot (*Lactuca sativa* and *Erica sativa*), and one monocot (*Hordeum vulgare*) plant species, using a bioassay conducted in 9 cm-diameter Petri dishes. Each Petri dish contained one layer of filter paper as a support, 12 seeds of the dicots, or 9 seeds of the monocot, supplied by Vilmorin (France), and 6 mL of an enantiopure aqueous solution of R- or S-pulegone at concentrations between 0 (control) and 400 mg/L. Each treatment was conducted in triplicate Petri dishes, which were hermetically sealed and incubated in a germination chamber at 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ humidity, and 16:8-h light: dark photoperiod. After 5 days, we measured the number of germinated seeds, the radicle length for each seed, and the shoot biomass for each Petri dish, and expressed them as a percent of the values obtained for the control.

Based on the results obtained in the phytotoxicity tests conducted in Petri dishes, the S-enantiomer of pulegone and *Lactuca sativa* were selected as an optimum system to assess the phytotoxic activity of pulegone under soil conditions, as well as its changes by the addition of OHT as a soil modifier. The soil bioassay was conducted in plastic pots (60 cm³) containing 30 g of sea sand under a layer of 20 g of soil 2, either unamended or amended with 0.2 g of OHT. Triplicate soil pots were treated with 6 mL of a 400 mg/L solution of S-pulegone, to give an S-pulegone application dose of 12 kg/ha and a soil water content of 30%. Controls consisted of triplicates of unamended- or amended-soil pots treated identically, but without S-pulegone. Immediately after the application of the S-pulegone solution (or 6 mL of water for the controls), 12 seeds of *Lactuca sativa* were homogeneously distributed on the soil surface and the pots were incubated in the germination chamber for 7 days. During the experiment, the soil moisture content was re-adjusted daily to the value of 30%. At $t = 7$ days, the number of germinated seeds, and their root length and aerial biomass, were measured and expressed as a percentage of the values obtained for the control pots.

3.5. Analysis of Pulegone

The analysis of pulegone was carried out by HPLC using a Chiralpak IG column of 150 mm length and 4.6 mm internal diameter packed with amylose tris(3-chloro-5-methylphenyl)carbamate as a stationary phase (5 µm particle size), which allowed us to resolve the R and S enantiomers. The mobile phase was 50:50 (v/v) water: acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min and quantification was carried out from the absorbance at 254 nm. Four standard solutions of rac-pulegone containing individual enantiomer concentrations between 0.1 and 6 mg/L in 50:50 (v/v) water: methanol as a solvent were used to obtain separate calibration curves for the R- and S-enantiomers of pulegone. The order of elution was elucidated by injecting enantiopure solutions of R-pulegone and S-pulegone under identical chromatographic conditions, which showed a retention time of 8.3 min for the R-enantiomer and 9.1 min for the S-enantiomer (Supplementary Materials, Figure S5).

3.6. Data Treatment

The adsorption distribution coefficients, K_d , for pulegone (R+S) on the soils, model soil constituents, and OHT were determined as:

$$K_d = \frac{C_{ads}}{C_{aq}} \quad (1)$$

where C_{aq} (mg/L) corresponded to the total (R+S) concentration of pulegone in solution after equilibration and C_{ads} (mg/kg) to the total amount (R+S) of pulegone adsorbed.

To assess the possibility of preferential adsorption of one enantiomer over the other, the fraction of R-enantiomer (EF) in the equilibrated solutions was compared with that of the initial rac-pulegone solution (EF = 0.5) using the expression [58]:

$$EF = \frac{C_{aq}(R)}{C_{aq}(R) + C_{aq}(S)} \quad (2)$$

where $C_{aq}(R)$ and $C_{aq}(S)$ were the aqueous concentrations of R-pulegone and S-pulegone, respectively. Values of $EF \neq 0.5$ would indicate the predominance of one enantiomer over the other in the aqueous phase after equilibration, and hence adsorption enantioselectivity.

Based on the dissipation patterns obtained for R- and S-pulegone in the soils, dissipation data were fit by the sigmoidal three-parameter equation available in SigmaPlot (v. 14.5, Berlin, Germany) for Windows:

$$C = \frac{C_0}{1 + e^{-\frac{t - DT_{50}}{b}}} \quad (3)$$

where C (mg/kg) is the concentration of R- or S-pulegone in soil at time t (days), DT_{50} (days) is the time required for the concentration of R- or S-pulegone to decrease to half of their initial concentration (C_0), and b defines the shape of the sigmoidal fit [59].

In the Petri dish bioassays, the three-parameter log-logistic equation of Sigma Plot 14.5 for Windows was used to perform a curve fit to the experimental data and to obtain the concentration of R- and S-pulegone needed to reduce the number of germinated seeds, radicle lengths, or shoot biomass to 50% of the control (IC_{50}):

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^b} \quad (4)$$

where y and a represent the germinated seeds, radicle length, or shoot biomass (% of the control) at a specific concentration (x) of R- or S-pulegone (mg/L) and at $x = 0$, respectively [60].

Standard errors were employed to express variability among replicates. Bioassay data were subjected to one-way ANOVA and subsequent post hoc tests (Tukey's HSD) for pairwise comparison between treatments. Significant differences were established at 95% confidence level.

4. Conclusions

At the macroscopic scale at which it was evaluated by the batch equilibration procedure, the adsorption of R- and S-pulegone by the soils and model soil constituents selected for the present study was a non-enantioselective process involving weak interaction mechanisms. Even though R- and S-pulegone displayed greater affinity for pure organic soil constituents than for mineral ones, the minerals present in the fine (silt/clay) fraction of the tested soils appeared to contribute significantly to the adsorption process, probably because of the low organic matter content of the soils. According to the soil K_d (0.31–1.31 L/kg) and K_{oc} (53–147 L/kg) values obtained, pulegone enantiomers can be classified as high to very high mobile compounds [61].

