

CINÉTICA Y MECANISMO DE LA DEGRADACIÓN EN SUELO DE LA 2-HIDROXI-(2H)-1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONA (HBOA), ALELOQUÍMICO FITOTÓXICO DE LAS GRAMINEAE

KINETICS AND MECHANISM OF THE DEGRADATION IN SOIL OF 2-HYDROXY-(2H)- 1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONE (HBOA), PHYTOTOXIC ALLELOCHEMICALS FROM GRAMINEAE

Alberto Oliveros-Bastidas¹, Francisco A. Macías², David Marín², José M.G. Molinillo²,
Luiz C.A. Barbosa³, Antonio J. Demuner³

(1) Universidad de Los Andes, Departamento de Química, Grupo de Química Ecológica, Facultad de Ciencias,
La Hechicera, Mérida 5101 - Venezuela

(2) Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Orgánica, Grupo de Alelopatía,
Puerto Real C/ República Saharaui s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz - España

(3) Universidad Federal de Viçosa, Departamento de Química, Av. P.H. Rolf, 36570-000, Viçosa, MG - Brasil
(e-mail: aloliver@ula.ve)

Recibido: 27/12/2011 - Evaluado: 14/03/2012 - Aceptado: 03/04/2012

RESUMEN

Este trabajo se estudió la biotransformación de 2-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (HBOA) en suelo. Se encontró una constante de velocidad (K) de $0,184 \pm 0,003$ días⁻¹ y vida media ($t_{1/2}$) de $3,76 \pm 0,06$ días, considerando una cinética de primer orden. Los estudios cualitativos de las especies en la solución de suelo, muestran que HBOA es convertido a seis especies relacionadas estructuralmente: 2-aminofenol (AF), 2-hidroxi-N-(2-hidroxifenil)-acetamida (HPMA), N-(2-hidroxifenil)-acetamida (HPAA), 2-amino-7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona (APO), 2-acetamino-3H-fenoxazin-3-ona (AAPO) y N-(2-hidroxi-5-nitrofenil)-acetamida [H(5)NPAA]. Los estudios de concentración durante la biotransformación muestran que todas las especies pueden estar presentes en la solución de suelo, sin embargo, el aumento de la concentración para algunas especies, hizo posible plantear productos finales de la biotransformación (APO y [H(5)NPAA]) así como intermedios (AF, HPMA). Los resultados son discutidos en términos de la relevancia ecológica de estos productos de biotransformación, especialmente en la actividad alelopática, y la determinación de las especies verdaderamente activas.

ABSTRACT

In this paper, it was studied the biotransformation of 2-hydroxy-(2H) -1,4-benzoxazin-3 (4H)-one (HBOA) in soil. It was determined a rate constant (K) of 0.184 ± 0.003 days⁻¹ and half-life ($t_{1/2}$) of 3.76 ± 0.06 days, assuming a first order kinetics. Qualitative studies of the species in the soil solution, show that HBOA is converted to a total of six structurally related species: 2-aminophenol (AF), 2-hydroxy-N-(2-hydroxyphenyl)-acetamide (HPMA) N-(2-hydroxyphenyl)-acetamide (HPAA), 2-amino-7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one (APO), 2-acetamino-3H-phenoxazin-3-one (AAPO) and N-(2-hydroxy-5-nitrophenyl)-acetamide [H(5)NPAA]. Studies of concentration during biotransformation showed that all species may be present in the soil solution, however, the increase in the concentration for some species, made it possible to postulate biotransformation end products (APO and [H(5)NPAA]) and intermediate processing (AF, HPMA). The results are discussed in terms of ecological relevance of these biotransformation products, especially in allelopathic activity.

Palabras clave: HBOA; biotransformación; modelo cinético; intermediarios
Keywords: HBOA; biotransformation; kinetic model; intermediary

INTRODUCCIÓN

Los ácidos hidroxámicos cíclicos con esqueleto del tipo (2*H*)-1,4-benzoxazin-3 (4*H*)-ona, son un tipo de alcaloides producidos por la familia de las gramíneas y otros miembros de *Acanthaceae*, *Ranunculaceae* y *Scrophulariaceae* (Pimente *et al.*, 2011; Niemeyer, 1988; Pratt *et al.*, 1995). Estos compuestos, particularmente en su forma aglicón, se han relacionado con la defensa de la planta contra una amplia variedad de organismos, incluyendo hongos (Pratt *et al.*, 1995; Wahlroos & Virtanen, 1995; Bravo y Lazo, 1996; Friebe *et al.*, 1998; Glenn *et al.*, 2003) bacterias (Woodward *et al.*, 1978), insectos (Klun *et al.*, 1967; Argandoña *et al.*, 1983; Niemeyer *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 2004) y las malas hierbas (Barnes & Putnam, 1987; Pérez & Ormeño-Núñez, 1991).

En previos estudios sobre el comportamiento de los aleloquímicos en el suelo (*FATEALLCHEM project* 1998 to 2002; Kobayashi, 2004; Sturz & Christie, 2003), se ha discutido el destino y la toxicidad de las sustancias químicas emitidas por las plantas alelopáticas, denominados aleloquímicos, como una estrategia de defensa y que esconde las especies químicas activas. Los efectos biológicos de los compuestos liberados podrían cambiar si cualquier proceso de biotransformación de estos productos se produce en el suelo, y esto podría afectar la función ecológica y el mecanismo de defensa química de la planta.

La acción de los agentes alelopáticos en la interacción planta-planta necesita su presencia en las proximidades del suelo de la planta receptoras (Blum, 2011; El-Khatib *et al.*, 2004). Los procesos de degradación que afectan a estos productos químicos pueden aumentar o disminuir sus efectos fitotóxicos, que afectan a la capacidad de defensa integral de la planta productora o donante del aleloquímico. Cualquier proceso de degradación que tendrá lugar en la tierra estaría relacionado con el entorno biológico de la planta presente en ella (Grayston *et al.*, 1998; Macías *et al.*, 2004; Atkinson *et al.*, 1991). A continuación, se desarrolla el estudio de la degradación de 2-hidroxi-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (HBOA) en el suelo (Figura 1), lo cual no presenta antecedentes en la literatura. El estudio de la biotransformación de HBOA ha sido reportada en el caso de hongos endoparásitos, bacterias que pueden colonizar las raíces, y de esta manera, el suelo (Friebe *et al.*, 1998; Fomsgaard *et al.*, 2004; Zikmudová *et al.*, 2002a; Zikmudova *et al.*, 2002b; Nair *et al.*, 1990; Chase *et al.*, 1991a; Chase *et al.*, 1991b; Gagliardo & Chilton, 1992; Saharan & Nehra, 2011; Kumar & Kumar, 2011), donde una gran diversidad de compuestos han sido detectados (Figura 1), sin embargo, la presencia de estos mismos compuestos en el suelo, como consecuencia de la degradación de HBOA, no presenta registros. El uso de análisis mediante cromatografía líquida de estas soluciones permite medir todos los datos necesarios para dilucidar la dinámica de degradación (Kong *et al.*, 2008; Macías *et al.*, 2004; Macías *et al.*, 2005), en este caso, a la distribución de especies químicas en el tiempo. En este sentido, el presente trabajo incluye el estudio del comportamiento de HBOA en el suelo proveniente de cultivos de trigo (*Triticum aestivum* L.), centrado el estudio en la identificación de los diferentes compuestos presentes en el curso de la biotransformación de HBOA.

MATERIALES Y METODOS

Caracterización de los productos

La pureza y determinación estructural de los compuestos sintéticos fueron determinados mediante 1H-RMN y análisis de HPLC, siendo esta pureza >98%. Los espectros de 1H y 13C fueron registrados usando MeOH-d4 y CDCl3 como solventes en un espectrómetro Varian INOVA a 399.99 and 100.577 MHz, respectivamente. Se uso un HPLC-DAD (diode array UV-vis system). Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro Varian 1200L con detector cuadrupolar. Los espectros de IR fueron registrados en un FTIR Spectrum BX PerkinElmer FTIR. La identidad estructural fue confirmadas mediante la comparación de todos los datos espectroscópicos con aquellos registrados en la literatura (Zikmudová *et al.*, 2002a; Zikmudova *et al.*, 2002b; Macías *et al.*, 2004).

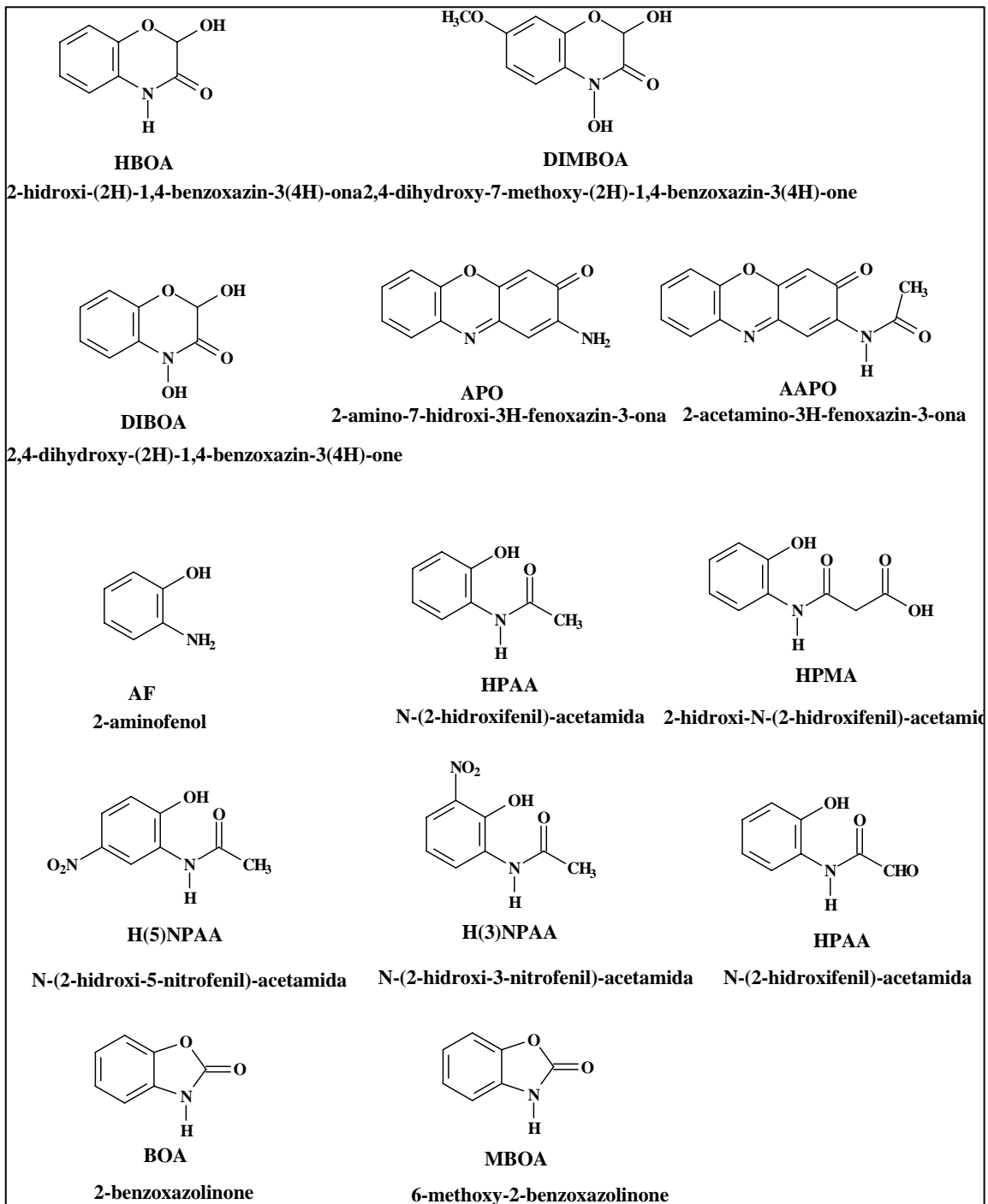


Fig. 1: Aleloquímicos y productos de biotransformación señalados en el texto.

