



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Chiná

**TESIS**

**Evaluación del efecto fitotóxico de dos potenciales herbicidas a base de *Metopium brownei* (chechén) y *Viguiera dentata* (tajonal)**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS EN AGROECOSISTEMAS  
SOSTENIBLES**

PRESENTA:  
**Augusto Esaú López Vadillo**

**Chiná, Campeche, México (Febrero 2021).**



Calle 11 s/n entre 22 y 28, C.P. 24520  
Chiná, Campeche. Tel. (981) 82-  
72052 y 82-72082E-mail:  
dir01\_china@tecnm.mx  
tecnm.mx | china.tecnm.mx





División de Estudios de Posgrado e Investigación  
China, Campeche **22/Febrero/2021**  
Oficio Tesis MCAGS-07  
ASUNTO: Aprobación

**C. AUGUSTO ESAÚ LÓPEZ VADILLO  
PRESENTE**

El que suscribe, manifiesta que el Dictamen emitido por el Comité de Revisión que integra el sínodo del trabajo de tesis denominado "Evaluación del efecto fitotóxico de dos potenciales herbicidas a base de *Metopium brownei* (chechén) y *Viguiera dentata* (tajonal)". Es aprobado como requisito parcial para obtener el Grado de **MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROECOSISTEMAS SOSTENIBLES**.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica  
Aprender Produciendo*



**JOSE JAVIER PERALTA COSGAYA  
DIRECTOR**

**IIPC/MCRA/JFMP**



S.E.P.  
T.N.M.  
INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
DE CHINA  
CLAVE:  
84DIT0002



Calle 11 de mayo 22 y 26, C.P. 24520  
China, Campeche. Tel: (981) 32 72100 y 83 72082  
E-mail: 2011\_@itcnm.com.mx  
Sitio web: www.itcnm.com.mx



## COMITÉ REVISOR

"Este trabajo fue revisado y aprobado por este comité y presentado por el C. Augusto Esaú López Vadillo, como requisito parcial para obtener el **Grado de Maestro en Ciencias en Agroecosistemas Sostenibles**, el día 22 del mes de febrero del año 2021 en Chiná, Campeche".

Dra. Norma Laura Rodríguez Ávila  
Presidente



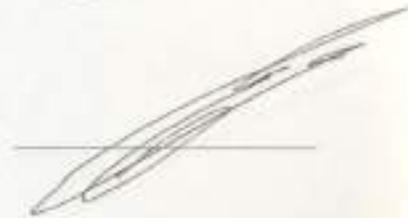
M.C. Jesús Froylán Martínez Puc  
Secretario



Dr. Juan Carlos Camacho Chab  
Vocal



M.C. Enrique Arcocha Gómez  
Suplente



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en el presente documento deriva de los estudios realizados para alcanzar los objetivos planteados en mi trabajo de tesis, en las instalaciones del Instituto Tecnológico de China. De acuerdo con lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de China. Por otra parte, de acuerdo a lo manifestado, reconozco de igual manera que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de la información generada en el desarrollo del presente estudio, le pertenecen patrimonialmente al Instituto Tecnológico de China de manera que si se derivasen de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: López Vadillo Augusto Enah

## Resumen

Los bioplaguicidas son una alternativa ecológica al uso de productos fitosanitarios convencionales, los cuales son utilizados en la agricultura orgánica (AO), Manejo Integrado de Plagas (MIP) y agricultura convencional. Los bioplaguicidas presentan altas tasas de degradación y menores efectos negativos en la salud humana, en comparación con los plaguicidas convencionales. El documento de tesis se presenta en dos principales capítulos, el primero incluye una revisión sobre el comportamiento de los bioplaguicidas en el suelo, con énfasis en los procesos de adsorción y degradación en el suelo, los efectos de los bioplaguicidas sobre la comunidad microbiana del suelo, y los métodos analíticos para su extracción y cuantificación. La técnica QuEChERS permite realizar extracciones exitosas de bioplaguicidas en suelo en un mayor número de bioplaguicidas y en un rango amplio de concentraciones que métodos convencionales como Soxhlet y extracción sólido líquido (SLE). Por su parte en la detección y cuantificación se deben combinar métodos espectroscópicos y cromatográficos que permiten una determinación rápida y precisa. Se ha encontrado que, en presencia de arcillas y materia orgánica, algunas piretrinas y nicotinas son fuertemente retenidas en el suelo, y que *B. thuringiensis*, spinosad, rotenona tienen vida media en intervalos de 1 – 40 días en condiciones ambientales. El segundo capítulo presenta la investigación sobre el uso de dos extractos acuosos de plantas nativas de la península de Yucatán, con propiedades alelopáticas: *Metopium brownei* (chechén) y *Viguiera dentata* (tajonal), aplicados solos, combinados entre sí y combinados con dosis bajas de atrazina (herbicida sintético). El objetivo general era determinar a través de bioensayos *in vitro* y de campo su eficiencia para el control de la maleza de la región. En la primera parte del experimento, los tratamientos de MB, MB y VD combinado y VD combinado con atrazina fueron los más eficaces en el control de arvense, a los 90 días de la primera aplicación. En la segunda parte del experimento los tratamientos de MB y VD combinados y VD combinado con atrazina presentaron un control cercano al 50% sobre la arvense, a los 44 d. Los herbicidas botánicos combinados entre sí y con atrazina tuvieron un control de 50.0% sobre la maleza a los 44 d.

**Palabras clave:** Herbicida botánico, bioplaguicida, maleza

## Abstract

Biopesticides are an ecological alternative to the use of conventional phytosanitary products, which are used in organic agriculture (OA), Integrated Pest Management (IPM) and conventional agriculture. Biopesticides have high degradation rates and fewer negative effects on human health, compared to conventional pesticides. The thesis document is presented in two main chapters, the first includes a review on the behavior of biopesticides in the soil, with emphasis on the adsorption and degradation processes in the soil, the effects of biopesticides on the soil microbial community and the analytical methods for its extraction and quantification. The QuEChERS technique allows successful extraction of biopesticides in soil in a greater number of biopesticides and in a wide range of concentrations than conventional methods such as Soxhlet and solid liquid extraction (SLE). On the other hand, in the detection and quantification, spectroscopic and chromatographic methods must be combined that allow a fast and precise determination. It has been found that, in the presence of clays and organic matter, some pyrethrins and nictines are strongly retained in the soil, and that *B. thuringiensis*, spinosad, rotenone have half-lives in ranges of 1-40 days under ambient conditions. The second chapter presents the research on the use of two aqueous extracts of native plants of the Yucatan peninsula, with allelopathic properties: *Metopium brownei* (chechén) and *Viguiera dentata* (tajonal), applied alone, combined with each other and combined with low doses of atrazine (synthetic herbicide). The general objective was to determine its efficiency for the control of weeds in the region through *in vitro* and field bioassays. In the first part of the experiment, the MB, MB and RV combined treatments and RV combined with atrazine were the most effective in controlling weeds, 90 days after the first application. In the second part of the experiment, the combined MB and RV treatments and the combined RV with atrazine showed a control close to 50% on the weed, at 44 d. The botanical herbicides combined with each other and with atrazine had a 50.0% control over the weed at 44 d.

**Keywords:** Botanical herbicide, biopesticide, weed

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los dos años de estudios.

Al Tecnológico Nacional de México (TECNM) por el financiamiento del proyecto CLAVE: 6380.19.

Al Tecnológico Nacional de México (TECNM) Campus Chiná por las instalaciones para realizar los trabajos correspondientes a la tesis.

De igual manera agradezco el apoyo y dedicación de mi director de tesis Dr. Milton Carlos Soto Barajas, y asesoras, Dra. Norma Laura Rodríguez Ávila y Dra. Blanca Lucía Prado Pano.

Agradezco también a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a que este trabajo llegara a buen término y que no menciono en estos agradecimientos.

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación.....	7
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivos.....	9
6. Literatura citada.....	10
7. Capítulo 1: Comportamiento de los bioplaguicidas en el suelo, extracción y cuantificación.....	14
7.1. Resumen.....	14
7.2. Introducción.....	15
7.3. Definición de bioplaguicidas y su situación actual a nivel internacional.....	17
7.4. Sorción de bioplaguicidas en el suelo.....	21
7.5. Degradación de bioplaguicidas en el suelo.....	24
7.5.2. Efecto de la temperatura en la degradación de los BP.....	28
7.5.3. Efecto de la concentración de materia orgánica en la degradación de los BP.....	28
7.5.4. Efecto de la concentración del pH en la degradación de BP.....	29
7.5.5. Efecto de microorganismos: biodegradación.....	29
7.6. Efectos de los bioplaguicidas sobre los microorganismos del suelo.....	31
7.7. Métodos analíticos para la determinación de bioplaguicidas en suelo.....	34
7.7.1. Preparación de la muestra.....	35
7.7.2. Métodos de extracción para bioplaguicidas en suelo.....	35
7.7.3. Métodos para la detección y cuantificación de bioplaguicidas en el suelo.....	39
7.7.3.1. Métodos cromatográficos.....	40
7.7.4. Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas.....	41
7.8. Conclusiones.....	43

8. Capítulo 2: Evaluación del efecto fitotóxico de dos potenciales herbicidas a base de <i>Metopium brownei</i> (chechén) y <i>Viguiera dentata</i> (tajonal).....	53
8.1. Resumen .....	53
8.2. Introducción.....	54
8.3. Materiales y métodos.....	56
8.3.1. Elaboración de los herbicidas botánicos .....	56
8.3.2. Tamizaje fitoquímico de herbicidas botánicos .....	57
8.3.3. Fitotoxicidad de los herbicidas botánicos sobre semillas de <i>Zea mays</i> (maíz).....	57
8.3.4. Evaluación de los herbicidas.....	58
8.3.4.1. Procedimiento de evaluación de los herbicidas botánicos y atrazina en campo	58
8.3.5. Evaluación de los herbicidas botánicos y atrazina sobre un terreno cultivado .....	59
8.3.5.1. Siembra del cultivo.....	59
8.3.5.2. Aplicación y valuación de los herbicidas .....	59
8.3.6. Diseño Experimental .....	59
8.4. Resultados y discusión.....	61
8.4.1. Tamizaje fitoquímico de los herbicidas botánicos .....	61
8.4.2. Análisis fitotóxico <i>in vitro</i> de maíz ( <i>Zea mays</i> ).....	62
8.4.3. Evaluación de los herbicidas botánicos en suelo sin vegetación .....	63
8.4.4. Evaluación de los herbicidas botánicos con un cultivo de maíz.....	65
8.4.4.1. Análisis fitotóxico de los herbicidas botánicos sobre el desarrollo de <i>Zea mays</i> en campo .....	68
8.5. Conclusiones.....	70
Agradecimientos .....	70
8.6. Literatura citada.....	71
8.7. Acuse de recibido de la revista <i>Agrociencia</i> .....	74
9. Conclusiones finales .....	75

## **Índice de cuadros**

Cuadro 1. Descripción de las características de algunos bioplaguicidas comerciales.....	18
Cuadro 2. Degradación de los bioplaguicidas en el suelo en función de las condiciones ambientales .....	25
Cuadro 3. Ejemplo de técnicas de extracción utilizadas para la extracción de BP en suelo ..	34
Cuadro 4. Métodos utilizados para la detección de BP en muestras de suelo. ....	39
Cuadro 5. Descripción de los tratamientos utilizados para la evaluación del control de arvense. ....	57
Cuadro 6. Clasificación cualitativa del contenido de los principales metabolitos identificados a través del tamizaje fitoquímico de los herbicidas botánicos. ....	61
Cuadro 7. Porcentaje de cobertura vegetal en función del herbicida: Etapa 1 .....	63
Cuadro 8. Porcentaje de cobertura vegetal en función del herbicida: Etapa 2 .....	65

## **Índice de figuras**

Figura 1. Porcentaje de germinación, longitud de radícula y longitud de talluelo en función de los herbicidas aplicados .....	62
Figura 2. Porcentaje de germinación, altura de la planta y número de hojas en maíz en función del tipo de herbicida aplicado.....	68