Once in the soil, R- and S-pulegone are expected to suffer rapid volatilization and microbial-mediated degradation losses rather than chemical degradation reactions. Soil biodegradation patterns strongly indicated the utilization of both enantiomers as energy and carbon sources by soil microorganisms. Although both R- and S-pulegone degraded quickly in all soils, the R-enantiomer appeared to be degraded even faster than the S-enantiomer in some soils, particularly in acid soils.

Under Petri-dish conditions, the phytotoxicity of pulegone and its enantioselectivity to different plants (*Lactuca sativa*, *Hordeum vulgare*, and *Eruca sativa*) was species-dependent. *Lactuca sativa* was the most sensitive species to pulegone enantiomers and displayed higher susceptibility to the S- than to the R-enantiomer. Soil bioassays showed that biodegradation and volatilization losses are likely to reduce considerably the phytotoxicity of S-pulegone under field conditions. However, enhancing the adsorption of S-pulegone through the

addition of a highly adsorptive organoclay succeeded to reduce the biodegradation and volatilization losses and increase the activity of S-pulegone in soil. Stabilization by their adsorption on suitable matrixes may represent a promising tool to increase the bioactivity of monoterpenes in soil and could allow taking better advantage of their activities in their use as ecofriendly surrogates for synthetic pesticides.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants11101296/s1>, Text S1: Description of the different treatments conducted to assess the effect of different factors on the dissipation of pulegone enantiomers in non-sterilized soil 2; Table S1: Pearson correlation coefficients between the pulegone K_d values on the soils and soil properties; Table S2: Parameters of pulegone dissipation data in non-autoclaved soils; Figure S1: Effect of the application rate, soil water content, and temperature/aeration on the dissipation of R- and S-pulegone in soil 2; Figure S2: Dose–response curves of R- and S-pulegone; Figure S3: Distribution coefficients for rac-pulegone on different organoclays; Figure S4: Schematic representation of the oleate-modified hydrotakite sample (OHT); Figure S5: Chromatogram of a standard solution of rac-pulegone.

Author Contributions: Conceptualization, B.G. and R.C.; methodology, B.G., I.P. and R.C.; formal analysis, J.A.G.-P., B.G. and R.C.; investigation, J.A.G.-P.; resources, I.P. and R.C.; data curation, J.A.G.-P., B.G. and R.C.; writing—original draft preparation, J.A.G.-P., B.G. and R.C.; writing—review and editing, B.G., I.P. and R.C.; visualization, J.A.G.-P., B.G. and R.C.; supervision, B.G., I.P. and R.C.; project administration, R.C.; funding acquisition, R.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCIN/AEI/10.13039/501100011033), through grants AGL2017-82141-R, co-financed with EU (FEDER) funds, and PID2020-112563-B00. J.A. Galán-Pérez also thanks MCIN for a predoctoral contract (grant PRE2018-083293) linked to project AGL2017-82141-R and co-financed with EU (FSE) funds.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and the Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors thank G. Forcada for technical help during the synthesis of the organoclay.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Scavo, A.; Abbate, C.; Mauronicale, G. Plant allelochemicals: Agronomic, nutritional and ecological relevance in the soil system. *Plant Soil* **2019**, *442*, 23–48. [\[CrossRef\]](#)
2. Inderjit; Weiner, J. Plant allelochemical interference or soil chemical ecology? *Perspect. Plant Evol. Ecol. Syst.* **2001**, *4*, 3–12. [\[CrossRef\]](#)
3. Scavo, A.; Mauronicale, G. Crop allelopathy for sustainable weed management in agroecosystems: Knowing the present with a view to the future. *Agronomy* **2021**, *11*, 2104. [\[CrossRef\]](#)
4. Karamanoli, K.; Ainalidou, A.; Boszoukka, F.; Vekou, D. Decomposition profiles of leaf essential oils in the soil environment. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 397–401. [\[CrossRef\]](#)
5. Kobayashi, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol. Manag.* **2004**, *4*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
6. Galán-Pérez, J.A.; Hermosín, M.C.; Celis, R. Appraising factors governing sorption and dissipation of the monoterpene carvone in agricultural soils. *Geoderma* **2018**, *321*, 61–68. [\[CrossRef\]](#)
7. Reigosa, M.J.; Sánchez-Moreiras, A.; González, L. Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1999**, *18*, 577–608. [\[CrossRef\]](#)
8. Tharayil, N.; Bhowmik, P.C.; Xing, B. Preferential sorption of phenolic phytotoxins to soil: Implications for altering the availability of allelochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3033–3040. [\[CrossRef\]](#)
9. Galán-Pérez, J.A.; Galán, B.; Celis, R. Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants. *Biol. Fertil. Soils* **2021**, *57*, 643–655. [\[CrossRef\]](#)
10. Xiao, Z.; Le, C.; Xu, Z.; Gu, Z.; Lv, J.; Shamsi, I.H. Vertical leaching of allelochemicals affecting their bioactivity and the microbial community of soil. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7847–7853. [\[CrossRef\]](#)