Origen de 2-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (HBOA) y derivados

Síntesis de HBOA: Para los estudios de la degradación de HBOA, a pesar de que este es un producto natural, aislado principalmente de trigo y maíz, las concentraciones en que estos se encuentran son muy bajas, con lo

cual, fue necesarias síntesis, la cual ha sido reportada en la literatura (Macías *et al.*, 2006). Brevemente, un gramo de nitrofenol-Sigma Aldrich Co-, fue disuelto en una solución de KOH 0,1 M en etanol absoluto. Después de 1 hora, el solvente fue removido a presión reducida. El alcóxido resultante es disuelto en N,N-dimetilformamida (50 mL) y se adicionan 1,2 mol equiv. de 2-bromoacetato de etilo. La mezcla de reacción fue agitada bajo atmósfera de Ar durante 24h. Después de este tiempo, 50 mL de acetato de etilo fueron adicionados, y la solución orgánica resultante fue lavada con cinco porciones de agua destilada. Las capas orgánicas fueron combinadas y secadas sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente fue destilado a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna sobre sílice (CC, acetato de etilo/hexano 20:80), para obtener 2-(2-nitrofenoxi) acetato de etilo, con rendimiento cuantitativo. Este intermediario fue adicionado a 100 mg de Pd/C (10%) suspendido en una solución de 1,4-dioxano (1:1) (50mL). Después de esto, borohidruro de sodio (650 mg) fueron adicionados gota a gota a la solución bajo agitación vigorosa. A esta suspensión le fue adicionada gota a gota una solución de 2 en 1,4-dioxano (0,5 g/mL), siguiendo la evolución de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC). Una vez la reacción fue completada, la suspensión fue filtrada a través de celita para remover el catalizador, y el filtrado fue tratado con HCl al 10% hasta pH 2. Esta solución fue extraída con acetato de etilo (x 3) y secada sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente destilado a presión reducida. El residuo resultante es purificado mediante CC con acetato/hexano al 30% como fase móvil, para obtener un sólido, el cual fue disuelto en piridina (10 mL) y anhídrido acético (3 mL) fueron adicionados con agitación bajo atmósfera de Ar. Después de 12 h, 10 mL de acetato de etilo son adicionados a la mezcla de reacción, y la solución orgánica fue lavada con cinco porciones de HCl (10%). Las fases orgánicas fueron combinadas y secadas sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente fue eliminado mediante destilación a vacío, el sólido fue disuelto en tolueno seco (10 mL) y calentado por 24 h a 95 °C. Después de esto, el solvente es eliminado a presión reducida, y el residuo fue fraccionado mediante CC con Acetato de etilo/hexano en polaridad creciente para obtener un sólido, a partir del cual HBOA es obtenido mediante la disolución de 100 mg de 5 disueltos en metanol y agitado bajo atmósfera de Ar. Después de esto, 360 µL de una solución de metóxido de manganeso en metanol seco (7,4% w/w) fueron adicionados. Después de 45 min, la solución fue tratada con HCl (5%) hasta pH 4. Después de esto, acetato de etilo fue adicionado a la solución resultante y lavado con salmuera (x 1) y agua destilada (x 2). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas, filtradas y concentradas a presión reducida. El sólido obtenido fue purificado mediante CC (Acetato de etilo/hexano polaridad creciente) para obtener HBOA con rendimientos cuantitativos.

Obtención del ácido N-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-malonámico (HPMA): El HPMA no es un producto comercial, siendo necesario para su uso como patrón en los estudios de especies presentes en la degradación HBOA en el suelo. Se ha seguido el procedimiento descrito en la literatura (Macías *et al.*, 2006), donde el 2-nitrofenol es protegido inicialmente por el tratamiento con tert-Butyldimethylchlorosilane (TBDMSCl) para luego reducir el grupo nitro a amina mediante hidrogenación catalítica (H₂, Pt/C). Una vez que el grupo amino es obtenido, la cadena lateral es introducida mediante amidación con 3-cloro-3-oxopropionato de etilo, y mediante hidrólisis alcalina, se obtiene HPMA.

Obtención del N-(2-hidroxi-5-nitrofenil)-acetamida [H(5)NPAA] y N-(2-hidroxi-3-nitrofenil)-acetamida [H(3)NPAA]: Los estándares de la reacción de nitración sobre HPAA fueron obtenidos mediante el procedimiento descrito por Zikmundová *et al.* (2002a; 2002b) y Macías *et al.* (2006). A una suspensión de N-(2hidroxifenil)-acetamida, prepara a partir de 150 mg en agua, le son adicionadas gota a gota 0,4 mL de HNO₃ al 65 %, en un baño de agua hielo. La mezcla es agitada durante 15 min, diluida con agua y agitada por otros 5 min. La mezcla de reacción es filtrada, originando un sólido negro [H(5)NPAA impuro], el cual es purificado mediante CC en cloroformo/hexano (10:1), obteniendo el producto purificado en un 20% de rendimiento. El filtrado obtenido [H(3)NPAA impuro] es llevada a sequedad y purificado por CC en cloroformo/acetona (4:1) para obtener el producto en un 10% de rendimiento.

Obtención de 2-amino-7-methoxyphenoxazin-3-one (APO) y 2-acetamino-7-methoxyphenoxazin-3-one (AAPO): APO y AAPO fueron sintetizados mediante el procedimiento descrito por Gagliardo y Chilton (1992).

Muestra de suelo

Las muestras de suelo fueron colectadas de cosechas de *Triticum aestivum* L. var. Astron en el Instituto de Agricultura, Rancho de la Merced (Jerez de la Frontera, España), en Noviembre de 2002. Las tierras cultivadas se encuentran a una elevación de 20 msnm, con un registro de humedad media del 67% y precipitación media de 582 mm. La temperatura promedio anual se encuentra en los 18°C (Instituto Nacional de Meteorología, España). Las condiciones de cultivo se consideran en acorde con las buenas prácticas de cultivo, usando fertilizantes orgánicos, excluyendo el uso de herbicidas e insecticidas. El análisis fisicoquímico del suelo de estudio se resume en la Tabla 1.

Tabla 1: Análisis fisicoquímico y de textura del suelo cultivado con trigo (*Triticum aestivum* L) usado en los estudios de degradación de aleloquímicos.

Determinación	Valor	Unidades
Capacidad de Intercambio catiónico	33,91	meq/100g
Ca intercambiable	28,96	meq/100g
Mg intercambiable	3,08	meq/100g
Na intercambiable	0,29	meq/100g
K intercambiable	1,58	meq/100g
Carbonatos	18,25	%P/P
Caliza Activa	8,81	%P/P
Fósforo Asimilable (OLSEN)	8,7	ppm
Materia orgánica	1,35	ppm
Nitrógeno Orgánico	0,08	% P/P
pH (1/2:5)	8,33	
pH (KCl)	7,31	
Potasio asimilable	635	ppm
Arcilla	52,6	%
Arena	15,4	%
LIMO	32,0	%
Clasificación de textura	Arcilla	

Colección de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad entre 8 y 15 cm, donde se concentra la mayor población radicular de las plantas. El suelo fue tamizado a un tamaño de partícula < a 2 mm. Las muestras fueron colocadas en bolsa de plástico y almacenadas a -20 °C hasta su estudio (19).

El pH del suelo fue medido solución acuosa preparada A 1:2.5 (v/v) en KCl. El nitrógeno total orgánico (NTO) fue determinado por el método de Kjeldhal, y el carbono total orgánico (CTO) fue determinado por oxidación con dicromato de potasio. Fosforo disponible fue extraído con bicarbonato de sodio (Olsen *et al.*, 1954), y determinado por colorimetría, según Murphy y Riley (1962). Ca, Mg, Na, and K fueron determinados mediante fotometría de llama (Schollenberger & Simon, 1945).

Muestreo y análisis del suelo

Muestras entre 0,5 y 1,0 mL de solución de suelo proveniente de la incubación fueron tomadas a diferentes tiempos para luego ser homogeneizadas en una solución agua-solución de suelo. Los intervalos de muestreos se determinaron mediante pruebas preliminares, los cuales fueron establecidos cada 24 horas, muestreando hasta un total de 336 horas.

Para el análisis de HPLC, las soluciones de suelo fueron filtradas ($< 0,2 \mu\text{m}$) y centrifugadas (solución de suelo). El residuo sólido resultante fue extraído con metanol (MeOH, baño ultrasonido x 3) durante 15 minutos a 5°C , siendo centrifugado de nuevo durante 20 min. Este proceso fue repetido, usando acetato de etilo (AcOEt) como solvente. La solución de suelo y los extractos de MeOH y AcOEt fueron destiladas a presión reducida (temperatura $< 35^\circ\text{C}$). El residuo sólido resultante fue re disuelto en 2 mL de MeOH con 1% de ácido acético y filtrados ($< 0,2 \mu\text{m}$), la cual fue usada directamente para su análisis por HPLC.

Análisis de HBOA y productos de transformación en suelo

El método analítico empleado en este trabajo fue diseñado luego de un estudio analítico inter laboratorio para la validación de una metodología de análisis de ácidos hidroxámicos y derivados (Eljarrata *et al.*, 2004). Todas las muestras fueron analizadas en un equipo de HPLC Merck HITACHI HPLC equipado con bombas cuaternarias *LaCrom* L-7100 y un detector de arreglo de diodos (DAD) L-7455 *LaChrom* y un auto inyector *LaChrom* L-7200. Las condiciones de análisis fueron: Columna en fase reversa *Lichrospher* 100 RP-18 (250 x 4.0 mm, $5\mu\text{m}$) a 25°C usando como fase móvil agua: 1% AcOH (A) y metanol:1%AcOH (B) a un flujo de 1 mL min^{-1} . Para el análisis cuantitativo, soluciones stock (1mg/mL) de cada estándar individual fueron preparados mediante la disolución de la cantidad apropiada del estándar puro en metanol:1%AcOH. Soluciones a diferentes concentraciones fueron preparadas mediante diluciones sucesivas. Estas soluciones fueron usadas para generar una curva de calibración mediante estándar externo, con la cual se determinara los parámetros de calibración y subsecuente medidas de concentración de HBOA en el suelo a diferentes tiempos de incubación.