## **Abreviaturas y acrónimos**

A: Arcilloso

AO: Agricultura Orgánica

APCI / MS: Espectrometría de Masas de Ionización Química a Presión Atmosférica

AZA: Azadirectina

BP: Bioplaguicida

BT: *Bacillus thuringiensis*

CAC: Comisión del Codex Alimentarius

CE: Cevadina

CI: Cinerina

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios

DAD: Detector de Matriz de Diodos

DDT: Dicloro Difenil Tricloroetano

DE: Deguelin

DO: Densidad Óptica

DOF: Diario Oficial de la Federación

ELISA: Ensayo por Inmuno Absorción Ligado a Enzimas

EPA: Agencia de Protección Ambiental

ESI: Ionización por Electro spray

FA: Franco Arcilloso

FAA: Franco Arcilloso Arenoso

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura

FL: Franco limoso

FR: Franco

H: Coeficiente de Histéresis

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HB: Herbicidas Botánicos

HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

JS: Jasmolina

Kd: Constante de Equilibrio de la Reacción de Inmovilización

Kdes: Intersección de la Ecuación de Freunlich

LIL: Limo Limoso

LLE: Extracción Líquido – Líquido

LOQ: límite de Cuantificación

MB: *Metopium brownei*

MOS: Materia Orgánica

MS/MS: Espectrometría de Masas

MIP: Manejo Integrado de Plagas

NI: Nicotina

OMS: Organización Mundial de la Salud

pH: Operador logarítmico de la Concentración del Ion Hidronio [H<sup>+</sup>]

PIP: Protectores Incorporados de Plantas

PR: Piretrina

QS: Cuadrupolo Simple

QT: Cuadrupolo Triple

QuEChERS: Rápido, Fácil, Económico, Eficaz, Sólido y Seguro

RT: Rotenona

SA: Suelo Autoclaveado

SAGARPA: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural

SB: Sabadina

SD: Sedimento

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SLE: Extracción Sólido - Líquido

SM: Suelo Modificado

SNA: Suelo No Autoclaveado

SP: Spinosad

UHPLC: Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UV: Ultravioleta

VD: *Viguiera dentata*

VE: Vedadina

VF: Volumen de Flujo

VI: Volumen de Inyección

## 1. Introducción

Un plaguicida de síntesis química es un compuesto que ha sido diseñado para el control de plagas, en la agricultura convencional es una herramienta que contribuye a obtener un rendimiento óptimo de la cosecha. Los plaguicidas se comercializan en forma líquida, gas o en estado sólido, por lo que su aplicación puede realizarse con avioneta, bombas de aspersión y en el agua de riego. Una vez aplicado, parte del plaguicida está expuesto a procesos naturales de transformación como volatilización, escurrimiento y/o filtración que le permitirían alcanzar cuerpos de agua superficiales y subterráneas (van der Werf, 1996). Según Mahmood *et al.* (2015) al ser altamente solubles, pueden viajar a través del agua subterránea, arroyos, ríos y lagos, llegando a causar daños a especies no objetivas; dicha situación, según Naeem *et al.* (2018) plantea serias amenazas para la producción agrícola sostenible a nivel global. Otro problema sobre el uso excesivo de los plaguicidas, según exponen Hussain *et al.* (2009), es que debido a sus características xenobióticas se pudiera impedir la proliferación de algunas microorganismos benéficos del suelo, como son los fijadores de nitrógeno, y los solubilizadores de fósforo.

Una alternativa para la disminución del uso de plaguicidas, y por lo tanto mermar sus efectos negativos sobre el ambiente, es el uso de extractos botánicos preparados a partir de plantas con propiedades alelopáticas. La alelopatía es un proceso biológico por el cual un organismo produce compuestos químicos que no son necesarios para su metabolismo pero que pueden influir en la germinación, crecimiento, supervivencia y reproducción de otros organismos presentes en la misma comunidad (Yunes, 2019). Las sustancias alelopáticas tienen propiedades que pudiera funcionar como reguladoras del crecimiento, herbicida, insecticida, y compuestos antimicrobianos útiles en la protección de los cultivos (Cheng y Cheng, 2015).

Existen varios informes sobre el efecto de las propiedades alelopáticas de los extractos botánicos para el control de la maleza, se han realizado tanto ensayos *in vitro* como pruebas de campo en que se ha comprobado su efectividad (Blanco, 2006). Por ejemplo, Golubnova e Ilieva (2014) evaluaron *in vitro* el efecto alelopático de la biomasa aérea seca de tres especies identificadas como maleza (*Sorghum halepense*, *Convolvulus arvensis* y *Cirsium arvense*) sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de chícharo (*Pisum sativum*), los

resultados mostraron que los extractos de maleza disminuyeron el porcentaje de germinación, el brote y la longitud de la raíz de la semilla. Por otro lado, Mekky *et al.* (2019), en experimentos realizados en campo, encontraron que los extractos de albahaca (*Ocimum basilicum*) preparados con agua destilada fueron efectivos contra la maleza de hoja ancha y de gramíneas, con un control en el rango de 97.0 - 99.0% de la maleza, equivalente al efecto obtenido al aplicar el herbicida glufosinato de amonio. En este mismo sentido, Razzaq *et al.* (2012) consiguieron reducir en 70.0% de la dosis convencional de los herbicidas químicos mesosulfuron y diosulfuron al incluir extractos alelopáticos acuosos de sorgo y girasol, con control de 90% de la maleza en un cultivo de trigo.

Con fundamento en lo anterior se puede decir que es de suma importancia estudiar a las plantas que posean propiedades alelopáticas para su uso como plaguicidas en este caso herbicidas de origen natural, con la intención de aportar conocimiento que permita integrar herramientas para el desarrollo de la agricultura sostenible. Además, al ser preparados a partir de extractos botánicos, los herbicidas son más económicos y menos dañinos para el medio ambiente. El objetivo general de la tesis fue dar continuidad a la evaluación a través de bioensayos *in vitro* y pruebas de campo, de los efectos fitotóxicos de chechén (*Metopium brownei*) y tajonal (*Viguiera dentatata*) dos especies con propiedades alelopáticas comprobadas.

## 2. Antecedentes

Los plaguicidas son sustancias que se utilizan para proteger a los seres humanos contra los insectos vectores de patógenos que causan enfermedades, para protección de los cultivos de malezas y del ganado de enfermedades y depredaciones por hongos, insectos, ácaros y roedores (Freedman, 1995).

Los plaguicidas se han asociado con problemas de salud y ambientales que en algunos casos ha provocado la prohibición de su uso. La exposición a plaguicidas puede ser por contacto con la piel, ingestión o inhalación. Los numerosos efectos negativos para la salud que se han asociado con los plaguicidas incluyen: efectos dermatológicos, gastrointestinales, neurológicos, carcinógenos, respiratorios, reproductivos y endocrinos (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016).

Con la llegada de la industrialización se descubrieron y desarrollaron compuestos químicos que fueron elaborados de manera sintética, por ejemplo: el dicloro difenil tricloroetano (DDT) que es un insecticida que se aplicó en el siglo XX a insectos vectores (insectos causantes de infecciones como malaria, fiebre amarilla y tífus) (Bertomeu-Sánchez, 2019). Según la IUPAC en el periodo de 1970 a 1980 se introdujeron un gran número de herbicidas entre los que destacan: glifosato, atrazina y 2-4-D. Con el paso del tiempo y con el apoyo del conocimiento tecnológico y científico, el uso de dichos plaguicidas se asoció con efectos negativos sobre la salud y el ambiente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1990) indicó que entre los problemas generados por el uso inadecuado de los plaguicidas se encuentran la intoxicación masiva por consumo de alimentos contaminados, accidentes químicos en la industria y la exposición directa. Además, de acuerdo con Gavrilesco (2005) durante sus procesos de degradación los plaguicidas pueden generar compuestos secundarios tóxicos que se movilizan en las diferentes matrices ambientales. Existen casos en que se ha observado que algunos plaguicidas son persistentes, permaneciendo en el suelo y los sedimentos facilitándose su ingreso a la cadena trófica y/o su filtración hasta los cuerpos de agua subterráneos.

En una recapitulación de trabajos consultados por Hawkins *et al.* (2019) se menciona que varios plaguicidas sintéticos pueden generar resistencia en patógenos, maleza e insectos, lo que disminuye su efectividad y provoca un incremento en la frecuencias y las dosis aplicadas.

En México, en el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2014) no se maneja un único concepto para identificar a lo que es un bioplaguicida; sino que, se presenta una serie de definiciones de varias sustancias que englobarían a los distintos tipos de bioplaguicidas existentes: (I) Plaguicida bioquímico, producto elaborado a partir de sustancias que existen de forma natural o que son sintéticos derivados de las primeras y que tienen un modo de acción no toxico que contribuye en el control de plagas; (II) Plaguicida botánico, producto elaborado de sustancias extraídas de plantas, o de metabolitos derivados de sus extractos y que es usado para fines de control de una o más plagas; (III) Plaguicida microbiano, producto hecho con microorganismos (bacterias, virus, hongos, levaduras, nematodos o protozoarios) usado con fines de control de plagas.

Es un hecho demostrado que algunos bioplaguicidas causan efectos menos dañinos al medio ambiente que sus alternativas de síntesis química; principalmente, porque su tasa de degradación es más rápida. Bioplaguicidas como spinosad, rotenona y azadiractina pueden tener vidas medias ( $DT_{50}$ ) en condiciones de campo que oscilan de 1 – 20 d (Cavoski *et al.*, 2007; Cleveland *et al.*, 2002; Stark y Walter, 1995).

No obstante la necesidad y el auge por el desarrollo y uso de los bioplaguicidas, es escasa a nivel comercial, debido a que son pocos productos los que tienen éxito en las pruebas de registro en sus respectivos países y por lo tanto la cantidad de estos que alcanza un desarrollo comercial es mínimo (Roman, 2016; Ash, 2010; Isman, 2006; Kremer, 2005). Al respecto, Bailey y Falk (2011) mencionan que de todos los potenciales nuevos bioherbicidas que se tiene conocimiento a través de publicaciones científicas únicamente se comercializa el 8.1%. Isman (2006) señala que los cinco bioplaguicidas con mayor éxito comercial son los desarrollados a partir de extractos de plantas como son los bioplaguicidas de piretro, rotenona, azadiractina, aceites esenciales y de *Bacillus thuringiensis*, y de uso limitado se encuentran aquellos en que se emplea ryania, nicotina y sabadilla.

En el aspecto de posicionamiento en ventas, Marrone (2014) indicó que los bioplaguicidas representan el 5.3% de los ingresos globales del mercado de plaguicidas, y se espera que la comercialización de bioplaguicidas para 2023 alcance los 6.4 millones de dólares.

La demanda y producción general de bioplaguicidas se ha incrementado a nivel mundial. Actualmente en nuestro país la iniciativa privada y el gobierno suman esfuerzos para establecer nuevos bioproductos. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) en reunión con 150 representantes de productoras de bioinsumos (bioplaguicidas y biofertilizantes) en el Encuentro Nacional de Productores de Bioinsumos, Agroecología y Agricultura Campesina realizado en diciembre de 2019 presentó su intención de establecer comunicaciones asertivas entre instituciones de ciencia e investigación y productores de bioinsumos para que el proceso de investigación y la obtención del producto final vayan de la mano.

En este sentido en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Chiná se ha realizado una investigación sobre extractos botánicos de *Metopium brownei* (chechén) y *Viguiera dentata* (tajonal). Los estudios realizados por el equipo de trabajo han demostrado que estos dos extractos acuosos obtenidos de las hojas de chechén y tajonal tienen diversidad de metabolitos secundarios de naturaleza aleloquímica y que son potenciales herbicidas botánicos, este efecto ya ha sido evaluado en condiciones *in vitro* en plantas de rábano (*Raphanus sativus*) y lechuga (*Lactuca sativa*). De la misma forma recientemente se han elaborado ensayos en campo para probar el uso potencial de los extractos a base de chechén y tajonal.

El conocimiento de la alelopatía no es nuevo, los primeros escritos datan de hace más de dos mil años; en la antigua Grecia se citan ejemplos sobre el uso de la alelopatía en cultivos de donde se pueden identificar frases como: "plantas que roban nutrientes al suelo", "plantas que enferman el suelo" o "plantas que suprimen a otras plantas" (Willis, 2007). Bertomeu-Sánchez (2019) indica que, con anterioridad al uso comercial masivo de los plaguicidas de síntesis química, los compuestos que se utilizaban para el control de plagas incluían mezclas de algunos minerales con extractos de plantas como el tabaco, la flor de crisantemo o la raíz de derris (*Derris elíptica*). Por consiguiente la presente investigación tiene la intención de

contribuir a la generación de conocimiento sobre el uso de la flora local para generar herramientas para el manejo de arvenses en la Agricultura Orgánica (AO), Manejo Integrado de plagas (MIP) y agricultura convencional viables que permitan reducir el uso de herbicidas de síntesis química y con ellos disminuir el efecto negativo que estos causan al medio ambiente y salud humana.