11. Bertin, C.; Harmon, R.; Akaogi, M.; Weidenhamer, J.D.; Weston, L.A. Assessment of the phytotoxic potential of *m*-tyrosine in laboratory soil bioassays. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 1288–1294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Travaini, M.L.; Sosa, G.M.; Ceccarelli, E.A.; Walter, H.; Cantrell, C.L.; Carrillo, N.J.; Dayan, F.E.; Meepagala, K.M.; Duke, S.O. Khellin and visnagin, furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as potential bioherbicides. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 9475–9487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sołtys, D.; Krasuska, U.; Bogatek, R.; Gniazdowska, A. Allelochemicals as Bioherbicides—Present and Perspectives. In *Herbicides—Current Research and Case Studies in Use*; Prier, A.J., Kellon, J.A., Eds.; Intech: London, UK, 2013; pp. 517–542.
14. Macías, F.A.; Mejías, F.J.R.; Molinillo, J.M.G. Recent advances in allelopathy for weed control: From knowledge to applications. *Pest Manag. Sci.* **2019**, *75*, 2413–2436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bravetti, M.M.d.M.; Carpinella, M.C.; Palacios, S.M. Phytotoxicity of *Cordia Speciosa* extract, active principles, degradation in soil and effectiveness in field tests. *Chemosphere* **2020**, *30*, 35–24. [[CrossRef](#)]
16. Jabran, K.; Mahajan, G.; Sardana, V.; Chauhan, B.S. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Prot.* **2015**, *72*, 57–65. [[CrossRef](#)]
17. Trezzi, M.M.; Vidal, R.A.; Balbinot Junior, A.A.; von Hertwig Bittencourt, H.; Filho, A.P.d.S.S. Allelopathy: Driving mechanisms governing its activity in agriculture. *J. Plant Interact.* **2016**, *11*, 53–60. [[CrossRef](#)]
18. Zhou, B.; Kong, C.H.; Wang, P.; Li, Y.H. Chemical constituents of the essential oils of wild oat and crabgrass and their effects on the growth and allelochemical production of wheat. *Weed Biol. Manag.* **2013**, *13*, 62–69. [[CrossRef](#)]
19. Chalkos, D.; Karamanoli, K.; Vokou, D. Monoterpene enrichments have positive impacts on soil bacterial communities and the potential of application in bioremediation. *Plants* **2021**, *10*, 2536. [[CrossRef](#)]
20. Zhou, S.; Zou, T.; Mei, Y.; Lei, L.; Shi, K.; Zou, T.; Zhang, C.; Shao, H. Allelopathic effect of *Senpidium kashgaricum* (Krasch.) Poljak. volatiles on selected species. *Plants* **2021**, *10*, 495. [[CrossRef](#)]
21. Abraham, D.; Braguini, W.L.; Kelmner-Bracht, A.M.; Ishii-Iwamoto, E.L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 611–624. [[CrossRef](#)]
22. Demirci, B.; Tabanca, N.; Hısnur Can Baser, K. Enantiomeric distribution of some monoterpenes in the essential oils of some *Salvia* species. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17*, 54–58. [[CrossRef](#)]
23. Vaughn, S.F.; Spencer, G.F. Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. *Weed Sci.* **1993**, *41*, 114–119. [[CrossRef](#)]
24. Vokou, D.; Douvli, P.; Blionis, G.J.; Halley, J.M. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 2281–2301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Puig, C.G.; Gonçalves, R.F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Reigosa, M.J.; Pedro, N. The consistency between phytotoxic effects and the dynamics of allelochemicals release from *Eucalyptus globulus* leaves used as bioherbicide green manure. *J. Chem. Ecol.* **2018**, *44*, 658–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chaimovitch, D.; Shachter, A.; Abu-Abied, M.; Rubin, B.; Sadot, E.; Dudai, N. Herbicidal activity of monoterpenes is associated with disruption of microtubule functionality and membrane integrity. *Weed Sci.* **2017**, *65*, 19–30. [[CrossRef](#)]
27. Weidenhamer, J.D.; Macías, F.A.; Fischer, N.H.; Williamson, G.B. Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 1799–1807. [[CrossRef](#)]
28. Sariana, O.; Andrés, M.F.; Sanz, J.; Errahmani, N.; Abdeslam, L.; González-Coloma, A. Valorization of essential oils from Moroccan aromatic plants. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1109–1114. [[CrossRef](#)]
29. Danczewicz, K.; Gabrys, B.; Dams, J.; Wawrzeczyk, C. Enantiospecific effect of pulegone and pulegone-derived lactones on *Myzus persicae* (Sulz.) settling and feeding. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 530–538. [[CrossRef](#)]
30. Caputo, L.; Cornara, L.; Raimondo, E.M.; De Feo, V.; Vanini, S.; Derano, M.; Trombetta, D.; Smeriglio, A. *Mentha pulegioides* L.: A plant underestimated for its toxicity to be recovered from the perspective of the circular economy. *Molecules* **2021**, *26*, 2154. [[CrossRef](#)]
31. Domingues, P.M.; Santos, L. Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegioides*): Composition and applications as alternatives to pesticides—new tendencies. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *139*, 111534. [[CrossRef](#)]
32. Božović, M.; Ragno, R.; Tzakova, O. *Calamintha Nepeta* (L.) savi and its main essential oil constituent pulegone: Biological activities and chemistry. *Molecules* **2017**, *22*, 290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Siano, F.; Catalfamo, M.; Cautela, D.; Servillo, L.; Castaldo, D. Analysis of pulegone and its enantiomeric distribution in mint-flavoured food products. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 197–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ergel, W. In vivo studies on the metabolism of the monoterpene pulegone in humans using the metabolism of ingestion-correlated amounts (MICA) approach: Explanation for the toxicity differences between (S)-(-) and (R)-(+)-Pulegone. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6589–6597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ouédraogo, I.W.K.; De Winter, J.; Gerbaux, P.; Benzi-Coulibaly, Y.L. Volatility profiles of monoterpenes loaded onto cellulose-based materials. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *51*, 100–106. [[CrossRef](#)]
36. Celis, R.; Gámiz, B.; Adelfino, M.A.; Hermoso, M.C.; Cornejo, J. Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metalaxyl in Mediterranean agricultural soils. *Sci. Total Environ.* **2013**, *444*, 288–297. [[CrossRef](#)]
37. Pauzat, F.; Marloé, G.; Markovits, A.; Ellinger, Y. Global versus local adsorption selectivity. *Int. J. Astrobiol.* **2015**, *14*, 563–570. [[CrossRef](#)]
38. Sukul, P.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Spittler, M. Evaluation of sorption-desorption processes for metalaxyl in natural and artificial soils. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2013**, *48*, 431–441. [[CrossRef](#)]