Análisis de datos

Parámetros cinéticos de la degradación requirieron tratamiento matemático luego del estudio y determinaciones en el laboratorio, en el cual la cantidad de aleloquímico remanente en el suelo, bajo condiciones controladas es el dato experimental a considerar. La disminución de la concentración del aleloquímico en el suelo es descrito acordando con una ecuación cinética de primer orden (mono fase o cinética de orden uno), el cual es el modelo más común usado en estudios cinéticos de xenobióticos y herbicidas en el suelo (Fox & Makam, 2011; Matthies *et al.*, 2008; Scow & Alexander, 1989; Scow, 1982), descrito por la ecuación 1;

$$dC/dt = -KC \quad (1)$$

donde C es la concentración ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ suelo), t representa el tiempo (horas) y K la velocidad de degradación (min^{-1}). El cambio en la concentración de aleloquímico con el tiempo (dC/dt) es proporcional a la concentración a ese mismo tiempo. La forma integrada de la ecuación 1, origina la ecuación 2;

$$C(t) = C_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

Donde C(t) es la concentración en el tiempo t ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ suelo) y C_0 es la concentración medida inmediatamente después de la aplicación del aleloquímico en el suelo, en el tiempo inicial ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ soil). Una relación lineal es dada por la forma logarítmica de la ecuación 3;

$$\ln(t) = \ln C_0 - kt \quad (3)$$

El tiempo en el cual la concentración alcanza la mitad de su valor, es denominado tiempo de vida media ($t_{1/2}$, tiempo para degradar el 50% de la concentración inicial. Sustituyendo en la ecuación 3, se obtiene:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (4)$$

Aunque varios tratamiento matemáticos han sido desarrollados para estimar con mejor precisión la concentración de agentes químicos en el suelo (Mortensen *et al.*, 2006), las correlaciones y ajustes de regresión obtenidos aquí permiten estimar con fidelidad la persistencia del aleloquímicos en el suelo, así como los

intervalos de tiempo seleccionados permitirán aislar e identificar las especies presentes durante el proceso de biotransformación (Homklin *et al.*, 2011; Murphy, 2010; Gardiner *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de la biotransformación de HBOA

El estudio de la cinética del proceso de biotransformación de HBOA se efectuó aplicando el modelo de degradación de orden uno respecto a la concentración de HBOA, ajustando los valores de concentración remanente de HBOA en el suelo a una ecuación de decaimiento exponencial de orden uno, con lo cual, los parámetros cinéticos, como constante de velocidad y vida media, se estiman a partir de las curvas de Ln [HBOA] Vs tiempo de incubación (Figura 2). Los cálculos arrojan un valor de constante de velocidad (K) de $0,184 \pm 0,003$ días⁻¹ y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de $3,76 \pm 0,06$ días, para $n=3$. Comparativamente, HBOA presenta un tiempo de residencia intermedio entre benzoxazin-2(3H)-one (BOA) y 6-metoxi-benzoxazolin-2(3H)-ona (MBOA) (Macías *et al.*, 2004). Así, HBOA muestra un tiempo de disipación mayor en suelo que las 2-benzoxazolinonas, mientras que presenta mayor resistencia a la biotransformación que su ácido hidroxámico afín, es decir, la sustitución del grupo hidroxilo por un átomo de hidrógeno en el nitrógeno de la posición 4, se traduce en un aumento en el tiempo de residencia en el suelo, donde se intuye que las características del grupo funcional en esa posición es un factor fundamental en el proceso de biotransformación del compuesto. Este hecho adquiere especial relevancia en los estudios de desarrollos de modelos de herbicidas, pues las variaciones estructurales en esa posición, puede ser un punto de partida para los estudios de relación estructura actividad biológica, así como los estudios de estabilidad en los diferentes medios de ensayos biológicos (suelo, solución, agua, etc.).

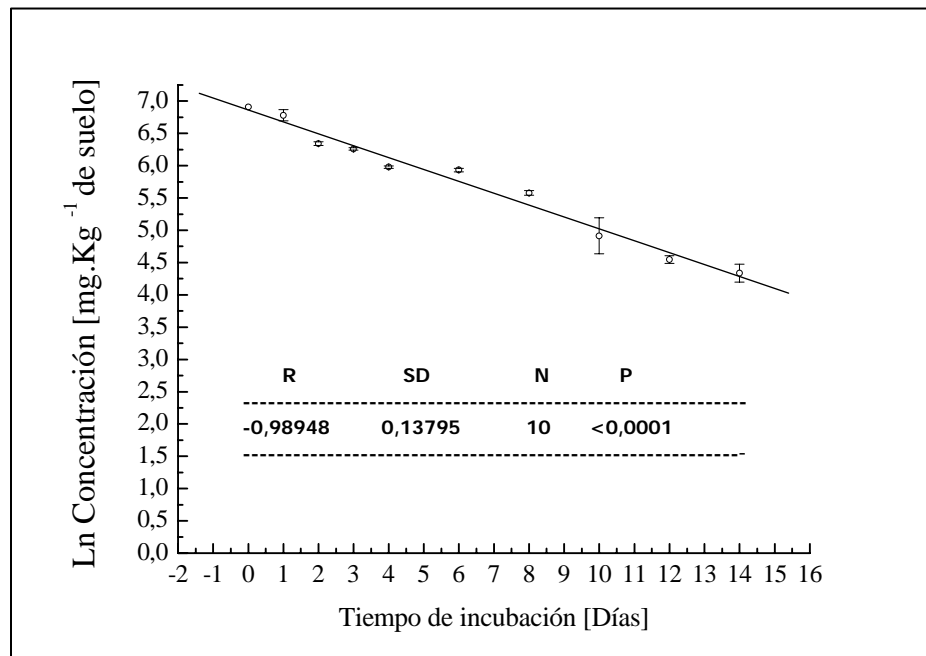


Fig. 2: Cinética de la degradación de HBOA en suelo de cultivos de *Triticum aestivum* L. Varras de error representan la desviación estándar para $n=3$.

Análisis cualitativos de especies químicas en la biotransformación

El análisis de las soluciones de suelo inoculadas con HBOA, es complejo, indicando la presencia de una gran variedad de productos y/o intermediarios en la ruta de biotransformación (Figura 3). Así, se propuso como

objetivo un estudio analítico cualitativo mediante HPLC-DAD (Tiempo de retención, condiciones de elución, espectro UV-Vis y adición de estándar), para elucidar la identidad estructural de estos intermediarios y/o compuestos finales de la biotransformación, en los tiempos de incubación aquí considerados.

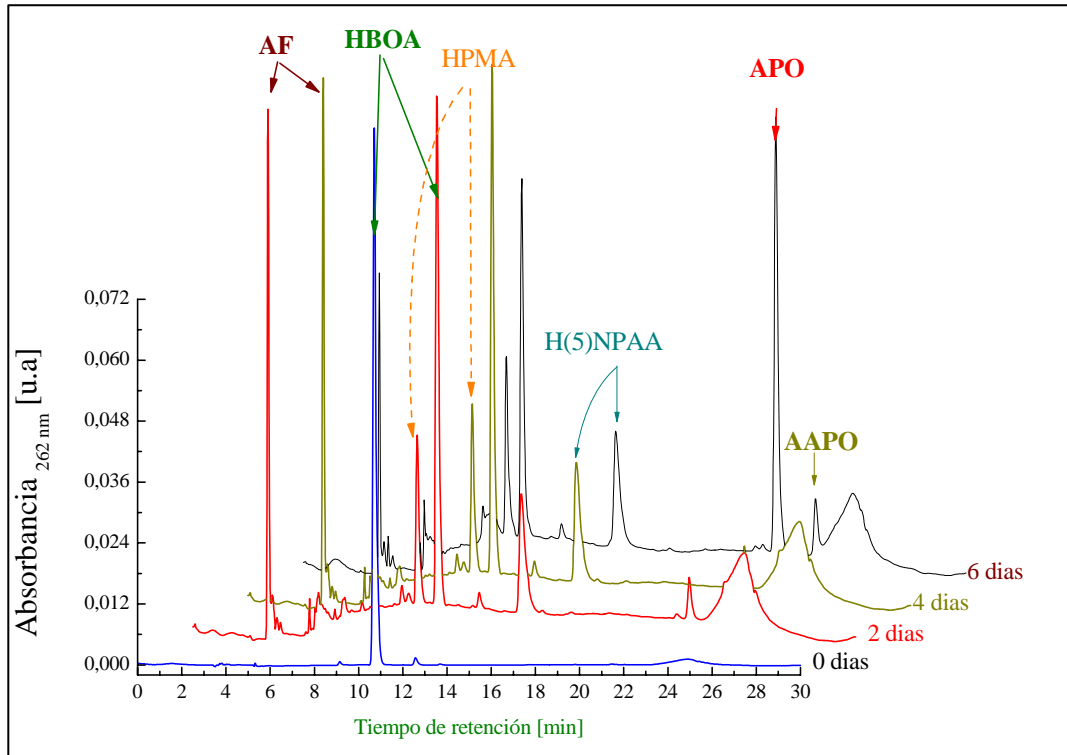


Fig.3: Perfil cromatográfico de muestras de suelo inoculadas con **HBOA** a diferentes tiempos de incubación.

Los estudios preliminares muestran que es posible la detección, además del compuesto inoculado (**HBOA**), 2-aminofenol (**AF**) y 2-amino-(3H)-fenoazin-3-ona (**APO**), además de otras series de señales que ameritaran un estudio particular para poder confirmar su presencia en las muestras de suelo, y así postularlos como otras especies en la ruta de biotransformación en suelo.

Estudio de la presencia del ácido N-(2-hidroxifenil) malonámico (HPMA)

Como se puede observar en la Figura 4, a un tiempo de retención de 9 min, aparece un máximo, que aumenta progresivamente según el tiempo de incubación mostrado (0-6 días). Según los antecedentes existentes en cuanto al comportamiento cromatográfico de los productos de biotransformación de HBOA, se encuentra que para HPMA posee un comportamiento similar (Zikmundová *et al.*, 2002a), donde este máximo cromatográfico, el cual eluye con una diferencia en el tiempo de retención aproximado de 1 min respecto al HBOA, se asoció al ácido N-(2-hidroxifenil)-malonámico (HPMA).