### 3. Justificación

Las plantas con potencial alelopático a través de los metabolitos secundarios pueden ofrecer nuevos modelos de herbicidas naturales, específicos y menos dañinos que los herbicidas de síntesis sintética (Macías, 1994). Se ha documentado el potencial alelopático de material vegetal como hojas, polvos de semillas y extractos acuosos de plantas en la supresión de algunas malezas, obteniendo una alta inhibición de maleza cuando se aumentó las dosis de material vegetal en los respectivos experimentos, *in vitro* (El-Rokiek *et al.*, 2019; El-Rokiek *et al.*, 2015; Ayeni y Kayode, 2014). Sin embargo, los casos de experimentos de plantas con potencial alelopático en cultivo en condiciones campo que consideren las condiciones climáticas que obstaculizan la eficacia de la alelopatía. Cordeau *et al.* (2016) mencionaron que hasta el año 2016, a nivel mundial, se reportaban 13 bioherbicidas disponibles en el mercado, indicando el menor éxito comercial de los bioplaguicidas y el menor número de investigaciones en el tema.

Se ha reportado el uso de plantas de familias de la especie de *V. dentata* (Asteráceae) con efectos inhibitorios en arvense (Majeed y Muhammad, 2018; Benvenuti *et al.*, 2017). El árbol de *M. brownei* tiene un uso potencial como bioinsecticida y bioherbicida (Anaya *et al.*, 1999). Por lo anterior, resulta de interés evaluar en condiciones de campo sin cultivo y con un cultivo el efecto fitotóxico de extractos acuosos de *M. Brownei* y *V. dentata*, dos especies con características alelopáticas, ampliamente distribuidas en la Península de Yucatán.

#### 4. Hipótesis

- Los metabolitos secundarios de los extractos a base de *Metopium brownei*, y de *Viguiera dentata* modifican su concentración en condiciones controladas a las 72 horas después de su elaboración.
- El crecimiento de las arvenses en condiciones de campo es modificado por los herbicidas botánicos a base de *Metopium brownei*, y de *Viguiera dentata*.
- Los herbicidas botánicos a base de *Metopium brownei*, y de *Viguiera dentata* en comparación con el herbicida de origen sintético (atrazina) surte mejor efecto inhibitor en condiciones de campo sobre la arvenses.
- En condiciones controladas el crecimiento de un cultivo de maíz (*Zea mays*) es afectado en su rendimiento por los herbicidas botánicos a base de *Metopium brownei*, y de *Viguiera dentata*
- Los herbicidas botánicos a base de *Metopium brownei*, y de *Viguiera dentata* alteran el rendimiento de un cultivo de maíz (*Zea mays*) en condiciones de campo.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo general del capítulo 1**

- Recolectar información sobre el comportamiento de los bioplaguicidas en el suelo, con énfasis en su adsorción, degradación, efectos en los microorganismos, y en los métodos analíticos utilizados para su extracción, y su cuantificación suelo.

### **5.2. Objetivos específicos del capítulo 1**

- Identificar la vida media, adsorción y efectos en los microorganismos de los bioplaguicidas cuando son aplicados en condiciones controladas y en campo.
- Identificar los métodos analíticos para extraer y cuantificar los bioplaguicidas en el suelo.

### **5.3. Objetivo general del capítulo 2**

- Determinar los efectos fitotóxicos de dos herbicidas botánicos preparados a partir de extractos acuosos de *Metopium brownei*, y de *Viguiera dentata* en bioensayos de laboratorios y pruebas de campo, y comparar su funcionamiento con un herbicida de origen sintético atrazina.

### **5.4. Objetivos específicos del capítulo 2**

- Comparar en condiciones controladas la diferencia en las concentraciones de los metabolitos secundarios a las 72 h de almacenamiento de dos herbicidas botánicos elaborados a partir de extractos de *Metopium Brownei*, y *Viguiera dentata*
- Determinar el efecto inhibitorio de dos herbicidas botánicos de *Metopium brownei*, y *Viguiera dentata* sobre arvenses en condiciones de campo.
- Evaluar el efecto de dos herbicidas botánicos *Metopium brownei*, y *Viguiera dentata* sobre el crecimiento de maíz (*Zea mays*) en bioensayos *in vitro*.
- Calcular el rendimiento de dos herbicidas botánicos de *Metopium brownei*, y *Viguiera dentata* sobre un cultivo de maíz (*Zea mays*) en condiciones de campo.

## 6. Literatura citada

- Anaya A.L., Mata R., Rivero-Cruz F., Hernández-Bautista B.E., Chávez-Velasco D., Gómez-Pompa A. (1999) Allelochemical Potential of *Metopium brownei*. Journal of Chemical Ecology 25:141-156.
- Ayeni M., Kayode J. (2014) Laboratory Studies on the Effects of Aqueous Extracts from *Sorghum bicolor* Stem and *Zea mays* (Roots and Tassel) on the Germination and Seedling Growth of Okra (*Abelmoschus esculentus*L.). Advances in Agriculture 2014:1-6.
- Bailey K.L., Falk S. (2011) Turning Research on Microbial Bioherbicides into Commercial Products - A *Phoma* Story. Pest Technology 5:73-79.
- Benvenuti S., Cioni P.L., Flamini G., Pardossi A. (2017) Weeds for weed control: Asteraceae essential oils as natural herbicides. Weed Research 57:342-353.
- Bertomeu-Sánchez J.R. (2019) Introduction. Pesticides: Past and Present . Journal of History of Science and Technology 13:1-27.
- Cavoski I., Caboni P., Sarais G., Cabras P., Miano T. (2007) Photodegradation of rotenone in soils under environmental conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:7069-74.
- Cleveland C.B., Bormett G.A., Saunders D.G., Powers F.L., McGibbon A.S., Reeves G.L., Rutherford L., Balcer J.L. (2002) Environmental fate of spinosad. 1. Dissipation and degradation in aqueous systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:3244-56.
- Cordeau S., Triolet M., Wayman S., Steinberg C., Guillemin J.-P. (2016) Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. Crop Protection 87:44-49.
- Cheng F., Cheng Z. (2015) Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. Frontiers in Plant Science 6:1020-1020.
- Decreto por el que se reforman, adicionan y derrogan diversas disposiciones del Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y

- Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Peligrosos. Diario Oficial de la Federación. 13 de febrero de 2014.
- El-Rokiek K., El-Din S.A.S., Messiha N., Sharara F. (2015) Effect of Guava Leaf Residue on Broad and Narrow Leaved Weeds Associated Wheat Plants. *International Journal of Agricultural Research* 9:356-363.
- El-Rokiek K.G., El-Din S.A.S., El-Wakeel M.A., El-Awadi M.E.-S., Dawood M.G. (2019) Allelopathic potential of the pea seed powder as natural herbicide for controlling weeds infested wheat plants. *Bulletin of the National Research Centre* 43:193.
- Freedman B. (1995) *Pesticides, Environmental Ecology (Second Edition)*, San Diego Academic Press; pp. 213-277.
- Gavrilescu M. (2005) Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5:497-526.
- Golubina I., Ilieva A. (2014) Allelopathic effects of water extracts of *Sorghum halepense* (L.) Pers., *Convolvulus arvensis* L. and *Cirsium arvense* Scop. on early seedling growth of some leguminous crops. *Pesticidi i fitomedicina* 29:35-43.
- Hawkins N.J., Bass C., Dixon A., Neve P. (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews* 94:135-155.
- Hussain S., Siddique T., Saleem M., Arshad M., Khalid A. (2009) Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions, *Advances in Agronomy*, Academic Press. pp. 159-200.
- Isman M. (2006) Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World. *Annual review of entomology* 51:45-66.
- Isman M.B., Machial C.M. (2006) Chapter 2. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization, en: M. Rai and M. C. Carpinella (Eds.), *Advances in Phytomedicine*, Elsevier. pp. 29-44.
- Kremer R. (2005) The Role of Bioherbicides in Weed Management. *Biopesticides International* 1:127-141.
- Macias F.A. (1994) *Allelopathy in the Search for Natural Herbicide Models, Allelopathy*, New York. American Chemical Society; pp 310-329.

- Mahmood I., Imadi S., Shazadi K., Gul A., Hakeem K. (2015) Effects of Pesticides on Environment, Plant, Soil and Microbes: Vol. 1 Implications in Crop Science, Springer Internationa. pp. 254-266.
- Majeed A., Muhammad Z. (2018) Allelopathic Effects of two Asteraceae Weeds (*Artemisia annua* and *Taraxicum officinalis*) on Germination of Maize and Wheat. PSM Biological Research 3:44-47.
- Marrone P.G. (2014) The Market and Potential for Biopesticides, Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities, New York. American Chemical Society; pp 245-258.
- Mekky M.S., Hassanien A.M.A., Kamel E.M., Ismail A.E.A. (2019) Allelopathic effect of *Ocimum basilicum* L. extracts on weeds and some crops and its possible use as new crude bio-herbicide. Annals of Agricultural Sciences 64:211-221.
- Naeem M., Cheema Z.A., Ihsan M.Z., Hussain Y., Mazari A., Abbas H.T. (2018) Allelopathic Effects of Different Plant Water Extracts on Yield and Weeds of Wheat. Planta Daninha 36: 1-6
- Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L. (2016) Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. Frontiers in public health 4:148-148.
- OMS. (Organización Mundial de la Salud y Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). (1990). (Public health impact of pesticides used in agricultura). Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39772>.
- Razzaq A., Cheema Z.A., Jabran K., Hussain M., Farooq M., Zafar M. (2012) Reduced herbicide doses used together with allelopathic sorghum and sunflower water extracts for weed control in wheat. Journal of Plant Protection Research 52:281-285.
- Roman P. (2016) History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. Plant Protection Science 52:229-241.
- SADER. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) .(2019). (Colaboración intersecretarial para impulsar la producción, comercialización y uso de bioinsumos). Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/colaboracion->

intersecretarial-para-impulsar-la-produccion-comercializacion-y-uso-de-bioinsumos-229772.

Stark J.D., Walter J.F. (1995) Persistence of Azadirachtin A and B in soil: Effects of temperature and microbial activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 30:685-698.

van der Werf H.M.G. (1996) Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 60:81-96.

Willis R.J. (2007). *The History of Allelopathy*. New York. Springer-Verlag:13-16.

Yunes J.S. (2019). Chapter 22 - Cyanobacterial Toxins, in: A. K. Mishra, D. N. Tiwari, A. N. Rai, eds. *Cyanobacteria*. Academic Press; pp 443-458.

## 7. Capítulo 1: Comportamiento de los bioplaguicidas en el suelo, extracción y cuantificación

### 7.1. Resumen

Una alternativa más ecológica al uso de plaguicidas de síntesis química son los bioplaguicidas (BP) que pueden estar elaborados a partir de virus entomopatógenos, bacterias, hongos, nematodos y metabolitos secundarios. Dentro de las características más importantes de los BP destaca su tasa de degradación que es más rápida que la de los plaguicidas sintéticos; además, diversos informes mencionan que los BP, al ser compuestos de origen natural, no pueden causar efectos negativos en la salud, ni daño al ambiente. Aunque también, se ha encontrado que, en presencia de arcillas y materia orgánica, algunas piretrinas y nicotinas son fuertemente retenidas en el suelo, y que *B. thuringiensis*, spinosad, rotenona tiene vidas medias en intervalos de 1 – 40 d en condiciones ambientales. Por otro lado, la rotenona, un compuesto natural obtenido de las plantas del género derris puede causar daños en el sistema nervioso y *Bacillus thuringiensis* que es aplicado como bioinsecticida genera resistencia en algunos insectos, azadiractina y spinosad pueden tener efectos adversos en los microorganismos del suelo al aplicarlo en dosis superiores a las recomendadas. Considerando lo anterior es necesario identificar métodos analíticos que permitan estudiar la presencia, factores que determinan su adsorción y el tiempo de degradación de los BP en el suelo.

**Palabras Clave:** Plaguicidas, sorción, degradación, cromatografía, microorganismos.

## 7.2. Introducción

Una de las tendencias actuales en los Estados Unidos, India, Canadá, y la Unión Europea es la reducción del uso de plaguicidas de origen sintético. Según Chandler *et al.* (2011) esta tendencia se debe a tres razones: I) causan deterioro en la salud humana y problemas ambientales; II) nuevas legislaciones emergentes que busca disminuir el uso de plaguicidas; III) resistencia que han adquirido algunas plagas por el abuso en el uso de dichos productos.

Los bioplaguicidas (BP) son definidos como agentes para el control de plagas que se obtienen partir de un microorganismo vivo o un producto natural, y que son producidos y vendidos de forma masiva (Chandler *et al.*, 2011). Más recientemente Seiber *et al.* (2014) definieron a los BP como productos quimicos naturales, con baja toxicidad y con baja persistencia en el ambiente.