39. Qin, F.; Gao, Y.X.; Guo, B.Y.; Xu, P.; Li, J.Z.; Wang, H.L. Environmental behavior of benalaxyl and furalaxyl enantiomers in agricultural soils. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **2014**, *49*, 738–746. [CrossRef]
40. Gámiz, B.; López-Cabeza, R.; Facenda, G.; Velarde, P.; Hermosín, M.C.; Cox, L.; Celis, R. Effect of synthetic clay and biochar addition on dissipation and enantioselectivity of tebuconazole and metalaxyl in an agricultural soil: Laboratory and field experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2016**, *230*, 32–41. [CrossRef]
41. Gámiz, B.; Facenda, G.; Celis, R. Evidence for the effect of sorption enantioselectivity on the availability of chiral pesticide enantiomers in soil. *Environ. Pollut.* **2016**, *213*, 966–973. [CrossRef]
42. Huang, J.; Liang, C.; Zhang, X. Effects of nano-SiO₂ on the adsorption of chiral metalaxyl to agricultural soils. *Environ. Pollut.* **2017**, *225*, 201–210. [CrossRef] [PubMed]
43. Gámiz, B.; López-Cabeza, R.; Cox, L.; Celis, R. Environmental Fate of Chiral Pesticides in Soils. In *Pesticides in Soils. The Handbook of Environmental Chemistry*; Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2022; pp. 107–133.
44. Wirsching, J.; Pagel, H.; Dittlerich, F.; Uksa, M.; Wernberg, M.; Zwiener, C.; Berner, D.; Kandler, E.; Poll, C. Biodegradation of pesticides at the limit: Kinetics and microbial substrate use at low concentrations. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2107. [CrossRef] [PubMed]
45. Van Roon, A.; Parsons, J.R.; de Kleeze, A.M.; Govers, H.A.J. Fate and transport of monoterpenes through soils. Part I. Prediction of temperature dependent soil fate model input-parameters. *Chemosphere* **2005**, *61*, 599–609. [CrossRef] [PubMed]
46. Van Roon, A.; Parsons, J.R.; Krap, L.; Govers, H.A.J. Fate and transport of monoterpenes through soils. Part II: Calculation of the effect of soil temperature, water saturation and organic carbon content. *Chemosphere* **2005**, *61*, 129–138. [CrossRef] [PubMed]
47. Wiedman, S.J.; Appleby, A.P. Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides. *Weed Res.* **1972**, *12*, 65–74. [CrossRef]
48. Duke, S.O.; Cedergreen, N.; Velini, E.D.; Belz, R.G. Hormesis: Is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks Pest Manag.* **2006**, *17*, 29–33.
49. Comejo, J.; Celis, R.; Pavlovic, I.; Ulibarri, M.A. Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: A review. *Clay Miner.* **2005**, *43*, 153–175. [CrossRef]
50. Real, M.; Gámiz, B.; López-Cabeza, R.; Celis, R. Sorption, persistence, and leaching of the allelochemical umbelliferone in soils treated with nanoengineered sorbents. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9764. [CrossRef]
51. Gámiz, B.; Facenda, G.; Celis, R. Nanoengineered sorbents to increase the persistence of the allelochemical carvone in the rhizosphere. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 589–596. [CrossRef]
52. Štefja, V.; Fulem, M.; Růžička, K. Thermodynamic study of selected monoterpenes IV. *J. Chem. Thermodyn.* **2020**, *144*, 106013. [CrossRef]
53. Gee, G.; Bauder, J. Particle-Size Analysis. In *Methods of Soil Analysis, Part 1*; Klute, A., Ed.; ASA and SSSA: Madison, WI, USA, 1986; Volume 9, pp. 383–411; ISBN 9780891188117.
54. Nelson, R. Carbonate and Gypsum. In *Methods of Soil Analysis, Part 2*; Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds.; ASA and SSSA: Madison, WI, USA, 1982; pp. 181–197.
55. Nelson, D.; Sommers, L. Total Carbon, Organic Carbon and Organic Matter. In *Methods of Soil Analysis, Part 2*; Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds.; ASA and SSSA: Madison, WI, USA, 1982; pp. 539–758.
56. Clay Minerals Society, (CMS, 2022). Source Clay Physical/Chemical Data. Available online: https://www.clayso.org/sourceclays_data.html (accessed on 1 April 2022).
57. Cruz-Guzmán, M.; Celis, R.; Hermosín, M.C.; Leone, P.; Nigro, M.; Comejo, J. Sorption-desorption of lead (II) and mercury (II) by model associations of soil colloids. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2003**, *67*, 1378–1387. [CrossRef]
58. Harner, T.; Wiberg, K.; Norstrom, R. Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 218–220. [CrossRef]
59. Han, X.; Scott, A.C.; Fedorak, P.M.; Baranish, M.; Martin, J.W. Influence of molecular structure on the biodegradability of naphthenic acids. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 1290–1295. [CrossRef] [PubMed]
60. Seefeldt, S.S.; Jensen, J.E.; Faerst, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationship. *Weed Technol.* **1995**, *9*, 218–227. [CrossRef]
61. McCall, P.; Laskowski, D.; Swann, R.; Dishburger, H. Test Protocols for Environmental Fate & Movement of Toxicants. In *Proceedings of the Symposium, Association of Official Analytical Chemists, 94th Annual Meeting, Washington, DC, USA, 21–22 October 1980*.