Con estos antecedentes, un estudio cromatográfico cualitativo se llevó a cabo, para estimar la identidad de este pico cromatográfico, usando para ello la comparación de las características cromatográficas (Tiempo de retención) y espectroscópicas (espectros de ultravioleta) de estándares puro. En la Figura 5 se resume un detalle del cromatograma (entre 5 y 15 min) de solución de suelo inoculado con HBOA después de seis días, y su comparación con las características de la muestra de estándar. Con los criterios de tiempo de retención y máximos de absorción y forma de los espectros, HPMA se asume como la identidad de este pico cromatográfico a un tiempo de retención de 9 min, donde se ha propuesto que este compuesto proviene de una reacción de acilación de 2-aminofenol presente en el medio.

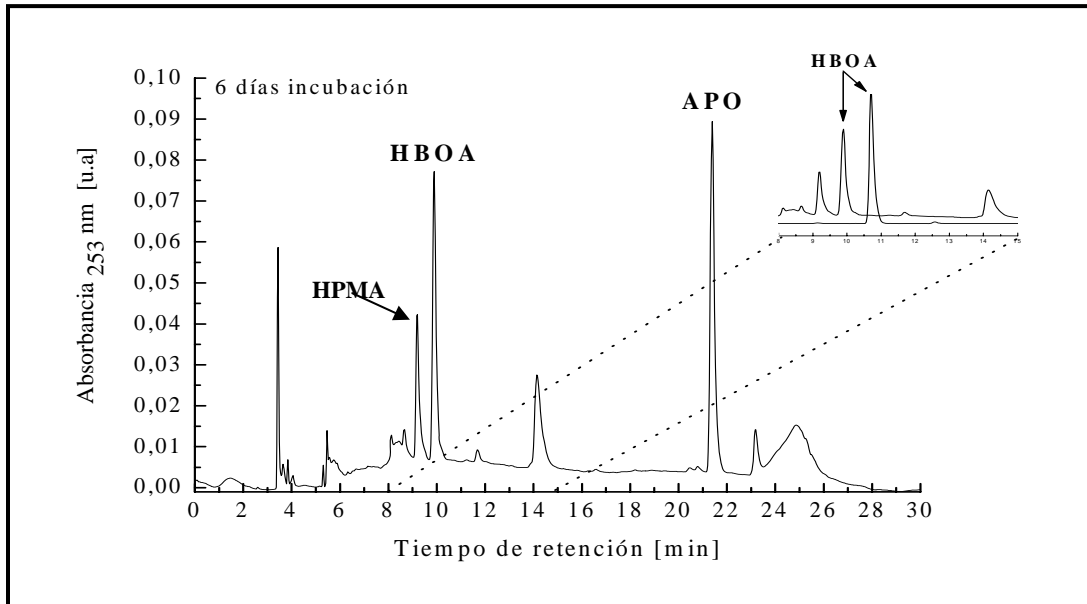


Fig. 4: Perfil cromatográfico de la solución de suelo, indicando el ácido 2-N-hidrofenilmalonámico (HPMA). Detalle: entre 8 y 14 min muestran comparación entre HBOA en control y tratamiento y la elusión de HPMA.

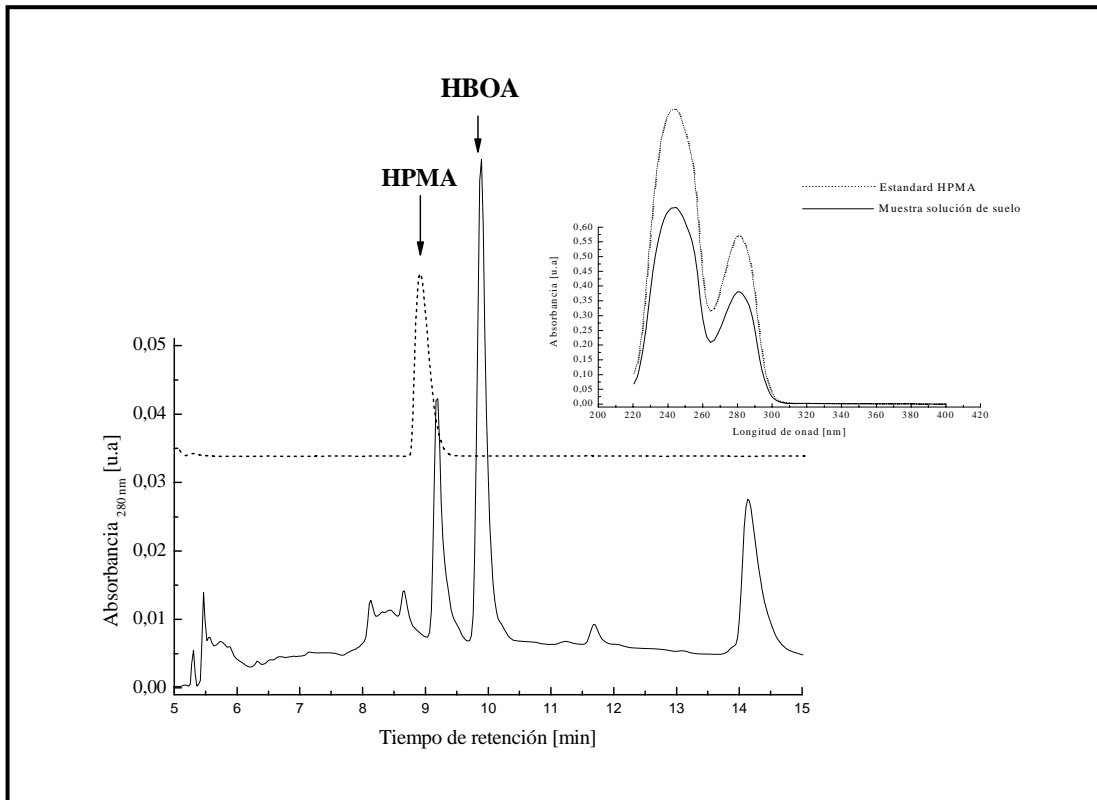


Fig. 5: Análisis cromatográfico para la detección y la identificación de HPMA en la biotransformación de HBOA en suelo. Comparación del tiempo de retención y espectro de absorción respecto a un estándar puro de HPMA.

Estudio cualitativo para N-(2-hidroxifenil)-acetamida (HPAA)

Los antecedentes sobre la biotransformación de HBOA por hongos, indican que además de la formación de HPMA a partir de 2-aminofenol mediante una reacción de acilación, este también es propuesto para la formación de N-(2-hidroxifenil)-acetamida (HPAA), en este caso, mediante una reacción de acetilación. Así, en el estudio cualitativo en la identificación de las diferentes especies en la biotransformación de HBOA en suelo, se incluyó el estudio de la presencia de HPAA. Así el estudio cromatográfico, registrado a 232 nm (máximo de absorción de HPAA), muestra la correspondencia entre el la señal del patrón de HPAA y el pico cromatográfico a un tiempo de retención de 6 min aproximadamente (Figura 6).

Los espectros de ultravioleta obtenidos, muy bien definidos para el estándar y la muestra de solución de suelo, muestra una evidencia para asociar este pico cromatográfico a la acetamida HPAA. De esta manera, HPMA y HPAA, especies detectadas en la biotransformación de HBOA en su cultivo con hongos, son también registrados en los proceso de biotransformación en suelo.

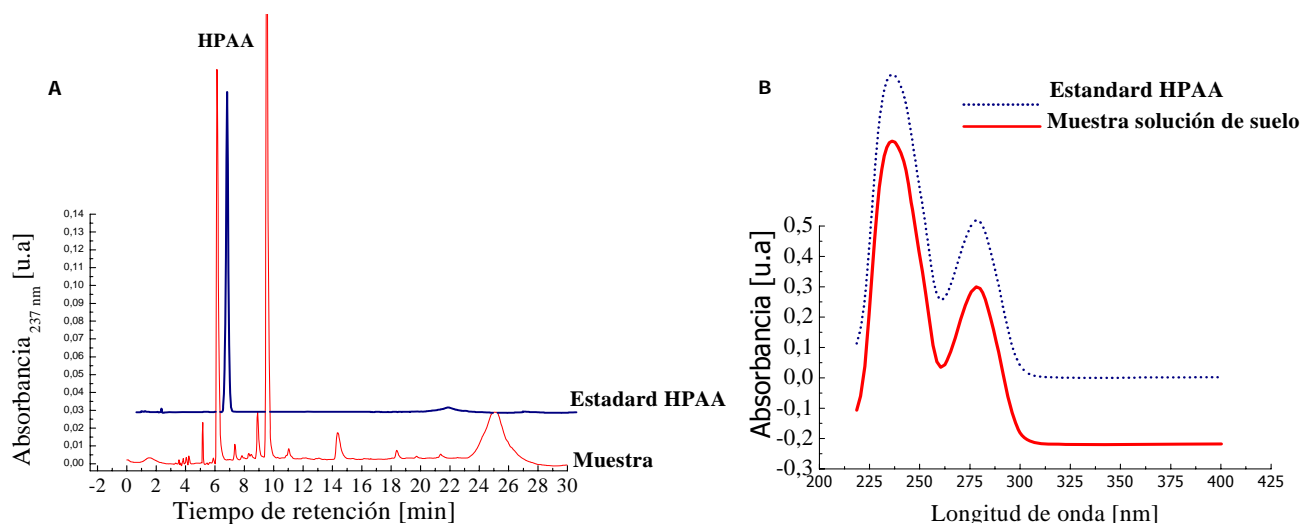


Fig. 6: a) Análisis cromatográfico para la detección y la identificación de N-(2hidroxifenil)-acetamida (**HPAA**) en la biotransformación de **HBOA** en suelo a 6 días de incubación. b) Comparación del espectro de absorción.

Estudio cualitativo para 2-aminofenol (AF), 2-amino-7-hidroxi-3H-fenoxacin-3H-3-ONA (APO) Y 2-acetamino-3H-fenoxazin-3-ONA (AAPO)

La presencia de HPMA y HPAA en las muestras de solución de suelo inoculadas con HBOA, hacen suponer la presencia de 2-aminofenol (AF), pues estas especies han sido propuestas como productos de reacciones de acilación y acetilación del AF (Zikmundová *et al.*, 2002a). De esta manera, se analizó la presencia de AF y APO, donde ya se ha indicado la posible presencia de APO.

Sin embargo, así como se estudio la presencia de HPMA, proveniente de la N-acetilación del AF, se estudio la presencia N-acetilado del APO (AAPO). En las Figuras 7 a 9, se muestran el estudio cromatográfico cualitativo para la identificación de AF, APO y AAPO en muestras de solución de suelo respectivamente. Como se suponía, tanto AF y APO son detectados en las muestras inoculadas con HBOA, sin embargo, se destaca la presencia del derivado acetilado del APO.