Dentro del material utilizado para la fabricación de BP, los metabolitos secundarios han ido aumentando en importancia, debido a que representan una alternativas a los plaguicidas de origen sintéticos al considerárseles con menor riesgo de afectación a los agroecosistemas, son desarrollados para atacar a objetivos específicos, de bajo costo y se han ido adoptando como componentes de diversos programas de control de plagas (Sengottayan, 2015) como en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) y la Agricultura Orgánica (AO) y se presentan como una opción menos dañina para el medio ambiente.

La Comisión del Codex Alimentarius (CAC, 2019), que es un organismo subsidiario de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), considera que los BP son compuestos de riesgo mínimo es decir que tienen poca probabilidad de que causen efectos negativos en la salud y el medio ambiente. En contraste, algunos investigadores como Spyrou *et al.* (2009) y Rousidou *et al.*, (2011) indicaron que esta idea no es producto de investigaciones especializadas y se basa únicamente en un sustento teórico debido a su origen natural. Siendo este también uno de los motivos por lo cual la mayoría de los estudios sobre plaguicidas se centran en aquellos de origen sintéticos y se han dejado de lado los posibles consecuencias negativas del uso de BP.

Algunos BP como la rotenona produce degeneración en las neuronas dopaminérgicas y alteraciones psicomotoras como la de la enfermedad de Parkinson; por otro lado *Bacillus thuringiensis* ha mostrado en algunos casos tener efectos adversos con el desarrollo de resistencia del gusano elotero (*Helicoverpa zea*) estudiada por Tabashnik *et al.* (2008) en plantas modificadas genéticamente.

El suelo es el compartimento ambiental que está directamente expuesto a las aplicaciones de BP. El destino ambiental de los BP en esta matriz se verá afectadas por las condiciones de luz, temperatura, profundidad, pH, y microorganismos presentes (Cavoski *et al.*, 2008; Cavoski *et al.*, 2007) siendo la adsorción el principal proceso de retención de los BP en el suelo, lo cual influye sobre los efectos biológicos que pudieran causar, las transformaciones, y el movimiento permitiendo el contacto con aguas subterráneas y superficiales, atmosfera o plantas en crecimiento. Es por eso que tanto su vigilancia como la detección de los BP presentes en el suelo son de suma importancia (Plaza-Bolanos *et al.*, 2012).

El identificar, extraer y cuantificar a los BP con éxito dentro de matrices complejas, como el suelo, representa realmente un gran desafío analítico (Rodrigues *et al.*, 2016). Debido a que contienen diversidad de componentes que pueden interactuar con el analito de interés. Entre los procedimientos analíticos que se han utilizado para la extracción con éxito de los BP presentes en el suelo se pueden mencionar el método conocido popularmente como QuEChERS, del inglés (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). En el caso de la cuantificación, se ha reportado a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) como la más eficiente, mientras que a la detección la usada de forma común es la Espectroscopia de Masas (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) (Prestes *et al.*, 2012).

El objetivo del presente capítulo fue recabar información sobre el comportamiento de los BP en el suelo, con énfasis en su adsorción, degradación, efectos en los microorganismos, y en los métodos analíticos utilizados para su extracción, y su cuantificación suelo.

### **7.3. Definición de bioplaguicidas y su situación actual a nivel internacional**

La Agencia Ambiental para la Protección Ambiental de los Estados Unidos, (Environmental Protection Agency, EPA) indica que los BP son compuestos químicos generados de forma natural, que son biodegradables, y que producen sustancias secundarias contaminantes; estos productos pueden ser obtenidos de animales, plantas, bacterias y ciertos minerales (fosfato dipotásico y fosfato de hierro). La clasificación de los diferentes tipos de BP propuesta por la EPA está basada su origen y los divide en tres categorías principales: (I) BP microbianos que como ingrediente activo pueden contener uno o varios microorganismos (hongo, virus, protozoo o alga); (II) protectores incorporados a las plantas (PIP), que son sustancias sintetizadas por estas pero que se producen a partir de material genético agregado; (III) plaguicidas bioquímicos, sustancias naturales que incluyen los extractos de plantas, ácidos grasos o feromonas que controlan a las plagas mediante mecanismos no tóxicos.

En el Cuadro 1 se enlistan algunos de los bioplaguicidas comercialmente más conocidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de las características de algunos bioplaguicidas comerciales.

Bioplaguicida	Analito de interés	Tipo de BP <sup>¶</sup>	Organismo objetivo	Modo de acción	Referencia
Spinosad	Spinosad A y D	PM	Insectos y parásitos	Interrupción de los receptores de acetilcolina nicotínicos.	Zhao <i>et al.</i> (2007)
<i>B. thuringiensis</i>	Cry1Ab	PM	Insectos, nematodos, ácaros y garrapatas	Los insectos ingieren los cristales proteicos, el pH alcalino de su tracto digestivo activa la toxina Cry, la cual se inserta en el epitelio del intestino del insecto, provocando la ruptura del epitelio.	Salehi Jouzani <i>et al.</i> (2017)
Azadirectina	Azadirectina A y B	PBQ	Insectos y ácaros	Actividad antifederante, efecto regulador sobre el crecimiento y puede causar de esterilidad en insectos.	Chaudhary <i>et al.</i> (2017)
Tabaco	Nicotina	PBQ	Pulgones, moscas blancas y trips.	Toxicidad de contacto e ingestión	Cabrera Verdezoto <i>et al.</i> (2016)
Piretrinas	Piretrina I y II, cinerina I y II, jasmolina I y II	PBQ	Insectos	Acción neurotóxica en los insectos al bloquear los canales de sodio en los axones nerviosos.	Urkude <i>et al.</i> (2019)
Rotenona	Rotenoides	PBQ	Insectos	Inhibe la enzima encargada de las funciones respiratorias de los insectos.	Othman <i>et al.</i> (2016)
Quillaja	Saponinas	PBQ	Nemátodos	Desconocido.	Spyrou <i>et al.</i> (2009)

<sup>¶</sup>PM: Plaguicida microbiano; PBQ; Plaguicida bioquímico.

Dentro de los organismos que determinan y controlan el tipo de sustancias permitidas, incluyendo los BP, en las actividades agropecuarias clasificadas como orgánicas, a nivel internacional está el Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI), en Estados Unidos, la EPA en coordinación con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA) han desarrollado el Programa Nacional Orgánico (NOP, National Organic Program) y a través de este regulan y definen aquellas sustancias permitidas y prohibidas en la agricultura orgánica, entre ellos los BP.

Según la EPA el desarrollo de los BP es un movimiento en expansión; por ejemplo, entre 1962 y 2018 se registró para Estados Unidos 404 compuestos identificados como BP basados en el ingrediente activo utilizado para su fabricación; de entre estos, los BP de origen bioquímico y microbiano fueron 366 BP (no hacen distinción entre los registros de BP bioquímicos y microbianos), mientras que aquellos desarrollados a partir de PIP fueron 38 de los cuales cinco cuentan con registro cancelado sin indicarse la razón.

De acuerdo con la información recabada por Cordeau *et al.* (2016) a nivel mundial los bioherbicidas son los BP que se producen en menor número de productos y volumen contando con únicamente 10% de la producción total de BP. En contraste, el volumen de producción de biofungicidas y bioinsecticidas se ha ido en incrementando, siendo Estados Unidos el mayor productor de estos últimos compuestos (Isman, 2006). Las empresas más relevantes relacionadas con la comercialización de BP son Syngenta y Bayer que han enriquecido su catálogo de productos al ir adquiriendo empresas y productos ya reconocidos y aptos para la comercialización (Marrone, 2014).

En México la dependencia oficial encargada de autorizar el registro y expedir el certificado de libre venta de BP es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). El costo del registro para la comercialización de productos identificados como BP está en función de la toxicidad del producto y pueden variar desde \$ 20, 000 hasta \$ 80, 000 MXN. Antes de la solicitud del registro de los BP se debe indicar las características del producto, incluyendo su composición, propiedades físicas y químicas, estabilidad y toxicidad, y el establecimiento de diversos ensayos que deben establecerse de acuerdo a los lineamientos que emite la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

(SEMARNAT), así como la opinión técnica de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA) sobre su efectividad biológica y los límites residuales máximos.

#### **7.4. Sorción de bioplaguicidas en el suelo**

Cuando se aplican los bioplaguicidas (BP) en campo, uno de los procesos que pueden ocurrir es la adsorción, el cual es importante ya que define las cantidades del BP que queda retenida en el suelo y las cantidades que queda disponible para ser liberada al ambiente (Romero-González *et al.*, 2015).

La adsorción es definida como un proceso a través del cual la acumulación neta de una sustancia ocurre en la frontera de dos fases continuas. Este fenómeno se distingue de la absorción que es la formación de una estructura tridimensional. Cuando los dos fenómenos ocurren simultáneamente y cuando se desconoce el mecanismo predominante se le llama sorción (Sposito, 1989).

El fenómeno de la adsorción se mide a través de isoterma de adsorción que es definida como la relación entre la concentración de contaminante en el estado sorbido y la concentración en la fase acuosa, al equilibrio. La forma para describir la adsorción es a través de isoterma, siendo la más común la isoterma lineal que representa que para todas las concentraciones del contaminante, siempre habrá proporcionalmente la misma concentración sorbida (Brusseau y Chorover, 2019)

En experimentos realizados por Khairy *et al.*, 1990, Saxena *et al.*, 1999, Antonious *et al.*, 2004 y Hedia y El-Aswad, 2018, se obtuvieron isoterma de adsorción que se ajustaron a isoterma lineales para BP fabricados a partir de nicotina, *Bacillus thuringiensis*, y piretrinas, encontrando que el adsorbente fue heterogéneo, es decir que existen múltiples sitios disponibles para la adsorción, demostrando que el proceso de adsorción podía llevarse a cabo en varios sitios del sustrato (Lazo *et al.*, 2008).

La materia orgánica del suelo (MOS) es uno de los componentes del suelo que más influye sobre la sorción. La MOS es una mezcla compleja de residuos de plantas, que pueden ser tanto frescos como en diferentes etapas de transformación, incluye tejido microbiano vivo, y sustancias húmicas (Gasparoni *et al.*, 2001); se puede decir que, en una proporción importante está constituida por proteínas y ligninas, y en menor medida por celulosa y compuestos solubles como el alcohol, sustancias que le confiere la propiedad de permitir la

sorción de compuestos no polares con mayor facilidad, por ejemplo de spinosad un BP agente para el control de insectos elaborado con bacterianas de *Saccharopolyspora spinosa* (Antonious *et al.*, 2004).

Hedia y El-Aswad (2018) estudiaron la adsorción de spinosad en tres condiciones: I) matriz de suelo; II) ácido húmico; y III) arcillas. La afinidad del spinosad fue mayor por la fracción arcillo que por los ácidos húmicos y en menor medida por el suelo. Los resultados obtenidos por Hedia y El-Aswad (2018) fueron similares a los encontrados por Liu *et al.* (2013), en un experimento anterior, quienes evaluaron la adsorción de spinosad en tres diferentes tipos de suelo. Estos últimos autores mencionan que existió mayor afinidad de spinosad por los suelos con mayor contenido de arcilla y MOS, atribuyéndose este efecto a la fuerte atracción intermolecular por parte de las capas de minerales del material arcilloso y a los grupos funcionales expuestos de los ácidos húmicos; por lo tanto, la movilidad de spinosad disminuye en presencia de arcillas y en menor medida por efecto de la MOS.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram-positiva que habita en el suelo, y que se le ha dado un uso como una alternativa biológica a algunos insecticidas, su modo de acción es a través de la liberación de la proteína Cry que es tóxica para algunos insectos. El comportamiento de la toxina en el suelo está en estudio aún y no existe un consenso definido sobre su comportamiento; en Stotzky, 2002 y 2007, se menciona que al entrar en contacto con el suelo, arcillas, o ácidos húmicos es rápidamente atraída y retenida por estos materiales. Sin embargo, Fu *et al.* (2007) al realizar experimentos con concentraciones de 5.0, 10.0 y 20.0 mM informan que la adsorción de la toxina Cry por el suelo puede ser menor al aumentar la presencia de ligandos orgánicos, debido a la competencia entre los ligandos de ácido orgánico y la toxina por los sitios de adsorción.