Supplementary material

Enantiomer-selective characterization of the adsorption, dissipation, and phytotoxicity of the plant monoterpene pulegone in soils

Jose A. Galán-Pérez¹, Beatriz Gámiz^{1,*}, Ivana Pavlovic², Rafael Celis¹

¹ *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain*

² *Departamento de Química Inorgánica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUIQFN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

***Corresponding Author:** B. Gámiz

Address: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC

Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Seville, Spain

E-mail: bgamiz@irnase.csic.es

Text S1. Description of the different treatments conducted to assess the effect of the application rate, soil water content, temperature/aeration, and the addition of OHT on the dissipation of pulegone enantiomers in non-sterilized soil 2.

i) Application rate: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.9 mL of an aqueous solution of rac-pulegone at different concentrations (6, 30, or 150 mg L⁻¹) to give application rates of 2, 9 and 45 mg kg⁻¹ soil and a soil water content of 30%. The samples were incubated in closed tubes at 25 °C for 4 days.

ii) Soil water content: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.3 mL of a 90 mg L⁻¹ aqueous solution of rac-pulegone plus 0, 0.6 or 0.9 mL of water, to reach a rac-pulegone application rate of 9 mg kg⁻¹ and soil water contents of 10, 30, or 40%, respectively. The samples were incubated in closed tubes at 25 °C for 4 days.

iii) Temperature/aeration: Triplicate samples of 3 g of soil were spiked with 0.9 mL of a 30 mg L⁻¹ aqueous solution of rac-pulegone to give an application rate of 9 mg kg⁻¹ soil and a water content of 30%. The samples were incubated in closed tubes at 4°C, closed tubes at 25°C, or open tubes at 25°C for 4 days. For the open tube-treatment the soil water content was re-adjusted daily to the initial value of 30%.

iv) Addition of OHT: Triplicate samples of 1 g of soil, either unamended or amended with 10 mg of OHT, were spiked with 0.3 mL of a 150 mg L⁻¹ aqueous solution of rac-pulegone. The samples were incubated either in closed or open tubes at 25°C for 4 days.

For all treatments, independent triplicate tubes were taken from the incubator at selected times (t= 0, 1, 2, 3, and 4 days), and frozen for subsequent extraction as described in the main text.

Table S1. Pearson correlation coefficients (r) between the pulegone K_d values on the soils ($n = 8$) and relevant soil properties. Statistically significant ($P < 0.05$) correlations are highlighted in bold.

Soil property	Pearson correlation coefficient (r)	P value
Sand	-0.766	0.027
Silt	0.468	0.242
Clay	0.690	0.058
CaCO ₃	0.388	0.342
OC	0.735	0.038
pH	-0.168	0.690

Table S2. Parameters resulting from fitting a sigmoidal 3-parameter equation to the R- and S-pulegone dissipation data in non-autoclaved soils.

Soil	R-pulegone				S-pulegone			
	a	b	DT ₅₀	R ²	a	b	DT ₅₀	R ²
1	4.06 ± 0.05	-0.240 ± 0.015	1.47 ± 0.03	1.000	4.23 ± 0.06	-0.257 ± 0.019	1.55 ± 0.04	0.999
2	4.39 ± 0.06	-0.337 ± 0.032	1.82 ± 0.03	0.999	4.39 ± 0.09	-0.306 ± 0.039	1.96 ± 0.06	0.998
3	4.22 ± 0.21	-0.205 ± 0.072	0.91 ± 0.05	0.996	5.18 ± 0.59	-0.621 ± 0.122	1.16 ± 0.21	0.993
6	4.36 ± 0.01	-0.160 ± 0.001	0.76 ± 0.01	1.000	4.70 ± 0.22	-0.353 ± 0.062	1.15 ± 0.06	0.996
7	4.15 ± 0.04	-0.183 ± 0.011	0.83 ± 0.01	1.000	4.34 ± 0.04	-0.251 ± 0.014	0.96 ± 0.01	1.000
8	4.20 ± 0.01	-0.260 ± 0.001	1.21 ± 0.01	1.000	4.28 ± 0.01	-0.246 ± 0.003	1.33 ± 0.01	1.000