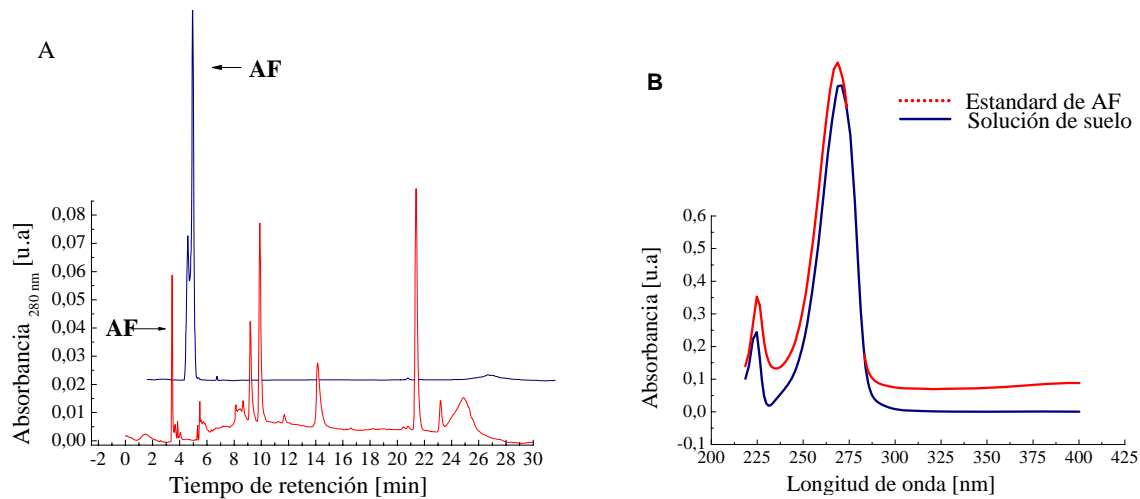


Fig. 7: A) Análisis cromatográfico para la detección y la identificación de 2-aminofenol (AF) en la biotransformación de HBOA. B) Comparación de espectro de absorción respecto a un estándar puro de AF.

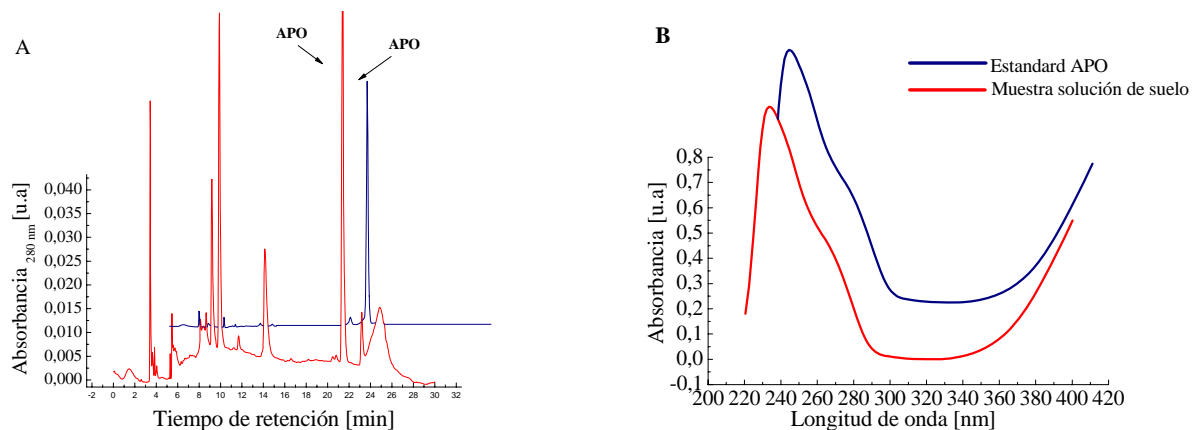


Fig. 8: A) Análisis cromatográfico de 2-amino-3H-fenoxazin-3-ona (APO) en la biotransformación de HBOA después de seis días de incubación. B) Comparación del espectro de absorción respecto al estándar puro de APO.

Estudio para N-(2-hidroxi-5-Nitrofenil)-acetamida [H(5)NPAA]

El análisis cromatográfico de los diferentes muestras de solución de suelo, muestras de solución de suelo fueron analizadas a diferentes longitudes de onda (datos no mostrados), encontrando picos cromatográfico adicionales cuando el análisis es realizado a 293 nm, donde es posible detectar e identificar además HBOA, dos señales, una de ellas ya analizada, atribuida a HPMA, y otra señal, muy significativa en 15 min de tiempo de retención.

De las características de los estándares, son los dos derivados nitrados los que más se correlacionan con en el tiempo de retención con este pico de compuesto desconocido así como con su espectro de ultravioleta y visible. Apelando a los antecedentes sobre la biotransformación de HBOA, y a las características cromatográficas de las diferentes especies de su biotransformación (Zikmundová *et al.*, 2002a), dos productos surgen como candidatos para esta señal a 15 min. Estos compuestos han sido citados como productos de la reacción de nitración sobre la N-(2-hidroxifenil)-acetamida (HPAA), siendo sus diferencias en la posición en que se aloje este grupo nitro en la reacción, orientado por el grupo hidroxilo (Figura 10).

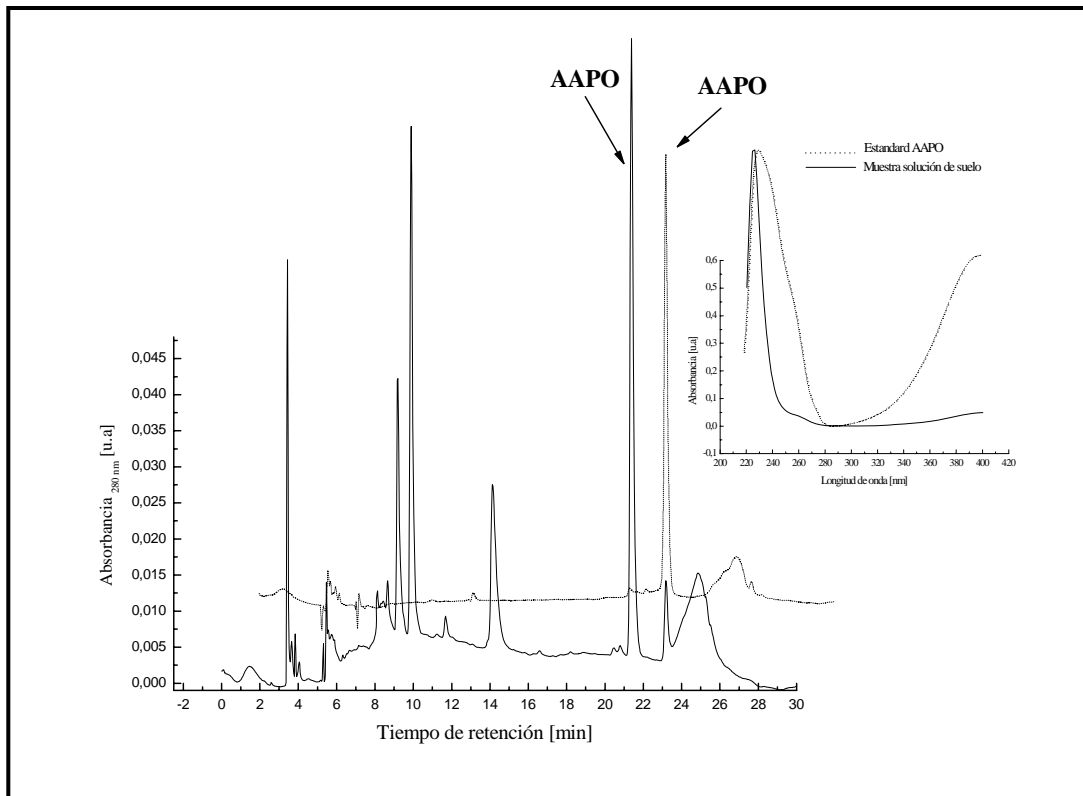


Fig. 9: A) Análisis de identificación de 2-acetilamino-3H-fenoxazin-3-ona (**AAPO**) en la biotransformación de **HBOA** en suelo (t= 6d). B) Comparación del espectro de absorción con el estándar puro de **AAPO**.

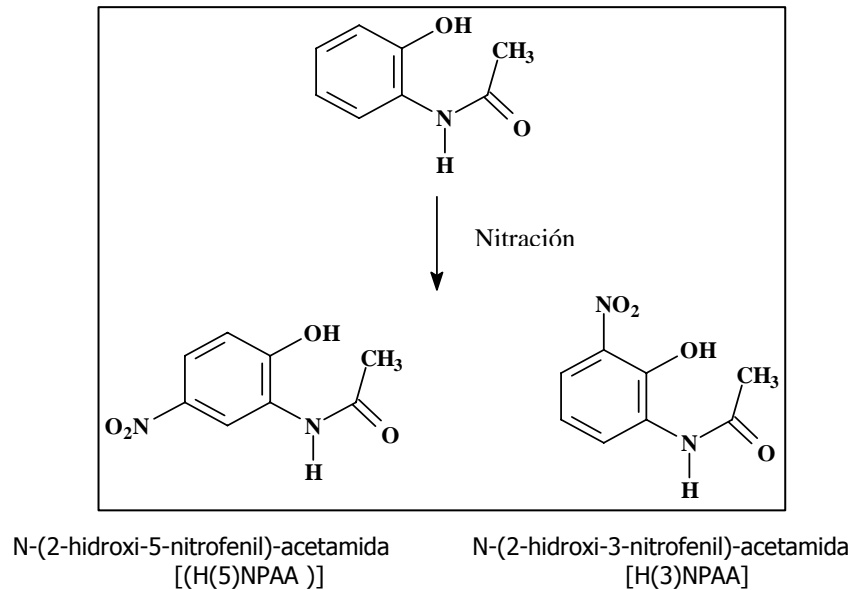


Fig. 10: Ruta para La transformación de N-(2-hidroxifenil)-acetamida (**HPAA**) mediante reacción de nitración llevado a cabo mediante inoculación de HBOA en sepas de hongos (Zikmudová *et al.* 2002a,b).

El análisis cromatográfico, en condiciones de separación similares a las empleadas aquí (fase inversa, agua y metanol como fase móvil, y gradiente de elución), muestra un tiempo de retención para estos completo de 14,5 min para el derivado 5-nitro; y 15,5 para el derivado 3-nitro (Zikmudová *et al.*, 2002a; Zikmudová *et al.*, 2002b). Con estos antecedentes, se sintetizaron los dos derivados nitrados, y su comportamiento cromatográfico y espectros ultravioletas se contrastan con los obtenidos para la señal a 15 min (Figura 11).