Romero-González *et al.* (2015) realizaron pruebas de retención y adsorción con piretrinas, compuestos naturales que tienen propiedad de insecticida que se encuentran en las flores de algunas especies como *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Los experimentos consistieron en evaluaciones de suelo seco con y sin adición de composta, sus resultados mostraron que el suelo al que se le agregó composta tuvo mayor retención de piretrina que el suelo sin

composta, los investigadores explicaron que este comportamiento es debido principalmente a un mayor contenido de MOS en los suelos a los que se les adicionó composta.

En ensayos de adsorción sobre la superficie de ácidos húmicos, y complejos de ácido húmico - arcilla, realizados por Khairy *et al.* (1990), utilizando extractos de nicotina, un alcaloide con uso insecticida que se extrae de plantas de género *Nicotina*, principalmente de tabaco, se encontró que la adsorción de nicotina en la superficie húmica se produjo a través de la formación de enlaces físicos y químicos de alta energía.

## **7.5. Degradación de bioplaguicidas en el suelo**

De acuerdo con el material bibliográfico consultado para este capítulo, de forma general tanto en condiciones de campo como en pruebas *in vitro* los BP presentes en el suelo se degradan en dos etapas. La primera etapa consiste en una degradación acelerada inmediatamente después de su aplicación, y el segundo proceso es a partir de las primeras horas o días de la aplicación de los BP, y no transcurre de forma constante.

La degradación por la luz de algunos BP (rotenona y azadiractina) ocurre de la mano con la adsorción, ya que los BP quedan disponibles en la superficie del suelo y de sedimento lo que permite una fotólisis directa en suelo y cuerpos de agua (Cavoski *et al.*, 2007; Barrek *et al.*, 2004; Cleveland *et al.*, 2002) y de acuerdo con Cavoski *et al.* (2007) la materia orgánica (MO) es uno de los componentes que pueden modificar e influir en la concentración de los BP debido a la retención que causa en el suelo en los BP lo que provoca una degradación lenta.

En el Cuadro 2 se presenta un concentrado de estudios referentes a la degradación de algunos bioplaguicidas en el suelo.

Cuadro 2. Degradación de los bioplaguicidas en el suelo en función de las condiciones ambientales

BP <sup>¶</sup>	Analito	Condiciones ambientales	pH	Tipo de suelo <sup>§</sup>	Temperatura (°C)	DT <sub>50</sub>	Referencia
AZA	AZA - A	Oscuridad	2.0	NA	NA	9.4	Barrek <i>et al.</i> , (2004)
			4.0			98.0	
			6.0			130.7	
			8.0			52.3	
		Luz solar	2.0			28.3	
			4.0			98.8	
			6.0			44.0	
			8.0			43.0	
		Luz UV	2.0			0.2	
			4.0			0.8	
			6.0			0.9	
			8.0			0.7	
	Oscuridad	2.0	40.0, 50.0 70.0	0.8, 0.2, 0.1			
				4.0	16.0, 8.02, 1.4		
				6.0	16.0, 2.0, 0.8		
				8.0	26.7, 8.0, 1.0		
		Controladas		SM	25.4 a 46.8	42.6	
						6.3	33.4
						6.4	31.7
						6.6	28.6
	Controladas	SM	28.2 a 38.8	17.7			
				6.3	22.2		
				6.4	14.3,		
				6.6	12.1		
Controladas	SNA	15.0	43.9				
			25.0	19.8			
			SA	91.2			
			25.0	1.5			
	AZA - B		Controladas	SNA	59.2		
					25.0	20.8	
					SA	115.5	
					25.0	42.3	

¶AZA: Azadirectina;

§SM: Suelo modificado; SNA: Suelo no autoclaveado; SA: Suelo autoclaveado; NA: Sin información

BP <sup>¶</sup>	Analito	Condiciones ambientales	pH	Tipo de suelo <sup>§</sup>	Temperatura (°C)	DT <sub>50</sub>	Referencia
BT	Bt transgénico Guo-Kang 12 / Zhong-Kang 30	Oscuridad	5.72	FL	37.0	56.0	Sun <i>et al.</i> (2007)
	12 aβ hidroxirotenona	Oscuridad	NA	FA	10.0 20.0	24.0 y 9.0	Cavoski <i>et al.</i> (2008)
	12 aβ hidroxirotenona	Campo		A	10.0 20.0	25.0 y 7.0	
		Campo			20.0 25.0	7.5 y 6.0	Cavoski <i>et al.</i> (2007)
		Campo	6.5 6.8 7.1	FAA, FA FR	18.3 - 27.6 16.5 - 29.4 13.7 - 25.2	2.76, 1.98 2.69	Zhou <i>et al.</i> (2013)
SP	SP A	Luz solar / Medio acuoso		SD	25	0.8	Cleveland <i>et al.</i> (2002)
		Campo				1.8	Zhao <i>et al.</i> (2007)
		Oscuridad		FA FL	25.0	17.0 9.0	Hale y Portwood (1996)
		Luz solar / Medio acuoso				0.9	Cleveland <i>et al.</i> (2002)
		Campo				0.9	Zhao <i>et al.</i> (2007)
		Oscuridad / Preesterelizado		FL LIL	25.0	128.0 240.0	Hale y Portwood (1996)
	SP D	Oscuridad		LIL	25.0	14.0	
		Oscuridad / Preesterelizado		LIL	25.0	177.0	

<sup>¶</sup>BT: *Bacillus thuringiensis*; SP: Spinosad

<sup>§</sup>FL: Franco limoso; FA: Franco arcilloso; A: arcilloso; FAA: Franco arcilloso arenoso; FR: Franco; SD: Sedimento; LIL: Limo limoso; NA: Sin información

### 7.5.1. Efecto de la luz UV en la degradación de los BP

Cavoski *et al.* (2007) evaluaron la vida media ( $DT_{50}$ ) de la azadirectina con diferentes variables entre ellas la luz ultravioleta (UV). Los efectos de UV (340 nm, 1274 nm, 1410 nm y 1050 nm) demostraron que la azadirectina-A (principal metabolito de la azadirectina) se degradaba en menos de 1 d por efecto de la luz UV. En comparación con la exposición de la luz solar donde se obtuvieron  $DT_{50}$  en intervalos de 28.0 y 98.0 d en pH que iban de 2.0 a 8.0 de azadirectina-A (Cuadro 2). Estos resultados fueron similares a los de Johnson *et al.* (2000) quienes evaluaron la azadirectina-A al exponerla a luz UV (254 nm) se observó que la azadirectina-A fue degradada al 50% en cuestión de horas. De forma similar Zuleta-Castro *et al.* (2017) investigaron el extracto crudo de azadirectina que fue sometido a luz UV (368 nm) durante 24 h, la degradación de la azadirectina fue del 55.0% a los 214 min. Esto pone de manifiesto que la luz UV directa degrada en cuestión pocos días e incluso horas a la azadirectina. Se podría decir que la luz UV en intervalos de 250 a 350 nm puede degradador en 1 d la mitad de la concentración de azadirectina en suelo.

Menciona Katagi (2004) que la cantidad de energía para romper las moléculas de los plaguicidas sintéticos debe ser a longitudes de onda de 250–400 nm. Sin embargo, la luz solar cerca del suelo exhibe un máximo de alrededor de 440 a 460 nm, y su intensidad en la región UV responsable de la fotodegradación del plaguicida se convierte en aproximadamente 5.0 – 6.0% de la intensidad total. Es por eso que la luz UV tiene efectos más rápidos en la degradación de la azadirectina que la luz solar.

De igual forma la degradación de los BP se puede ver afectada por la profundidad del suelo ya que es un factor que pueden impedir la degradación por la luz, la profundidad del suelo afecta el paso de la luz porque no permite penetrar a gran profundidad en el suelo, así mismo esta depende de la longitud de onda y la fracción del compuesto en el suelo lo que determina que cantidad del BP se encuentra disponible para degradar (Balmer *et al.*, 2000).

No se encontraron artículos de BP en estas condiciones pero Zhang Zhang *et al.* (2010) analizaron la degradación por fotólisis del pyreno (insecticida sintético), un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) con temperatura a 30 °C, combinado con fotodegradación a 1.0, 1.6, 2.0, 2.4 y 4.0 mm de profundidad de suelo, los resultados en la  $DT_{50}$  fueron de 19.8,

23.0, 27.5 y 37.4 d respectivamente. La tasa de degradación disminuía conforme la profundidad aumentaba. Con base a esto y lo informado en la sección de adsorción se podría decir que a mayor profundidad del suelo, la vida media de ciertos BP como nicotina, *B. thuringiensis* y spinosad, se puede incrementar. Esto debido a que dichas profundidades y al estar adsorbidos por la materia orgánica y las arcillas, se protegen de la degradación por luz (Hedia y El-Aswad, 2018; Antonious *et al.*, 2004; Khairy *et al.*, 1990).

### **7.5.2. Efecto de la temperatura en la degradación de los BP**

Las variaciones de temperatura pueden también afectar la concentración de los BP. Cavoski *et al.* (2008) evaluaron la degradación de la rotenona (sustancia extraída de las plantas del género *Tephrosia* que se emplea para el control de insectos) en condiciones controladas por acción de dos temperaturas (10 y 20 °C). Se observó que los valores de DT<sub>50</sub> de rotenona y 12  $\alpha$ -hidroxirotenona (toxina y principal producto de descomposición de la rotenona) en suelo franco arcilloso fueron 8.0 y 52.0 d a 20.0 y 25.0 °C y 118.0 d a 10.0 °C. En suelo arcilloso fueron 5.0 y 23.0 d, a 20.0 y 21.0 °C, y 35.0 d a 10.0 °C. Esto quiere decir que un aumento de 10.0 °C en la temperatura más alta disminuyó en un factor de 4.2 y 3.1 la degradación de la rotenona. De la misma forma los autores atribuyen otros factores a la degradación de la rotenona como son la hidrólisis, oxidación e isomerización que permitió la formación de 12  $\alpha$ -hidroxirotenona y su isómero 12 $\alpha$ b-hidroxirotenona. Zhou *et al.* (2013) evaluaron la degradación de la rotenona en condiciones de campo a temperaturas que variaron de 18.0 – 27.0 °C, 16.0 – 29.0 °C y 13.0 – 25.0 °C en pH de 6.5, 6.8 y 7.1, los autores mencionaron que la luz solar fue el principal agente que degradó a la rotenona, la curva de disipación de la rotenona mostró una curva relativamente estable con DT<sub>50</sub> de 2.75, 1.98 y 2.69 d. Comparando los resultados de Zhou *et al.* (2013) y Cavoski *et al.* (2008) en la degradación de la rotenona podemos asumir que las condiciones ambientales son más efectivas que la temperatura por sí sola. Caso contrario a la luz UV (250 – 300 nm) que es capaz de degradar en 1.0 d o menos la concentración de la azadiractina en un 50% en el suelo.

### **7.5.3. Efecto de la concentración de materia orgánica en la degradación de los BP**

Agyarko *et al.* (2006) comprobaron que la materia orgánica del suelo (MOS) interviene en la DT<sub>50</sub> de azadiractina-A en condiciones de campo con un combinado de suelo con hojas de

nim (*Azadirachta indica*), estiércol de aves de corral y estiércol de vaca, la degradación obtuvo diferentes valores de DT<sub>50</sub>, el mejor rendimiento se obtuvo con las hojas de nim y el estiércol animal que favoreció la descomposición rápida del azadiractina-A. El efecto de la degradación en suelos ricos de MOS puede deberse a un proceso paralelo que realizan los microorganismos por el cual degradan compuestos de la MOS y secundariamente se ven afectados los BP al ir siendo consumidos por la actividad microbiana (Zimdahl, 2018).

#### **7.5.4. Efecto de la concentración del pH en la degradación de BP**

Otros factores que contribuyen a degradar los BP son los microorganismos y el pH (Zhou *et al.*, 2013). Barrek *et al.* (2004) comprobaron que la DT<sub>50</sub> de azadiractina con pH de 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 y con temperaturas de 40.0, 50.0 y 70.0 °C, las DT<sub>50</sub> fueron las siguientes; pH 2: (0.8, 0.2 y 0.1 d); pH 4: (16.0, 8.0 y 1.4 d); pH 6 (16.0, 2.0 y 0.8 d); pH 8: (26.7, 8.0 y 1.0 d). El pH 2 y 4 combinado con temperatura de 40°C tiene un mejor efecto degradador que el pH de 6 y 8 con temperaturas de 50.0 y 70.0 °C. El pH 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 tuvieron DT<sub>50</sub> de 9.4, 98.0, 130.7, 52.3 d respectivamente (Cuadro 2). El pH por si solo tiene un efecto degradador muy bajo en comparación con la luz UV y la temperatura. Sin embargo, Kah *et al.* (2007) atribuyen el bajo efecto degradador del pH debido a que la actividad microbiana pudo estar minimizada cuando el pH fue mayor a 8.0, esto pudo causar que la actividad microbiana desacelerara la degradación por parte de los microorganismos en la azadiractina. De la misma forma las temperaturas entre 40.0 – 70.0 °C pudieron disminuir la actividad microbiana. Pietikäinen *et al.* (2005) indicaron que las tasas de crecimiento óptimo de hongos y bacterias están en el rango de temperaturas 25.0 – 30.0 °C, y en temperaturas de 31.0 – 45.0 °C la tasa de crecimiento es más baja. Esto puede provocar la inactividad de algunos microorganismos razón por la cual en las temperaturas mayores a 40.0 °C tuvieron una degradación más lenta en los BP (Cuadro 2).