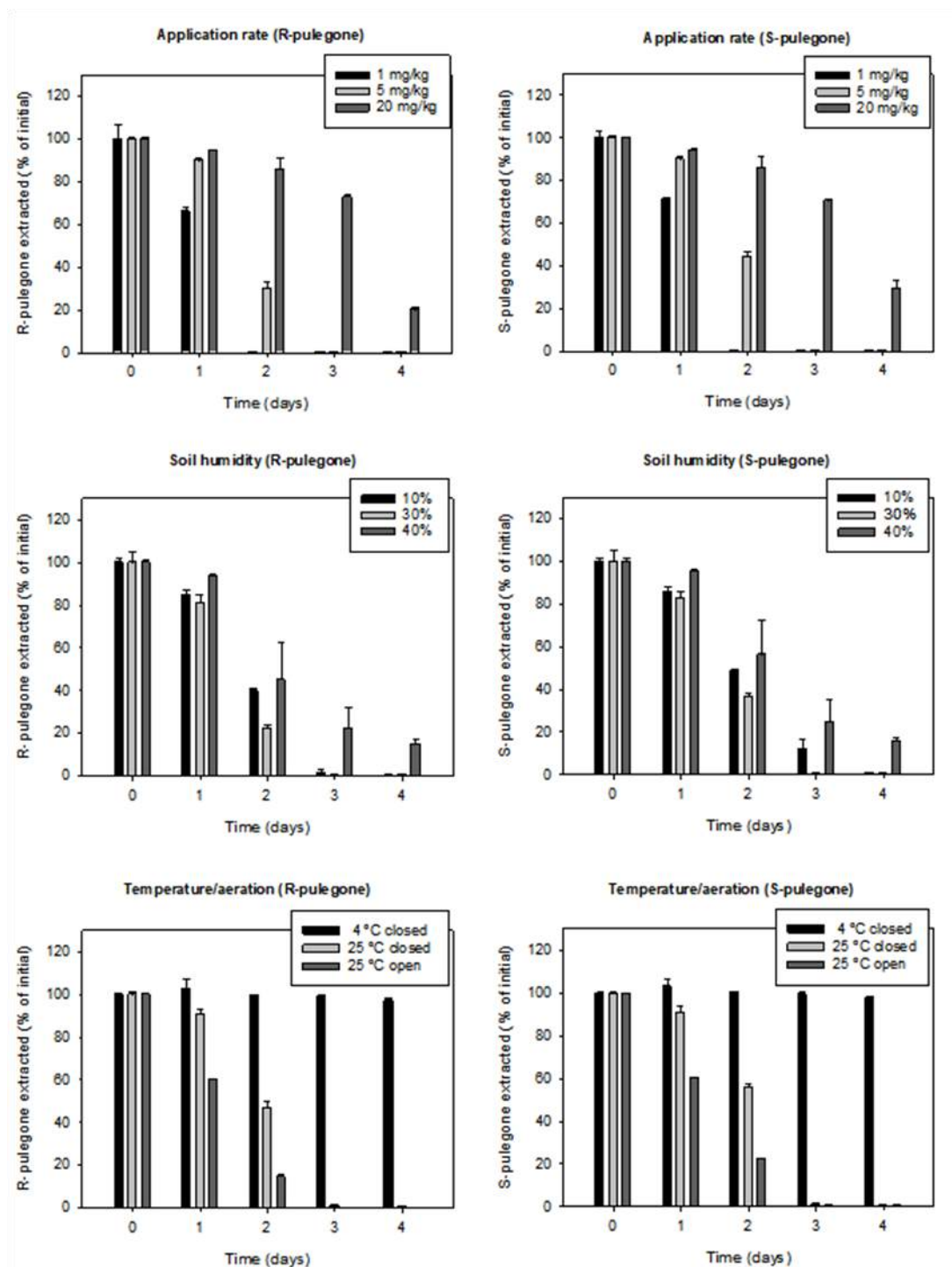


Figure S1. Effect of the application rate, soil water content, and temperature/aeration on the dissipation of R- and S-pulegone in soil 2. The different treatments are described in detail in Supplementary Text S1.