Como se observa, los dos isómeros eluyen a tiempos de retención similares, como resultado, éste no es concluyente para el análisis cualitativo. Sin embargo, los espectros ultravioletas entre los dos isómeros muestran diferencias significativas, representando un buen criterio para los estudios cualitativos. Al comparar los espectros de los dos isómeros con aquel generado por el pico a 15 min, la conclusión es la presencia sólo del isómero H(5)NPAA como productos de degradación de HBOA.

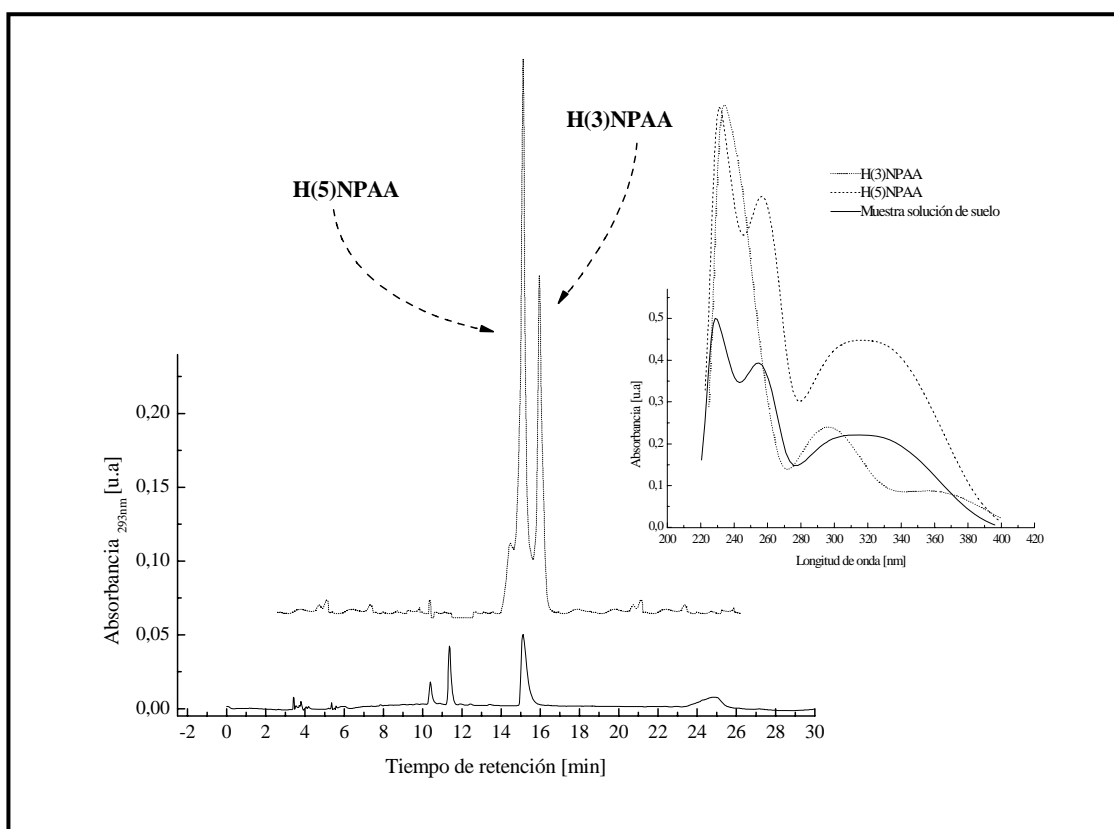


Fig. 11: Análisis cromatográfico para la identificación de **H(5)NPAA** en solución de suelo después de 12 días de incubación como producto de la biotransformación de HBOA.

Esquema de la biotransformación de HBOA en suelo

Con los resultados aquí mostrados, se plantea el esquema general de la biotransformación mostrada en la Figura 12. El primer paso propuesto, es la rápida apertura del hemiacetal, un equilibrio bien estudiado para los ácidos hidroxámicos (Atkinson *et al.*, 1991), y se considera un rasgo fundamental para las reacciones de degradación espontánea de estos compuestos. A partir de este hemiacetal se genera la benzoxazolinona correspondiente al ácido, MBOA y BOA para el caso de DIMBOA y DIBOA respectivamente. Para HBOA, esta apertura del hemiacetal, en lugar de originar la benzoxazolinona, se propone es la formación directa de AF. Este AF se considera una especie intermedia en la ruta de biotransformación, a partir del cual tres especies pueden formarse: APO, HPAA y HPMA, siendo este último un producto final de la biotransformación. En la ruta

de biotransformación se ha colocado primero una reacción de acetilación sobre el AF y luego la reacción de nitración. La orientación del grupo nitro es orto y para respecto al grupo hidróxido, y no respecto al grupo amino, lo cual pudiera indicar que la reacción de *N*-acetilación ocurre primero que la reacción de nitración. Como se puede concluir de este esquema, tres productos surgen como productos finales del proceso de biotransformación bajo las condiciones aquí empleadas: AAPO, HPMA y uno de los isómeros nitrados, [H(5)NPAA], con lo cual, la concentración de estas especies en el medio deben de aumentar en el tiempo. La reacción de oxidación de AF para general APO, ha sido bien documentada, la cual es una reacción espontánea, que no requiere la asistencia de microorganismo para alcanzar esta transformación.

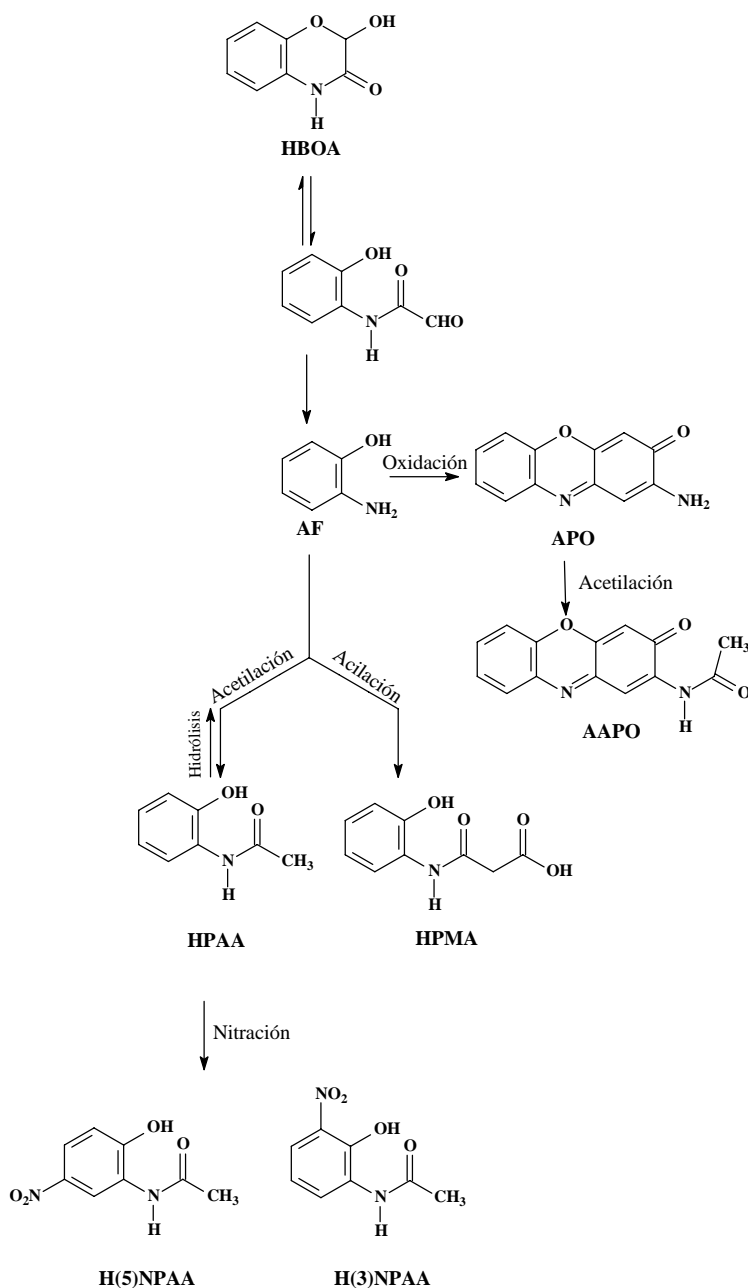


Fig.12: Esquema propuesto para la biotransformación de 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3(2H)-ona (**HBOA**) en suelo.

Sin embargo, es la reacción de acetilación de APO la que resulta interesante. Los estudios anteriormente reportados para la biotransformación en suelo de 2,4-dihidroxi-7-metoxi-(2-H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (DIMBOA) y 4-metoxi-(2-H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (DIBOA) (Macías *et al.*, 2004), no se detectaron derivados acetilados de APO y/o AMPO. La dosis aquí usada (1000 mg.Kg⁻¹ de suelo) es la misma aplicada en esos estudios, con lo cual la actividad de acetilación puede ser una característica del tipo de suelo, diferente entre esos estudios y el usado en la biotransformación de HBOA. Además de esta reacción de acetilación sobre APO, esta también tiene lugar sobre el AF para originar HPAA; estando también presente una reacción de acilación para generar HPMA. Sin embargo, otra posibilidad para la ausencia de la reacción de acetilación en los estudios de biotransformación para la serie de DIMBOA y DIBOA, resulta de la propia actividad de los compuestos inoculados. En estos estudios, las moléculas inoculadas pueden mostrar una mayor actividad antibiótica sobre los microorganismos del suelo, con lo cual, al momentos de su inoculación, la actividad microbiana (nivel poblacional y tipo de microorganismos) puede verse disminuida, afectándose de esta manera los procesos de biotransformación. En el caso de HBOA, una molécula que ha mostrado una menor actividad biológica, el impacto negativo inicial es menor, y así la extensión del proceso de biotransformación es más amplia, registrándose un mayor número de especies biotransformadas.

Estas reacciones enzimáticas, pertenecientes al grupo de enzimas transferasas, es un mecanismo de inactivación de antibióticos muy común entre las bacterias para lograr resistencias frente a agentes xenobióticos, cuyo principio es eliminar, mediante modificación covalente, grupos hidróxidos o aminos, y atenuar su capacidad de enlace sobre los sitios específicos, y como consecuencia, una inactivación del modo de acción de los xenobióticos. De estas reacciones enzimáticas resultan compuestos biológicamente estables, y por lo tanto, son esencialmente procesos irreversibles, es por esto que en el esquema de biotransformación se indica esta reacción en un solo sentido para las reacciones de acilación y nitración. Sin embargo, para la reacción de acetilación para generar HPAA, se ha indicado una situación de equilibrio, acetilación como reacción directa y hidrólisis como reacción inversa, debido a que los experimentos de degradación inoculando directamente el intermediario HPAA, se ha detectado la presencia de AF, HPMA, APO y AAPO, evidenciando el proceso de hidrólisis que sufre HPAA para generar AF (datos no mostrados). Estas enzimas transferasas son muy frecuentes en suelo, y por tanto no es sorprendente encontrar este tipo de reacciones en los compuestos inoculados en suelo, sin embargo para este tipo de moléculas, las cuales evolucionan con AF como especie intermedia, los resultados aquí mostrados son novedosos, pues no existen antecedentes sobre la detección de derivados de reacciones de acilación y nitración para la biotransformación de estas moléculas en el suelo.