#### **7.5.5. Efecto de microorganismos: biodegradación**

Zhao *et al.* (2007) investigaron la degradación de los compuestos spinosad-A y, spinosad-D (principales ingredientes activos del bioinsecticida spinosad), encontraron que la mayor parte de su degradación se debió a la actividad de los microorganismos. Los autores informan una DT<sub>50</sub> de 1.8 d para spinosad-A, y de 0.9 d para spinosad-D en condiciones de campo. Hale y

Portwood (1996) comprobaron el efecto de la temperatura (25 °C) y los microorganismos sobre spinosad A, y D en suelos esterilizados por autoclave y no esterilizados. La DT<sub>50</sub> de spinosad-A en suelos no esterilizados, fue de 17.0 d, y para spinosad-D fue de 9.0 d y 14.0 d. Para suelos autoclaveados con la misma temperatura la DT<sub>50</sub> fue de 128.0 a 240.0 d. Stark y Walter (1995) reportaron que los microorganismos en suelos no autoclaveados con temperaturas de 15 y 25 °C en la azadiractina A y B tuvieron DT<sub>50</sub> de 43.9 y 19.8 d, y 59.2 y 20.8 d respectivamente, en cambio en suelos autoclaveados para azadiractina, A y B fue de 91.2 y 31.5 d, y 115.5 y 42.3 d respectivamente.

Los BP (piretrinas, nicotina, spinosad y *B. thuringiensis*) pueden estar más propensos a la degradación microbiana que a otros factores, principalmente a la facilidad que tienen para adherirse al suelo y mantenerse sujetos a cierta profundidad en que no están expuestos a la luz solar (Antonious *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 1999; Khairy *et al.*, 1990). Al respecto, Sundaram (1996) menciona que en suelos arcillosos la adsorción de la toxina de *B. thuringiensis* puede ser de hasta el 48%.

Griego y Spence (1978) mencionan que la actividad de *B. thuringiensis* es inhibida por bacterias que se encargan de degradar las toxinas de las proteínas, pero esto puede ser impedido por la luz solar debido a que inactiva a las bacterias. Tapp y Stotzky (1998) evaluaron la actividad de *B. thuringiensis* en condiciones de campo mostrando actividad reducida del insecticida después de solo 35.0 d de su aplicación, el autor atribuye la degradación a la actividad microbiana.

## 7.6. Efectos de los bioplaguicidas sobre los microorganismos del suelo

Debido a la naturaleza de los bioplaguicidas, no hay una tendencia general sobre su efecto en el comportamiento de los microorganismos en el suelo. Existen algunos investigadores que han encontrado efectos positivos, pero también se conoce que algunos BP pueden tener comportamientos nocivos sobre la microbiota del suelo.

Gopal *et al.* (2007) evaluaron el efecto de azadiractina en condiciones controladas, y encontraron que la población bacteriana, fúngica y actinomicetos disminuyó durante los primeros 15.0 d; al aumentar cinco veces la dosis de la concentración recomendada, las poblaciones afectadas fueron los hongos y actinomicetos y el efecto se mantuvo hasta los 60.0 d de observación. En ambos casos, se observó una recuperación en cuanto a número de microorganismos a los 90.0 d. Con respecto al efecto de las cantidades de los BP que se utilizan para los ensayos tanto *in vitro* como en campo, Spyrou *et al.* (2009) indicaron que se utilizan concentraciones que no son necesariamente acordes a las cantidades aplicadas en los manejos de los cultivos, lo que proporciona resultados de exposición que no son comunes.

En condiciones *in vitro* Sarawaneeyaruk *et al.* (2015) al aplicar 0.1 y 0.4 g ml<sup>-1</sup> de extracto de *Azadirachta indica* (planta de donde se extrae la azadiractina) y azadiractina directamente en dosis de 1.25 y 2.5 µg ml<sup>-1</sup> observó la inhibición de la actividad de los microorganismos del suelo, con un efecto transitorio en los microorganismos en el suelo por acción del extracto de *A. indica*. Mweetwa *et al.* (2016) explica que la reducción en la actividad y biomasa microbiana están relacionadas con un efecto negativo producido por la presencia de metabolitos secundarios exudados por *A. indica*. En contraste, Sarawaneeyaruk *et al.* (2015) mencionaron que el efecto positivo sobre los microorganismos es debido a que los extractos de *A. Indica* aportan ciertas proteínas y carbohidratos que permite el crecimiento de los microorganismos.

Ipsilantis *et al.* (2012) evaluaron el efecto de cuatro BP (spinosad, piretrinas, terpenos y azadiractina) sobre hongos micorrícicos arbusculares. De acuerdo con los resultados de sus experimentos spinosad, piretrinas y terpenos no afectaron la capacidad de colonización, ni la estructura de la comunidad fúngica; por otro lado, la azadiractina si indujo a cambios significativos y persistentes sobre las micorrizas.

Selim *et al.* (2007) evaluaron el impacto de la paenimixina, bioinsecticida a base de la bacteria gram-positiva *Paenibacillus sp* cepa B2 y conocida como paenimyxin 8.9. En dicho experimento en que se aplicó una dosis 10 veces mayor a la inhibitoria en microorganismos, se comprobó que la cantidad de bacterias en el suelo se vio afectada únicamente de forma transitoria. El efecto negativo sobre la presencia de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC), se notó entre el segundo y cuarto día, presentándose una disminución entre 60.0 – 70.0%, pero el séptimo día después de la aplicación, el efecto sobre la población bacteriana fue insignificante.

Un ejemplo del comportamiento neutro de los BP sobre el crecimiento de los microorganismos del suelos es el que encontró Spyrou *et al.* (2009) al aplicar azadirectina y un insecticida a base de la planta *Quillaja saponaria*. Sus resultados demostraron que estos dos compuestos en las dosis recomendadas no afectaban a las comunidades microbianas *in vitro*.

Telesiński *et al.* (2015) estudiaron el efecto de spinosad en aplicaciones en sus dosis recomendadas, 5, 10 y 25 veces más. El número de bacterias en el suelo aumentó significativamente en todos los ensayos a las diferentes dosis de spinosad. Fue hasta el día 28, en que la dinámica se modificó, al promoverse un incremento en la cantidad de bacterias en la dosis 10 veces mayor, pero una disminución en la dosis 25 veces mayor. Dentro de la comunidad de microorganismo del suelo, los hongos fueron los más afectados, al observarse una disminución desde la primera aplicación con excepción del tratamiento en que se usó 10 veces la dosis recomendada. Los actinomicetos también fueron inhibidos desde el día 1 de aplicación en todas las dosis, y se observó una recuperación de su presencia a partir del día 28 después de su aplicación.

Este efecto transitorio de los BP sobre el desarrollo de los microorganismos del suelo, se puede deber a que la mayoría de BP (spinosad, azadirectina, paenimixina, *Q. saponaria* y piretrinas) están elaborados a partir de metabolitos secundarios; la liberación masiva metabolitos secundarios en el suelo, puede generar un efecto nocivo para los microorganismos (Inderjit. *et al.*, 2005). Sin embargo, al ser degradados por la luz y temperatura sus efectos se ven mermados y se vuelven transitorios. Esto puede manifestar que los metabolitos secundarios tienen un umbral de estacionalidad de sus efectos y un grado de especificidad que no es igual

en todas las condiciones ambientales (Gross *et al.*, 2007). Blanco (2006) indica que muchas sustancias con actividad alelopática tienen efectos positivos sobre organismos como plantas y microorganismos en concentraciones bajas y, al alcanzar una determinada concentración, su efecto es contraproducente sobre los organismos que se encuentren expuestos.

A través de la expresión de un gen, la bacteria *B. thuringiensis* puede generar toxinas que son usadas para el control de los insectos y sus larvas en plantas genéticamente modificadas (Sun *et al.*, 2007; Tapp y Stotzky, 1998; Tapp y Stotzky, 1995). La presencia de dicha proteína en el suelo pudiera representar un riesgo para los microorganismos, debido a la capacidad de mantenerse adherida a las diversas fracciones del suelo (Tapp y Stotzky, 1998). Aunque en otros estudios de campo donde analizaron los efectos de la proteína Cry1AB en exudados de raíz y biomasa de maíz, Saxena y Stotzky (2001) y Stotzky (2005) con resultados preliminares se comprobó que la proteína no es tóxica para nematodos, protozoos, bacterias y hongos.

Muchaonyerwa *et al.* (2005) realizaron un ensayo *in vitro* en vertisoles que se trataron con proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* (Btk, Bti, y Btt) incubándolas 7 días, al determinar la biomasa microbiana y hacer un recuento de bacterias y hongos se concluyó que los cristales no afectaron a ninguna de las variables medidas, y según mencionan los autores se debió a la adsorción de los cristales por el suelo.

## 7.7. Métodos analíticos para la determinación de bioplaguicidas en suelo

Las técnicas analíticas utilizadas para la extracción, identificación y cuantificación de plaguicidas en general, son las mismas que se pueden utilizar para la detección de bioplaguicidas (BP) en el suelo. En el Cuadro 3 se presenta una lista de técnicas de extracción que mayor éxito han tenido al aplicarlas para estudios realizados sobre el comportamiento de algunos de los BP más populares.

Cuadro 3. Ejemplo de técnicas de extracción utilizadas para la extracción de BP en suelo

Técnica de extracción	Bioplaguicida <sup>¶</sup>	Porcentaje de recuperación	Tamaño de la muestra (g)	Solvente	Referencia
QuEChERS	AZA, RT, SP - A y D	83.0-104.0	5.0	10.0 ml de C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	Drożdżyński y Kowalska (2009)
QuEChERS	NI, SB, VE, RT, AZA, CV, DE, SP, PI (I y II), JS (I y II) y CI (I y II)	30.0 – 110.0	5.0	5.0 ml de C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O al 1.0% en solución de C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	Prestes <i>et al.</i> (2012)
LLE	NI, SB, VE, RT, AZA, CV, DE, SP, PI (I y II), JS (I y II) y CI (I y II)	3.0 – 53.0	5.0	30.0 ml C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O / CH <sub>3</sub> OH (3:1 v/v)	Prestes <i>et al.</i> (2012)
SLE	NI, SB, VE, RT, AZA, CV, DE, SP, PI (I y II), JS (I y II) y CI (I y II)	0.0 – 36.0	5.0	10.0 ml de C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Prestes <i>et al.</i> (2012)
SLE + sonicación	NI, SB, VE, RT, AZA, CV, DE, SP, PI (I y II), JS (I y II) y CI (I y II)	3.0 – 37.0	10.0	30.0 ml de C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> / CH <sub>3</sub> OH (3:1 v/v)	Prestes <i>et al.</i> (2012)
Soxhlet	AZA - A	54.2 - 72.3	50.0	200 ml CH <sub>3</sub> OH	Agyarko <i>et al.</i> (2006)

<sup>¶</sup>AZA: Azadiractina; SP: Spinosad; NI: Nicotina; PR: Piretrina; RT: Rotenona; BT: *Bacillus thuringiensis*; CE: Cevadina; DE: Deguelin; SB: Sabadina; JS: Jasmolina; CI: Cinerina VE: Vedadina; SLE: Extracción Solido Líquido; LLE: Extracción Líquido – Líquido; QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

### **7.7.1. Preparación de la muestra**

El primer paso para obtener una recuperación adecuada de los BP presentes en las muestras de suelo, es realizar de manera adecuada la extracción (Tadeo *et al.*, 2012). Un factor importante al momento de la toma de la muestra es definir la cantidad de suelo a analizar que dependerá del método analítico que se usara y de la concentración en el suelo del analito de interés; generalmente, para obtener una recuperación adecuada de los BP más utilizados, se emplean entre 5.0 – 50.0 g de suelo (Cuadro 3).