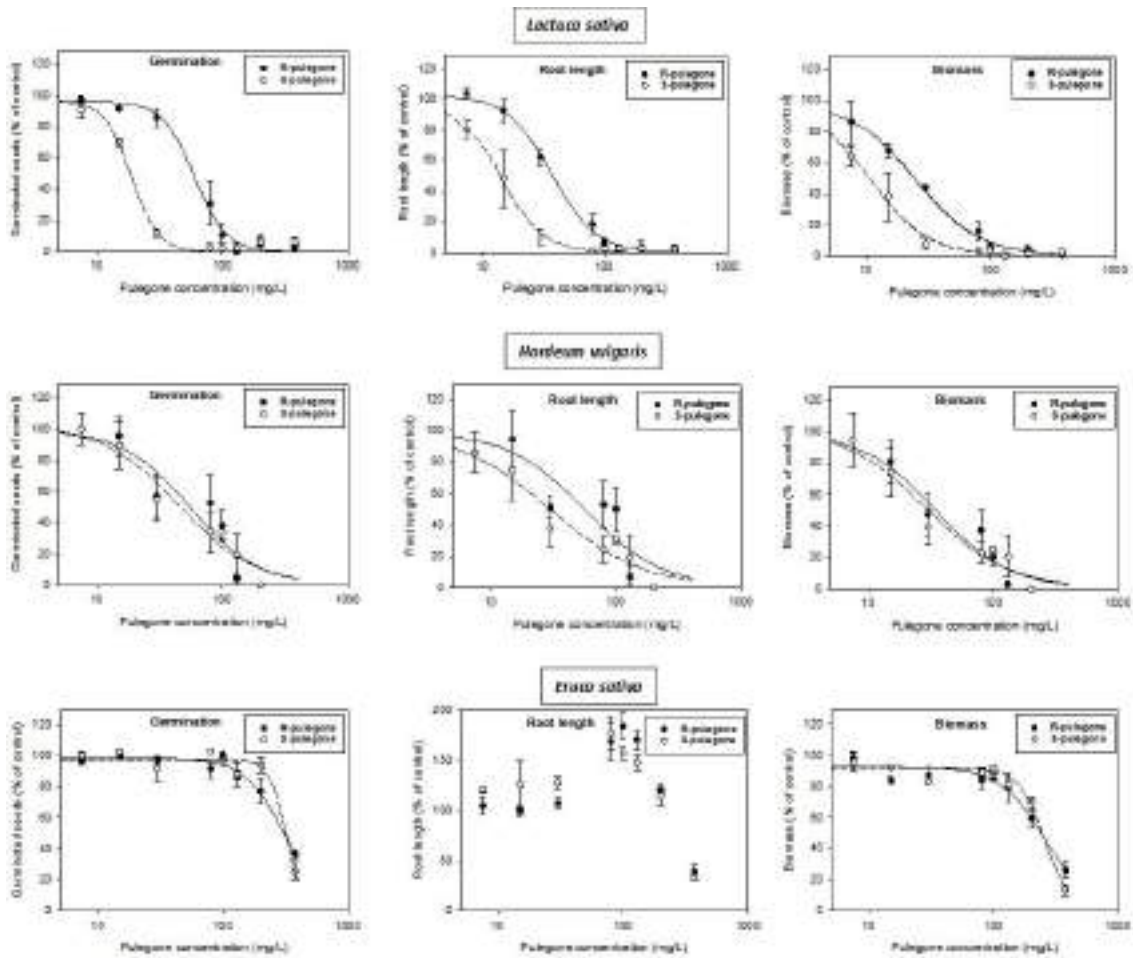


Figure S2. Dose-response curves of R- and S-pulegone on germination, root length, and shoot biomass of three plant species obtained in Petri dishes after 5 days. Symbols represent experimental percentages compared to the control, whereas lines are the log-logistic 3-parameter fits.

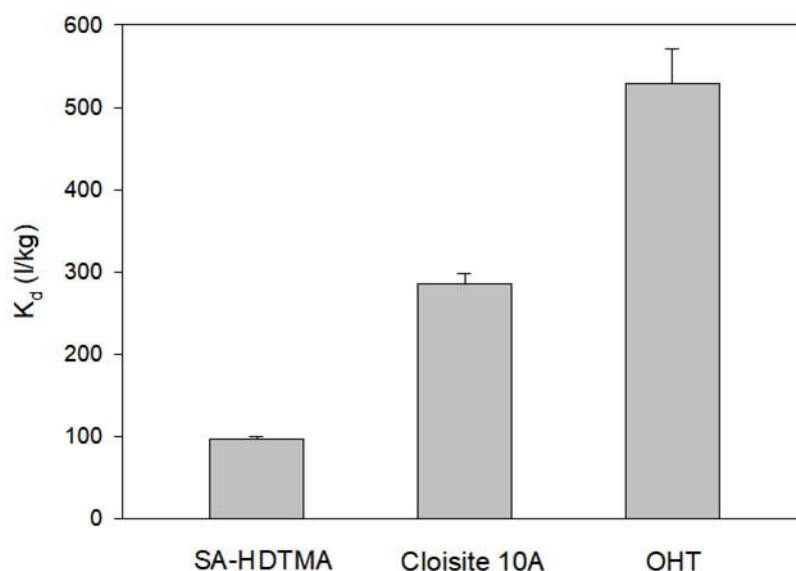


Figure S3. Distribution coefficients for rac-pulegone on different organoclays. SA-HDTMA: Arizona montmorillonite modified with hexadecyltrimethylammonium cations (lab-synthesized); Cloisite 10A: montmorillonite modified with dimethyl, benzyl, hydrogenated alkyl tallow quaternary ammonium cations (commercial); OHT: Oleate-modified hydrotalcite (lab synthesized). Measurements were conducted at an initial rac-pulegone concentration of 2 mg/l and an adsorbent to solution ratio of 40 mg:8 ml. Error bars denote standard errors of triplicates.

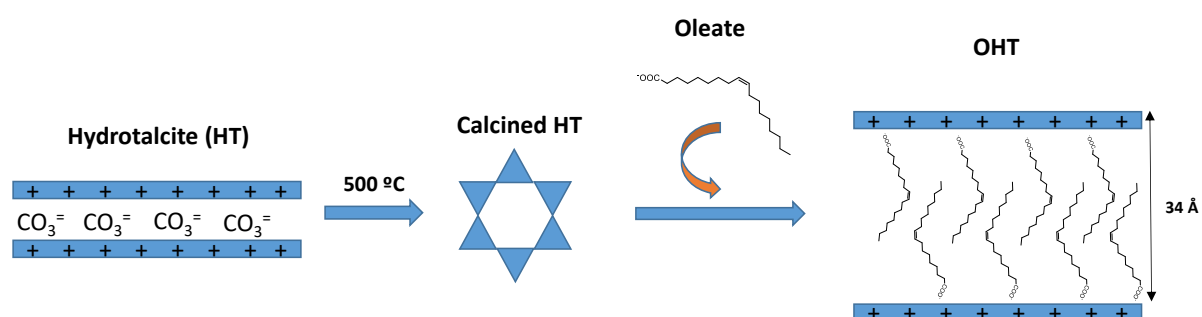


Figure S4. Schematic representation of the reactions leading to the formation of the oleate-modified hydrotalcite sample (OHT).