Distribución de especies químicas durante la biotransformación de HBOA

En la Figura 13, se muestran el comportamiento de las señales registradas para las especies detectadas durante el proceso de biotransformación de HBOA, a partir de las cuales varias conclusiones pueden ser desarrolladas referentes al mecanismo o esquema de biotransformación propuesto. De las seis especies estudiadas, AF y HPAA son las que muestran un comportamiento más irregular, debido quizás a su carácter de intermedio de biotransformación, lo que hace que sus concentraciones muestren fluctuaciones en el tiempo, pues son especies a partir de las cuales se generan hasta dos productos de manera directa.

Por ejemplo, a partir de AF se genera HPAA y HPMA, y en un segundo proceso, HPAA genera H(5)NPAA, siendo la concentración de AF dependiente de un amanaera directa de dos reacciones (acetilación y acilación), y de manera indirecta, de una reacción de nitración. Es difícil explicar el comportamiento encontrado para las especies intermedias, donde solo se destaca la existencia de un máximo a tres días de incubación para AF y HPAA, debido quizás a la respuesta inicial de los microorganismos del suelo a la presencia del tóxico. Para APO y AAPO, la situación es sensiblemente diferente, donde se encuentra un aumento en la señal registrada para APO a partir de tres días de incubación, no detectándose el compuesto a tiempos inferiores de incubación, alcanzándose un máximo a seis días de incubación, para luego disminuir gradualmente. Para el caso de AAPO, el máximo se encuentra desplazado en el tiempo respecto al APO, estando a un tiempo de 12 días, lo que puede ser indicativo de la secuencia de reacción para generar AAPO a partir de APO. Al final del tiempo de estudio, se

encuentra que la señal para **APO** disminuye gradualmente, mientras que **AAPO** permanece relativamente constante después de alcanzado ese máximo.

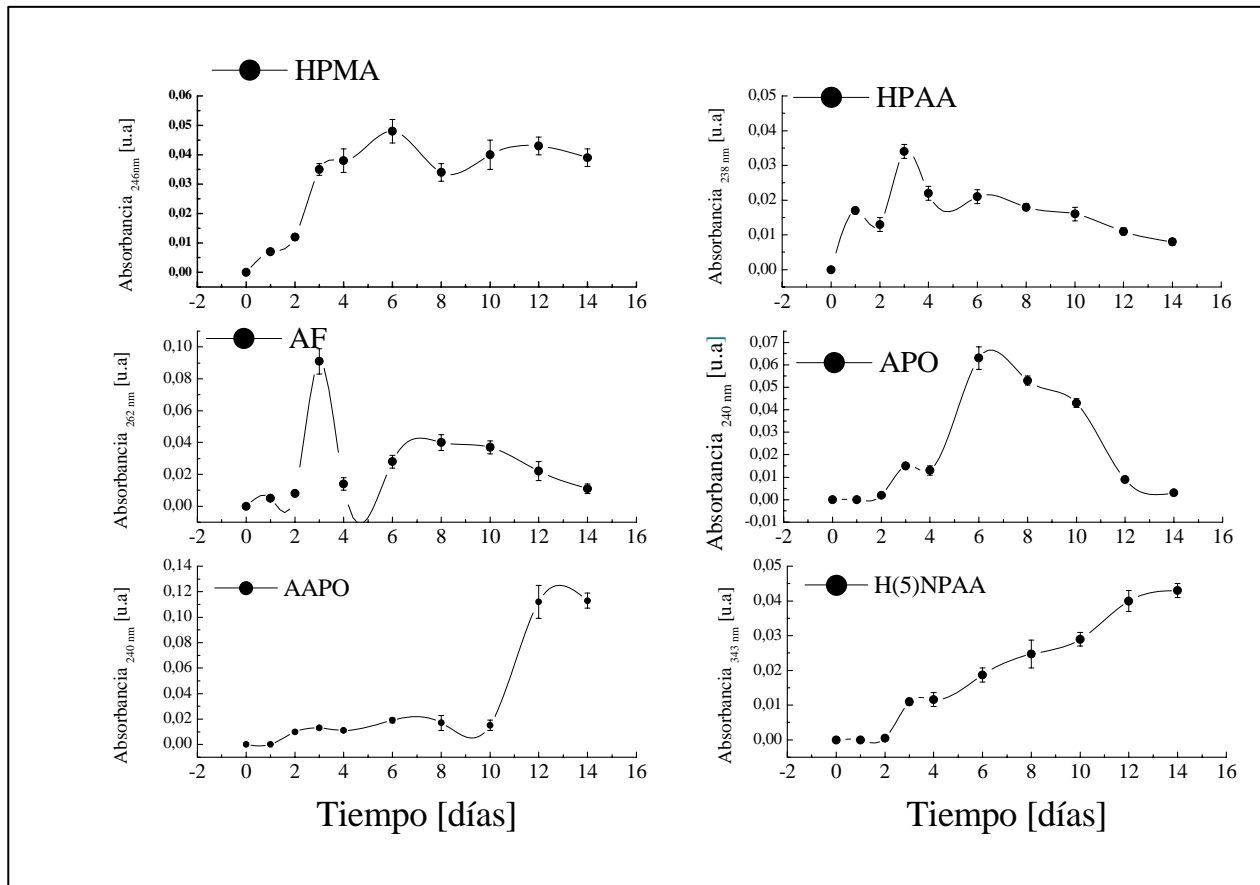


Fig. 13: Variación en la concentración de las diferentes especies detectadas durante la biotransformación de HBOA en suelo, a diferentes tiempos de incubación.

En principio la situación debería ser un aumento gradual en la señal de AAPO si la señal de APO disminuye, sin embargo, lo observado es una concentración relativamente constante. Una explicación para este hecho, es la conversión de APO a otras especies no detectadas, con lo cual la transformación de APO a AAPO no es cuantitativa, de manera que la relación de concentración entre ellos deja de ser directa. Algunos estudios de la biotransformación de BOA en suelo, ha mostrado que existe la posibilidad de formación de otras especies relacionadas a APO, donde especies altamente hidroxiladas son propuestas como especies posibles de ser formadas (Fomsgaard *et al.*, 2004).

Por otra parte, dos especies aumenta gradualmente su señal durante el tiempo de incubación, HPMA y H(5)NPAA, los cuales son productos finales en el esquema de biotransformación propuestos. En la Tabla 2 se resumen los resultados del análisis cualitativo para la inoculación de las diferentes especies detectadas durante la biotransformación de HBOA. Como se resume, las especies que han sido propuestas como finales en la ruta de biotransformación, tales como HPMA y AAPO, no muestran biotransformación en las condiciones estudiadas, donde los niveles de concentración se mantienen próximos a las inoculadas. Por otra parte, la inoculación de suelo con AF, resulta en la detección de todas las especies detectadas en la biotransformación de HBOA, demostrando la clasificación de intermedio inicial en el esquema de biotransformación.

Como productos finales, se encuentra que esta especies son las que estarán en mayor concentración al final del periodo de incubación, por tanto, han de ser las a tener en cuenta al momento de estudiar el destino final de las lactamas de los ácidos hidroxámicos una vez que sean transferidos al suelo, y de cuya actividad biológica dependerá el impacto y contribución de estos aleloquímicos sobre la ecología de la planta. Como se desprende de la Tabla 2, es necesario realizar un estudio más detallado de los tiempos de disipación de las diferentes especies intermedias detectadas, así como la caracterización de otros posibles especies, a fin de estimar las concentraciones de la especies a diferentes tiempos de incubación, con el objetivo de ponderar los efectos biológicos con las especies mayoritarias, según la duración de los ensayos estudiados.

Tabla 2: Análisis cualitativo de las especies químicas detectadas en la biotransformación de HBOA en suelo.

Inoculado	Detectado					
	AF	HPAA	HPMA	APO	AAPO	H(5)NPAA
HBOA	+	+	+	+	+	+
HPAA	+	+	+	+	+	+
HPMA	-	-	+	-	-	-
AF	+	+	+	+	+	+
APO	-	-	-	+	+	-
AAPO	-	-	-	-	+	-

+: Detectado, -: No detectado. Dosis: 250 mg Kg.⁻¹ de suelo. Tiempo de incubación seis días.

CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en este trabajo indican que la lactamas de ácidos hidroxámicos, HBOA, experimenta una biotransformación en suelo, que origina una amplia variedad de especies químicas, cuyas concentraciones fluctúan en el tiempo, debido a su carácter de producto final y/o intermedios de biotransformación. El tiempo de vida media muestra que este aleloquímico en el suelo, luego de su liberación, puede ejercer un efecto biológico, sin embargo, debido a la variedad de especies químicas detectadas, es probable que la acción biótica medida para este compuesto, sea una consecuencia de la acción de otras especies. Esto hace difícil el estudio de los efectos alelopáticos asociados a un aleloquímico, siendo la proposición de una acción de mezclas de compuestos la que pueda explicar las actividades registradas.

Estos productos estarán presente tanto en suelo, como en las diferentes soluciones acuosas donde se llevan a cabo la mayoría de las pruebas biológicas, de tal manera que los resultados de estos ensayos deben de ser cuidadosamente re analizados, en busca de evaluar la participación de estos productos de biotransformación en las actividades estudiadas. El estudio del destino y la toxicidad de los productos directamente liberados por las plantas, incluyendo sus materiales de degradación, proporcionará información altamente valiosa y útil en la investigación dentro del campo de la alelopatía. Tomando en cuenta estos fenómenos de degradación, el desarrollo de los aleloquímicos de las plantas como modelos naturales de herbicida podía ser mucho más eficiente. El hecho de que en la mayoría de los casos, los aleloquímicos son liberados al medio a través de diferentes medios, siendo la exudación por raíz el mecanismo más activo y dinámico, implica una interacción ineludible del aleloquímico con el suelo, interaccionando con su biótica natural, y como consecuencia, sufrir modificaciones tanto estructurales como de su concentración. Todas estas interacciones pueden determinar la estructura y niveles de acumulación de los aleloquímicos liberados, así su potencial fitotóxico pudiera depender de la difusión del compuesto a través de la solución de suelo, destino final y persistencia en el suelo.

Los resultados aquí mostrados constituyen un modelo regulado bajo condiciones de laboratorio, en el cual los fenómenos asociados a las condiciones de cultivo, tales como lluvia, volatilización, adsorción por otras plantas presentes, fotólisis o lixiviado a mayores profundidades del suelo no están presentes. Sin embargo, este trabajo es una buena aproximación al hecho de que los aleloquímicos clásicamente asociados a una gran diversidad de actividades biológicas pueden ser transformados por diferentes procesos e interacciones una vez que estos son liberados.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) ADG de la Universidad de Los Andes, Venezuela. Se agradece el financiamiento a AOB por la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Bolsa de Pesquisador Visitante – PV 2011, Brasil.