### **7.7.2. Métodos de extracción para bioplaguicidas en suelo**

**Soxhlet:** Es una técnica para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas, se lleva a cabo usando disolventes orgánicos, el cual refluye en la muestra contenida para su extracción a través de contacto con la muestra, una de sus ventajas es su bajo costo (Castro y García-Ayuso, 1998). Agyarko *et al.* (2006) analizaron la extracción de azadiractina-A de suelo, para la extracción del BP se usó el método Soxhlet, se usaron 50.0 g de muestra de suelo y 200 ml de metanol, la extracción fue de un tiempo de 6.0 h, con recuperaciones que variaron entre 54.2 - 72.3% (Cuadro 3).

**Extracción Sólido – Líquido (SLE, Liquid – Solid Extraction):** Es un método que se aplica para determinar trazas de plaguicidas en el suelo y que su principio consiste en el contacto de la muestra con un disolvente adecuado (Martínez-Lara y Páez, 2017). Dentro de las principales desventajas del método se pueden mencionar la alta cantidad de disolventes orgánicos que requiere, el tiempo necesario para realizar la extracción, y la generación de residuos tóxicos (Lucía *et al.*, 2017). Aunque en la extracción SLE se requiere de menor cantidad de solvente, de tiempo y es más efectivo en la recuperación de BP que cuando se utiliza extracción Soxhlet.

Cavoski *et al.* (2008) aplicaron SLE para recuperar rotenona a partir de muestras de 5.0 g de suelo, 10.0 ml de acetato de etilo y la extracción fue de un tiempo de 30.0 min con intervalos de recuperación de 94.0 – 98.0% de azadiractina. Con esta misma técnica, Prestes *et al.* (2012) realizaron extracción de nicotina, cevadina y cinerina I, y con menor éxito (recuperación de 1 – 36%) informan de la extracción de sabadina, veradina, azadiractina, rotenona, deguelin, cinerina II, piretrinas II, jasmolina II, piretrina I, spinosad y jasmolina I,

en todos los casos utilizando 5.0 g de suelo como muestra. Prestes *et al.* (2012) informó del uso con éxito de SLE para la extracción de jasmolina I y II y cinerina I y II (moléculas presentes en el BP piretro), cevadina (componente de las semillas de lirio), deguelin (analito extraído de la rotenona), veradina y sabadina (polvo hecho con semillas de *Schoenocaulon officinale*) (Cuadro 3).

Cavoski *et al.* (2008) aplicaron SLE para recuperaciones de rotenona en suelo obteniendo recuperaciones de 94.0 al 98.0%. Las diferencias entre los resultados de extracción pueden deberse a sus metodologías, en la fase de separación Cavoski *et al.* (2008) usaron un agitador rotatorio durante 10.0 min a 6500 rpm y Prestes *et al.* (2012) aplicaron un agitador rotatorio durante 5.0 min a 500 rpm. Cavoski *et al.* (2007) realizaron ensayos para extracción de rotenona en 2007, usando la misma metodología que en 2008 obteniendo resultados de recuperación entre 95.0 - 100.0%.

Una variante de la extracción por SLE es añadir sonicación, Prestes *et al.* (2012) evaluaron este método en muestras de 10.0 g de suelo, la extracción fue realizado con 30 ml de acetato de etilo / metanol (3:1, v/v) como solvente para sabadina, veradina, azadirectina, rotenona, deguelin, cinerina II, piretrina II, piretrina I, spinosad, cevadina I, cevadina II y jasmolina I, aunque la jasmolina II no logro extraerse, los porcentajes de extracción fueron de 3.0 – 37.0% relativamente bajos (Cuadro 3). Sin embargo, Zhou *et al.* (2013) al aplicar un método similar (SLE + sonicación) para rotenona con extracción de 30.0 min y usando como disolvente 50.0 ml de acetonitrilo, obtuvo porcentajes de recuperación de 81.1 - 85.6% las diferencias en los porcentajes se pudieron deber al tipo de solvente utilizado.

El tipo de solvente es uno de los factores más importante a tomar en cuenta cuando se aplican SLE. Según Sadowska-Rociek *et al.* (2013), acetonitrilo es uno de los disolventes más efectivo cuando se usa SLE al realizar ensayos de recuperación en comparación con acetato de etilo para extraer plaguicidas e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en pastos, los investigadores señalan que con el acetonitrilo se obtienen muestras con mayor pureza y tasas de recuperación más altas.

**Extracción Líquido - Líquido (LLE, Liquid – Liquid Extraction):** Es un método de separación que tiene como principio la transferencia de un soluto de un solvente a otro, siendo los dos solventes inmiscibles o parcialmente miscibles entre sí (Berk, 2018). Con frecuencia, uno de los solventes es agua o una mezcla acuosa y el otro es líquido orgánico no polar. Utilizando extracción LLE, Prestes *et al.* (2012), obtuvieron recuperaciones que variaron entre el 3.0 – 53.0% para sabadina, veradina, azadirectina, rotenona, deguelin, cinerina II, piretrina II, piretrina I, spinosad, cevadina I, cevadina II, jasmolina I y jasmolina II tomando como muestras de 5.0 g de suelo y usando una celda de extracción de acero inoxidable de 34.0 ml (Cuadro 3).

**QuEChERS (Fast, Easy, Economic, Effective, Solid and Safe):** Es un método simplificado de la extracción convencional para analizar residuos. Este procedimiento involucra dos etapas: (I) La extracción del compuesto de interés con solventes orgánicos, y (II) la limpieza del extracto a través de extracción en fase sólida por dispersión con un compuesto orgánico (Kim *et al.*, 2019).

Algunas de las ventajas de QuEChERS, en comparación con otros métodos de extracción, es que se requieren menores volúmenes de muestra y de solvente, menos tiempo para la preparación de muestra, se tienen mayor tasa de recuperación, y un mejor rendimiento analítico (Lawal *et al.*, 2018). Además, en una revisión bibliográfica realizada por Vera *et al.*, 2013 se menciona que el método QuEChERS proporciona buenos resultados para la extracción de plaguicidas sintéticos en suelo en el rango de 59.0 – 132.0%, lo que hace suponer que se podría utilizar con éxito para el estudio de los BP en el suelo.

Drożdżyński y Kowalska (2009) evaluaron el método QuEChERS para la extracción de azadirectina, spinosad A y D y rotenona, en productos de origen vegetal y muestras de suelo. El método consistió en una extracción única de los compuestos con 10.0 ml de acetonitrilo, a 5.0 g de suelo acidificado, seguido de una etapa de limpieza por extracción en fase sólida dispersiva con 5.0 ml del sobrenadante. Las recuperaciones de las estuvieron en el rango entre 83.0 y 104.0% Prestes *et al.* (2012) evaluaron el método QuEChERS, para extraer los BP nicotina, sabadina, veratridina, rotenona, azadirectina, cevadina, deguelina, spinosad A y D, piretrinas I y II, cinerina I y II, jasmolina I y II del suelo y consiguieron recuperaciones que

variaron en función de la cantidad del BP aplicado al suelo: la recuperación menor fue del 50.0% para nicotina y sabadina, mientras que para en el resto de los BP varió entre 70.0 y 120.0% (Cuadro 3).

Nota *et al.* (2000) obtuvieron recuperaciones de 95.0 – 101.0% de nicotina en suelo, la extracción se realizó con 50.0 ml de metanol y 50.0 g de suelo, con agitación continua por 5 min.

### 7.7.3. Métodos para la detección y cuantificación de bioplaguicidas en el suelo

Después de la extracción del analito de interés el siguiente paso es su cuantificación. La importancia de vigilar los niveles de los residuos de cualquier compuesto químico está enfocada con garantizar la seguridad humana y ambiental (Young *et al.*, 2000). Para el caso de los bioplaguicida (BP), el Cuadro 4 se presenta una lista de los métodos analíticos encontrados en la revisión bibliográfica que se realizó para la redacción de este Capítulo.

Cuadro 4. Métodos utilizados para la detección de BP en muestras de suelo.

Analito <sup>¶</sup>	Método <sup>§</sup>	Fase estacionaria	Fase móvil	Detector <sup>‡</sup>	LOQ	Referencia
RT	HPLC	Columna C18-XDB (250 x 2.1 mm, 5 µm)	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> al 0.1% (75:25 v/v)	MS/MS + QS + ESI	NA	Cavoski <i>et al.</i> (2008)
NI	HPLC	Columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N + CH <sub>3</sub> OH al 10.0%	UV 265.0 nm	NA	Nota <i>et al.</i> (2000)
NI, SB, VE, RT, AZA, CE, DE, SP y PR	UHPLC	Columna C18-BEH (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	A: CH <sub>3</sub> OH B: NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> 5.0 mM	MS/MS + QT + ESI	> 10 µg kg <sup>-1</sup>	Prestes (2012)
AZA, RT, SPA, SPD	UHPLC	Columna C18-BEH (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	A: C <sub>2</sub> HNO <sub>2</sub> al 0.1% B: C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N + CH <sub>3</sub> OH al 0.1%	MS/MS + QT + ESI	6.0 – 9.0 µg kg <sup>-1</sup>	Drożdżyński y Kowalska (2009)
BT 5-endotoxina	ELISA	NA	NA	Placa de micropocillos recubierta de anticuerpo	20.0 ng ml <sup>-1</sup>	Sundaram (1996)
Proteína CryiAb	ELISA	NA	NA	DO a 450.0 nm usando un lector de placas	2.5 - 2.9 ng g <sup>-1</sup>	Gruber <i>et al.</i> (2012)

<sup>¶</sup>AZA: Azadirectina; SP: Spinosad; NI: Nicotina; PR: Piretrina; RT: Rotenona; BT: *Bacillus thuringiensis*; CE: Cevadina; DE: Deguelin. NA: No aplica

<sup>§</sup>HPLC: Cromatografía líquida de alto resolución; UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta resolución; ELISA: Ensayo por Inmuno Absorción Ligado a Enzimas, NA: No aplica.

<sup>‡</sup>MS/MS: Espectrometría de Masas; ESI: Ionización por Electro spray; QS: Cuadrupolo Simple; QT: Tripe cuadrupolo; DO: Densidad Óptica; LOQ: límite de cuantificación; NA: No especificado.

### 7.7.3.1. Métodos cromatográficos

**Cromatografía Líquida de Alta Resolución** (High Performance Liquid Chromatography, HPLC): Es un método físico de separación cuyo objetivo es identificar los diferentes compuestos de una mezcla utilizando las características de tamaño y polaridad de cada uno de sus componentes. Consta de una fase sólida, que generalmente es una columna capaz de soportar presiones de 2000.0 – 4000.0 psi; una fase líquida, constituida por una mezcla de disolventes y; un detector que se encarga de determinar la cantidad del analito (Romero González *et al.*, 2007).

Cavoski *et al.*, 2007 utilizaron HPLC con detector ultravioleta (UV) identificar y cuantificar la presencia de rotenona. Los autores puntualizaron que uno de los inconveniente con el detector UV es que varios componentes de la matriz interfirieron con la señal que presentaba el analito; y mencionaron que por lo tanto, en algunos casos los LOQ resultan ser altos impidiendo una medición menos precisa que con otros detectores como espectrómetros de masas (Cuadro 4).

Caboni *et al.* (2002) lograron separar, cuantificar y confirmar la presencia de rotenona, azadiractina, rianodinas y piretrinas mediante HPLC, con un Detector de Matriz de Diodos (Diode Array Detector, DAD) y espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI, MS - Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Mass Spectrometry). Los autores informaron, que debido al uso de ambos detectores, se obtuvieron espectros con buena resolución, y máxima pureza. Los límites de detección fueron de 0.01 mg kg<sup>-1</sup> para ryanodina, rotenona, 12aβ hidroxirotenona, cinerina, jasmolina I y II; de 0.02 mg kg<sup>-1</sup> para deguerin y azadiractina; y 0.05 mg kg<sup>-1</sup> para piretrinas I y II.

Cavoski *et al.* (2008) evaluaron con HPLC con columnas C18 para rotenona, en la identificación y cuantificación se utilizó MS/MS+ ESI, esta combinación de técnicas permite la determinación rápida de sustancias más polares o termolábiles (ej. Rotenona, azadiractina y spinosad) para posteriormente ionizar las macromoléculas. Aunque los investigadores omitieron los límites de cuantificación a través de dicho método (Cuadro 4).

**Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento** (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography): Es un método cromatográfico especializado que funciona más rápido, tiene mayor sensibilidad y se utilizan menor cantidad de solventes que con HPLC. La técnica

opera a una presión de 6,000 – 15,000 psi. Al igual que HPLC, se puede adaptar a diversos tipos de detectores. (Craig Trenerry y Rochfort, 2010).