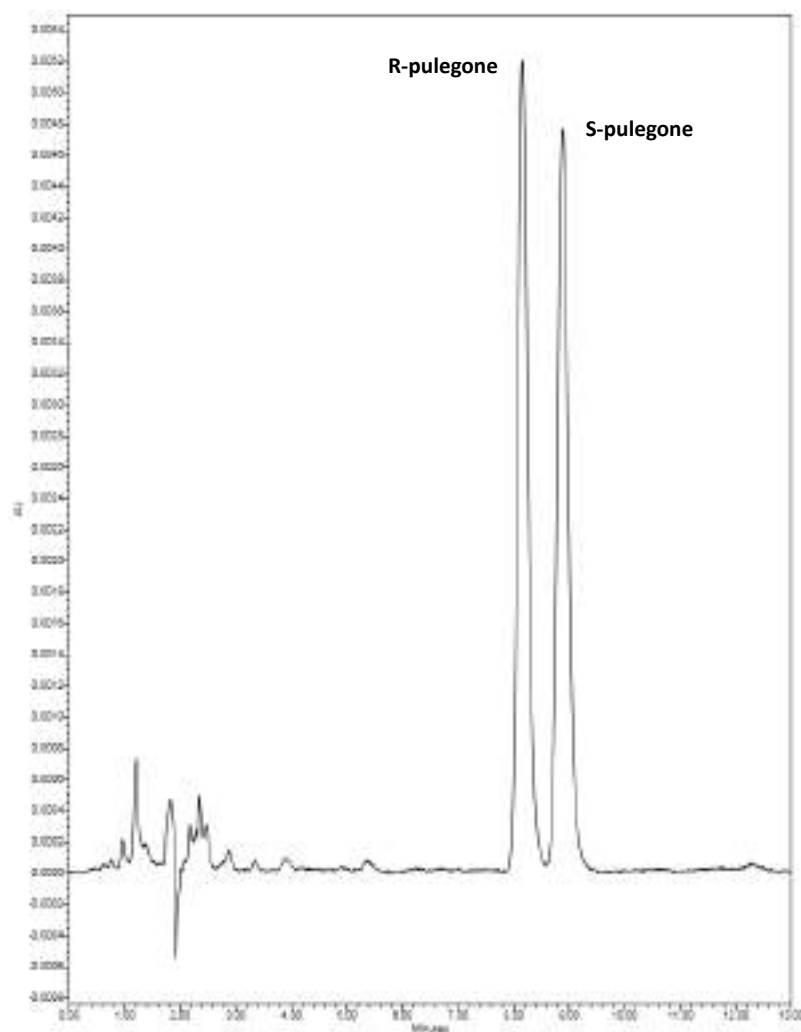


Figure S5. Chromatogram of a standard solution of rac-pulegone containing each enantiomer at a concentration of 1 mg/l in 50:50 methanol:water as a solvent.

Capítulo VI

Conclusiones



Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La expresión de la fitotoxicidad de escopoletina en suelos depende en gran medida de la influencia que las características fisicoquímicas y biológicas de los mismos ejercen en la adsorción y persistencia del compuesto, que determinan su biodisponibilidad. En particular, la expresión de la fitotoxicidad de escopoletina se favorece en suelos ácidos, en los que una adsorción reversible contribuye a aumentar la persistencia del compuesto y, a la vez, a mantener concentraciones moderadas del mismo a niveles suficientes para ejercer su actividad biológica.
2. La adición de enmiendas orgánicas y organoarcillas puede usarse para modificar la adsorción y persistencia de los compuestos alelopáticos en el suelo. Diversos residuos de almazaras y organoarcillas incrementaron significativamente la adsorción de escopoletina en un suelo alcalino y dicho incremento, junto a cambios en la actividad microbiana, prolongaron la persistencia del compuesto, mejorando la expresión de su actividad fitotóxica.
3. La granulación de la organoarcilla comercial Cloisite 10A y la posterior adsorción de escopoletina a los gránulos preparados protegió al compuesto de su rápida biodegradación en suelos, tanto en condiciones de laboratorio como de campo. La preadsorción de escopoletina a los gránulos antes de su aplicación maximizó la protección del compuesto alelopático, favoreciendo la expresión de su fitotoxicidad. El uso de organoarcillas granuladas como soportes puede ser, por tanto, una buena estrategia de formulación para aumentar la persistencia y bioactividad de los compuestos alelopáticos en el suelo.
4. Los estudios enantioselectivos realizados con el monoterpeno pulegona indican que su adsorción en suelos es un proceso no enantioselectivo, mientras que su biodegradación y fitotoxicidad pueden variar entre enantiómeros, dependiendo, respectivamente, del suelo y de la planta receptora considerada. Los procesos de biodegradación y volatilización llevan a una rápida disipación de los enantiómeros de pulegona en el suelo y a la consiguiente pérdida de bioactividad de los mismos. Un aumento de la adsorción a través de la modificación del suelo

con materiales adsorbentes, como las organoarcillas, puede reducir las pérdidas por biodegradación y volatilización y aumentar la fitotoxicidad de pulegona.

De forma general, los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto la importancia de considerar el papel que el suelo puede ejercer en la biodisponibilidad de los compuestos alelopáticos a la hora de explicar la funcionalidad de estos y de evaluar la viabilidad de su posible aplicación como plaguicidas respetuosos con el medioambiente. También ponen de manifiesto que la elección de los escenarios edafoclimáticos de aplicación, la posible modificación del suelo a través de la adición de enmiendas y el desarrollo de formulaciones adecuadas pueden llevar a un mejor aprovechamiento de la actividad de los compuestos alelopáticos a través de una mejora de su biodisponibilidad. La integración de estas estrategias podría llevar a escenarios en los que la actividad de los compuestos alelopáticos pudiera dar resultados más satisfactorios en su uso como alternativas fitosanitarias respetuosas con el medio ambiente, superando algunas de las limitaciones que a menudo se asocian al uso de compuestos naturales con dicha finalidad.