NOMENCLATURA

AAPO	: 2-acetamino-3H-fenoxazin-3-ona
AF	: 2-aminofenol
APO	: 2-amino-7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona
BOA	: 2-benzoxazolinone
CC	: Cromatografía en columna
DIBOA	: 2,4-dihydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
DIMBOA	: 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
HBOA	: 2-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona
HPAA	: N-(2-hidroxifenil)-acetamida
HPMA	: 2-hidroxi-N-(2-hidroxifenil)-acetamida
H(3)NPAA	: N-(2-hidroxi-3-nitrofenil)-acetamida
H(5)NPAA	: N-(2-hidroxi-5-nitrofenil)-acetamida
HPLC	: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
MBOA	: 6-methoxy-2-benzoxazolinone
RMN	: Resonancia Magnética Nuclear
TLC	: Cromatografía en Capa Fina

REFERENCIAS

1. Argandoña, V.H., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M. & Campell, B.C. (1983). Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from Graminae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*. *Entomol. Exp. Appl.*, 34 (2), 134-138.
2. Atkinson, J., Morand, P., Arnason, J.T., Niemeyer, H.M. & Bravo, H.R. (1991). Analogs of the cyclic hydroxamic acid 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA): decomposition to benzoxazolinones and reaction with mercaptoethanol. *J. Org. Chem.*, 56 (5), 1788-1800.
3. Barnes, J.P. & Putnam, A.R. (1987). Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). *J. Chem. Ecol.*, 13 (4), 889-906.
4. Blum, U. (2011). Plant-Plant Allelopathic Interactions Plant-Plant Allelopathic Interactions. 1r Edition, Springer. New York. 200 p.
5. Bravo, H.R., Copaja, S.V. & Argandoña, V.H. (2004). Chemicals basis for the antifeedant activity of natural hydroxamic acids and related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (9), 2598-2601.
6. Bravo, H.R. & Lazo, W. (1996). Anti-algal and antifungal activity of natural hydroxamic acids and related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (6), 1569-1571.
7. Brown, P., Morra, M. & Borek, V. (1994). Gas Chromatography of Allelochemicals Produced during Glucosinolate Degradation in Soil. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (9), 2029-2034.
8. Chase, W., Nair, M. & Putman, A. (1991a). 2,2-oxo-1,1-azobenzene: Selective toxicity of Rye (*Secale cereale* L.) allelochemicals to weed and crop species: II. *J. Chem. Ecol.*, 17, 9-19.

9. Chase, W., Nair, M., Putnam, A. & Mishra, K. (1991b). 2,2-oxo-1,1-azobenzene: Microbial transformation of rye (*Secale cereale* L.) allelochemical in field soil by *Acinetobacter cacoeticus*: III. *J. Chem. Ecol.*, *17*, 1575-1583.
10. Eljarrata, E., Guillamóna, M., Seumaa, J., Mogensenb, B., Fomsgaard, I.S., Oliveros-Bastidas, A., *et al.* (2004). First European interlaboratory study of the analysis of benzoxazinone derivatives in plants by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1047* (1), 69-76.
11. El-Khatib, A.A., Hegazy, A.K. & Galal, H.K. (2004). Allelopathy in the rhizosphere and amenden soil of *Chenopodium murale* L. *Weed Biol. Manag.*, *4* (1), 35-42.
12. FATEALLCHEM project (Fate and Toxicity of Allelochemicals in Relation with the Environment and Consumer) is financially supported by the European Commission under the programme 'Quality of life and management of living resources (1998 to 2002)', contract no. QLRT-2000-01967. <http://www.fateallchem.dk/>. (Acceso el 15 de marzo de 2012).
13. Fomsgaard, I.S., Mortensen, A.G. & Carlsen, S.C.K. (2004). Microbial transformation products of benzoxazolinone and benzoxazinone allelochemicals-a review. *Chemosphere*, *54* (8), 1025-1038.
14. Fox, P. & Makam, R. (2011). Kinetics of model high molecular weight organic compounds biodegradation in soil aquifer treatment. *Water Res.*, *45* (15), 4419-4427.
15. Friebe, A.V., Vilich, V., Hennig, L., Kluge, M. & Sicker, D. (1998). Detoxifications of benzoxazolinone allelochemicals from wheat by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *G. graminis* var. *graminis*, *G. graminis* var. *avenae*, and *Fusarium culmorum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *64* (7), 2386-2391.
16. Gagliardo, R. & Chilton, W. (1992). Soil transformation of 2(3H)-benzoxazolone of rye into phytotoxic 2-amino-3H-phenoxazin-3-one. *J. Chem. Ecol.*, *18* (10), 1683-1691.
17. Gardiner, J., Morra, M., Eberlein, Ch., Brown, P. & Borek, V. (1999). Allelochemicals Released in Soil Following Incorporation of Rapeseed (*Brassica napus*) Green Manures. *J. Agric. Food Chem.*, *47* (9), 3837-3842.
18. Glenn, A.E., Meredith, F.I., Morrison, W.H. & Bacon, C. (2003). Identifications of Intermediate and Branch Metabolites Resulting from Biotransformation of 2-Benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *69* (6), 3165-3169.
19. Grayston, S.J., Wang, S., Campell, C.D. & Edwards, A.C. (1998). Selective influence of plant species on Microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, *30* (3), 369-378.
20. Homklin, S., Ong, S. & Limpiyakorn, T. (2011). Biotransformation of 17 α -methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. *Chemosphere*, *82*, 1401-1407.
21. Klun, J.A., Tipton, C.L. & Brindley, T.A. (1967). 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European corn borer. *J. Entomol.*, *60* (6), 1522-1533.
22. Kobayashi, K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol. Manag.*, *4* (1), 1-7.
23. Kong, C., Wang, P., Gu, Y., Xu, X. & Wang, M. (2008). Fate and Impact on Microorganisms of Rice Allelochemicals in Paddy Soil. *J. Agric. Food Chem.*, *56*, 5043-5049.
24. Kumar, S. & Kumar, N. (2011). Potential of mycorrhizal fungi in ecosystem: A Review. *Int. J. res. Bot.*, *1*, 1-7.
http://www.excedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/

25. Macías, F.A., Oliveros-Bastidas, A., Marín, D., Castellano, D., Simonet, A.M. & Molinillo, J.M.G. (2004). Degradation Studies on Benzoxazinoids. Soil Degradation Dynamics of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) and Its Degradation Products, Phytotoxic Allelochemicals from *Gramineae*. *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 6402-6413.
26. Macías, F.A., Oliveros-Bastidas, A., Marín, D., Castellano, D., Simonet, A.M. & Molinillo, J.M.G. (2005). Degradation Studies on Benzoxazinoids. Soil Degradation Dynamics of (2R)-2-O-β-D-Glucopyranosyl-4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA-Glc) and Its Degradation Products, Phytotoxic Allelochemicals from *Gramineae*. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 554-561.
27. Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Chinchilla, D., Simonet, A.M. & Molinillo, J.M.G. (2006). Isolation and Synthesis of Allelochemicals from *Gramineae*: Benzoxazinones and Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, *54* (4), 991-1000.
28. Matthies, M., Witt, J. & Klasmeier, J. (2008). Determination of soil biodegradation half-lives from simulation testing under aerobic laboratory conditions: A kinetic model approach. *Environ. Pollut.*, *156*, 99-105.
29. Mortensen, G., Strobel, B. & Hansen, H. (2006). Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. *Chemosphere*, *62* (10), 1673-1680.
30. Murphy, C.D. (2010). Biodegradation and biotransformation of organofluorine compounds. *Biotechnol. Lett.*, *32*, 351-359.
31. Murphy, J. & Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analitica Chimica Acta*, *27*, 31-36
32. Nair, M., Curt, J., Whitenack, C.J. & Putnam, A. (1990). 2,2'-Oxo-1,1'-azobenzene. A microbially transformed allelochemical from 2,3-benzoxazolinone: I. *J. Chem. Ecol.*, *16* (2), 353-364.
33. Niemeyer, H.M. (1988). Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the *Graminae*. *Phytochemistry*, *27*(11), 3349-3358.
34. Niemeyer, H.M., Pesel, E., Franke, S. & Franke, W. (1989). Ingestions of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. *Phytochemistry*, *28* (9), 2307-2310.
35. Olsen S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. & Dean, L.A. (1954). Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. USDA Circ. 939. United States Department of Agriculture, Washington D.C.
36. Pérez, F.J. & Ormeño-Núñez, J. (1991). Difference in hydroxamic acid contents in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): possible role in allelopathy. *J. Chem. Ecol.*, *17*(6), 1037-1043.
37. Pimentel, M., Molina, G., Dionísio, A., Maróstica, M. & Pastore, G. (2011). The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and their Application in Biotransformation Process. *Biotechnol. Res. Int.*, Article ID 576286, 1-11.
38. Pratt, K., Kumar, P. & Chilton, W. (1995). Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants. *Biochem. Syst. Ecol.*, *23* (7-8), 781-785.
39. Saharan, B. & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *LSMR*, 1-30.

40. Schollenberger, C.J. & Simon, R.H. (1945). Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil. *Soil Sci.*, 59(1), 13-24.
41. Scow, K.M. (1982). In Handbook of chemicals property estimation methods; Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H., Eds.; McGraw Hill: New York, p. 9-11
42. Scow, K.M. & Alexander, M. (1989). In Reactions and movement of organic chemistry in soils; Sawhney, B.L., Brown, K., Eds.; Soil Science Society of American Society of Agronomy; Madison, WI, p. 243.
43. Sturz, A.V. & Christie, B.R. (2003). Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant diseases with rhizobacteria. *Soil Till. Res.*, 72(2), 107-123.
44. Wahlroos, O. & Virtanen, I. (1995). The precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. *Acta Chem. Scand.*, 13, 1906-1908.
45. Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Helgeson, J.P., Kelman, A. & Upper, C.D. (1978). Factors that influence the activity of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one on *Erwinia* species in growth assays. *Plant Physiol.*, 61(5), 803-805.
46. Zikmudová, M.; Drandarov, K.; Bigler, L.; Hesse, M.; Werner, C. (2002a); *Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from Aphelandra Tetragona*. *Appl. and Env. Microbiology*: 68(10), 4863-4870.
47. Zikmudova, M., Drandarov, K., Hesse, M. & Werner, C. (2002b). Hydroxylated 2-amino-3H-phenoxazin-3-one derivatives as product of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) biotransformation by *Chaetosphaeria sp.* and endophytic fungus from *Aphelandra tetragona*. *Z. Naturforsch.*, 57(7-8), 660-665.