Drożdżyński y Kowalska (2009) y Prestes *et al.* (2012) aplicaron UHPLC como técnica para cuantificar diversos BP provenientes de suelos de granjas ecológicas y áreas agrícolas. Prestes *et al.* (2012) obtuvieron LOQ iguales o inferiores a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para nicotina, sebadina, veradina, rotenona, azadiractina, cevadina, deguelina, spinosad-D y piretrinas. Drożdżyński y Kowalska (2009) obtuvieron LOQ menor o igual a  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  en spinosad A y D y rotenona. El método HPLC + MS/MS + ESI + QT fue la permitió una detección y cuantificación de BP a LOQ más bajos en comparación con el método HPLC + DAD + APCI - MS.

#### **7.7.4. Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas**

El Ensayo por Inmuno Absorción Ligado a Enzimas (ELISA) detecta y amplifica las reacciones de antígenos y anticuerpos por medio de moléculas de enzimas y anticuerpos; la elección del anticuerpo dependerá de la especificidad de la molécula a detectar; la presencia de la enzima se detecta por cambio de color o se cuantifica por un lector de placas (Dodd y O'Kennedy, 2014).

Sundaram (1996) uso ELISA en proteínas exudadas por BT para posteriormente medir la densidad óptica (DO) a 450 nm usando un lector de placas, reportando límites de cuantificación de  $20 \text{ ng ml}^{-1}$ . En experimentos Gruber *et al.* (2012) indicaron límites de cuantificación de 2.57 - 2.91 ng de proteína Cry1Ab  $\text{g}^{-1}$  suelo<sup>1</sup>. (Cuadro 4).

#### **7.7.5. Espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS)**

La espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) (longitudes de onda 350-2500 nm) es una técnica basada en la medición de las vibraciones provocadas por el estiramiento y flexión de los enlaces de hidrógeno con carbono, oxígeno y nitrógeno. El análisis de los espectros de absorción NIRS da como resultado información cuantitativa y cualitativa sobre los componentes presentes en la muestra analizada (Mertens *et al.*, 2011).

Las razones por las que se ha adoptado NIRS como método analítico en la detección de plaguicidas en el suelo, incluyen: preparación mínima de muestra, análisis rápido, rentable para analizar una sola muestra o un lote de muestras, se pueden determinar varios

constituyentes simultáneamente, no se destruyen las muestras, no se utilizan productos químicos y peligrosos, y se obtienen resultados precisos.

A través de NIRS Soto-Barajas *et al.* (2012) en muestras de suelo cuantificaron la presencia de imazapyr (herbicida no selectivo perteneciente a la familia de las imidazolinonas). Los autores informaron que la señal espectral asociada a la presencia de imazapyr en suelo se puede detectar a través de modelos discriminantes generadas por NIRS, lo que permite la identificación de muestras que contienen el herbicida. Por otro lado, a nivel cuantitativo, puedo detectar de imazapyr en un rango de concentración de 0,003 a 0,121 mg por gramo de suelo.

La espectroscopia NIRS pudiera ser una posibilidad para evaluar la presencia de BP en el suelo, sin embargo, se requiere de realizar diversos ensayos que permitan ajustar la metodología para obtener resultados equiparables a los obtenidos a través de los procedimientos tradicionales debido a que su uso solo se ha probado en herbicidas de origen sintético.

## 7.8. Conclusiones

En la revisión de la literatura, se observó que no se cuenta con un concepto único de bioplaguicida a nivel internacional, más bien se encuentran conceptos diversos por parte de organismos internacionales que pudieran equivaler a una idea de tal concepto. Sin embargo, esto no permite llegar a una idea clara para el público en general de que es y cómo funciona un bioplaguicida. Por su parte el único organismo internacional que cuenta con una clasificación que permite clasificar e identificar cada tipo de bioplaguicida es la EPA.

De la misma forma la información referente a el comportamiento de los bioplaguicidas en el suelo se centra en un grupo de bioplaguicidas de éxito comercial: *Bacillus thuringiensis*, rotenona, spinosad, azidirectina y nicotina. Esto se debe a que los bioplaguicidas antes mencionados ya cuentan con mayor antigüedad y tienen una eficacia comprobada.

La mayor parte de la información recolectada se centra en la degradación de los bioplaguicidas, sin embargo, los ensayos en su mayoría se han realizado en condiciones controladas y se tiene muy poca información del comportamiento de los bioplaguicidas en condiciones ambientales.

Se carece de investigación que sustente la manera en que los bioplaguicidas llevan a cabo la adsorción, solo se reporta información en los bioplaguicidas de nicotina, *Bacillus thuringiensis*, piretrinas y spinosad en isotermas lineales.

Se ofrece información que evidencia que los bioplaguicidas no tienen efectos negativos sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo cuando se aplican en las dosis recomendadas. Sin embargo, estos aspectos requieren mayor investigación, específicamente en cada caso particular de cada bioplaguicida, ya que cada compuestos podría sugerir resultado diferentes para los microorganismos del suelo.

La cantidad de bioplaguicida retenida en el suelo puede ser determinada en gran medida por el proceso de adsorción y las condiciones ambientales siendo la luz el que mayor efecto degradado puede tener. En este sentido el desarrollo de técnicas analíticas avanzadas como UHPLC y QuEChERS permiten analizar en periodos de tiempo cortos y con mayor eficacia bioplaguicidas, QuEChERS permite extracciones simples y de alto rendimiento y UHPLC reduce el tiempo del análisis en comparación con HPLC. De igual manera NIRS se presenta

como una opción a futuro para evaluar la presencia de bioplaguicidas en el suelo. NIRS ya ha sido probado para identificar la presencia de herbicidas de origen sintético en muestras de suelo.

## 7.9. Literatura citada

- Agyarko K., Kwakye P.K., Bonsu M., Osei B.A., Donkor N.A., Amanor E. (2006) Breakdown of Azadirachtin A in a Tropical Soil Amended with Neem Leaves and Animal Manures Project supported by the Centre for School and Community Science and Technology Studies (SACOST), University of Education, Winneba, Ghana. *Pedosphere* 16:230-236.
- Antonious G.F., Patel G.A., Snyder J.C., Coyne M.S. (2004) Pyrethrins and piperonyl butoxide adsorption to soil organic matter. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 39:19-32.
- Bailey K.L., Falk S. (2011) Turning Research on Microbial Bioherbicides into Commercial Products - A *Phoma* Story. *Pest Technology* 5:73-79.
- Balmer M.E., Goss K.-U., Schwarzenbach R.P. (2000) Photolytic Transformation of Organic Pollutants on Soil Surfaces An Experimental Approach. *Environmental Science and Technology* 34:1240-1245.
- Barrek S., Paisse O., Grenier-Loustalot M.F. (2004) Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:753-63.
- Berk Z. (2018) Chapter 11 - Extraction, in: Z. Berk (Ed.), *Food Process Engineering and Technology (Third Edition)*, Academic Press. pp. 289-310.
- Blanco. (2006) La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos Tropicales* 27:5-16.
- Brusseau M.L., Chorover J. (2019) *Chemical Processes Affecting Contaminant Transport and Fate, Environmental and Pollution Science (Third Edition)*, Cambridge. Academic Press. pp. 113-130.
- Caboni P., Cabras M., Angioni A., Russo M., Cabras P. (2002) Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3491-3494.
- Cabrera Verdezoto R.P., Morán Morán J.J., Mora Velasquez B.J., Molina Triviño H.M., Moncayo Carreño O.F., Díaz Ocampo E., Meza Bone G.A., Cabrera Verdesoto C.A. (2016) Evaluación de dos insecticidas naturales y un químico en el control de plagas en el cultivo de frijol en el litoral ecuatoriano. *Idesia (Arica)* 34:27-35.

- Cavoski I., Caboni P., Sarais G., Cabras P., Miano T. (2007) Photodegradation of rotenone in soils under environmental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7069-74.
- Cavoski I., Caboni P., Sarais G., Miano T. (2008) Degradation and persistence of rotenone in soils and influence of temperature variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8066-73.
- Cleveland C.B., Bormett G.A., Saunders D.G., Powers F.L., McGibbon A.S., Reeves G.L., Rutherford L., Balcer J.L. (2002) Environmental fate of spinosad. 1. Dissipation and degradation in aqueous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3244-56.
- Cordeau S., Triolet M., Wayman S., Steinberg C., Guillemin J.-P. (2016) Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection* 87:44-49.
- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., Grant W.P. (2011) The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366:1987-98.
- Chaudhary S., Kanwar R.K., Sehgal A., Cahill D.M., Barrow C.J., Sehgal R., Kanwar J.R. (2017) Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Frontiers in plant science* 8:610-610.
- Craige Trenerry V., Rochfort S.J. (2010) *Natural Products Research and Metabolomics*, Elsevier, Oxford. pp. 595-628.
- Drożdżyński D., Kowalska J. (2009) Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394:2241-2247.
- Gasparoni J.C., Rosell R.A., Galantini J. (2001) *Soil organic matter evaluation*, Boca Ratón, Lewis Publishers; pp. 311-322.
- Gopal M., Gupta A., Arunachalam V., Magu S.P. (2007) Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities. *Bioresource Technology* 98:3154-8.
- Griego V.M., Spence K.D. (1978) Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Applied and Environmental Microbiology* 35:906-910.

- Gross E.M., Hilt S., Lombardo P., Mulderij G. (2007) Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton—state of the art and open questions. *Hydrobiologia* 584:77-88.
- Gruber H., Paul V., Meyer H.H., Müller M. (2012) Determination of insecticidal Cry1Ab protein in soil collected in the final growing seasons of a nine-year field trial of Bt-maize MON810. *Transgenic Research* 21:77-88.
- Hale K.A., Portwood D.E. (1996) The aerobic soil degradation of spinosad - a novel natural insect control agent. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 31:477-484.
- Hedia R., El-Aswad A. (2018) Spinosad Adsorption on Humic and Clay Constituents of Lacustrine Egyptian Soils and Its Leaching Potential. *Alexandria Science Exchange Journal*, 37: 457-466.
- Inderjit., Weston L.A., Duke S.O. (2005) Challenges, achievements and opportunities in allelopathy research. *Journal of Plant Interactions* 1:69-81.
- Ipsilantis I., Samourelis C., Karpouzas D.G. (2012) The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 45:147-155.
- Isman M. (2006) Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology* 51:45-66.
- Johnson S., Patra D., Dureja P. (2000) Effect of fatty acids and oils on photodegradation of Azadirachtin-A. *Journal Environmental Science Health B* 35:491-501.
- Kah M., Beulke S., Brown C. (2007) Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:4487-92.
- Katagi T. (2004) Photodegradation of Pesticides on Plant and Soil Surfaces. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 182:1-189.
- Khairy A.H., Baghdadi H.H., Ghabbour E.A. (1990) Adsorption mechanisms of nicotine on humic acid and clay humic acid complex. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 153:33-38.
- Kim L., Lee D., Cho H.-K., Choi S.-D. (2019) Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 22: 1-16.
- Lawal A., Wong R.C.S., Tan G.H., Abdulra'uf L.B., Alsharif A.M.A. (2018) Recent Modifications and Validation of QuEChERS-dSPE Coupled to LC-MS and GC-MS

- Instruments for Determination of Pesticide/Agrochemical Residues in Fruits and Vegetables: Review. *Journal Chromatographic Science* 56:656-669.
- Lazo J.C., Navarro A.E., Sun-Kou M.R., Llanos B.P. (2008) Síntesis y caracterización de arcillas organofílicas y su aplicación como adsorbentes del fenol. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 74:3-19.
- Liu H.-j., Wang H.-l., Guo B.-y., Li J.-z. (2013) Adsorption and Leaching Behavior of Spinosad in Soil. *Agrochemicals* 2013:03.
- Lucia C.-G.A., Quijano-Parra A., Rodriguez-Martinez R. (2017) Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria* 18:89-102.
- Marrone P.G. (2014) The Market and Potential for Biopesticides, *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*, New York. American Chemical Society; pp 245-258.
- Martínez-Lara J.M., Páez Melo M.I. (2017) Diseño de experimentos aplicado a la optimización del método de extracción QuEChERS para la determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en suelos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33:559-573.
- Mertens K., Kemps B., Perianu C., De Baerdemaeker J., Decuypere E., De Ketelaere B., Bain M. (2011) 10 - Advances in egg defect detection, quality assessment and automated sorting and grading, in: Y. Nys, et al. (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*, Woodhead Publishing. pp. 209-241.
- Muchaonyerwa P., Waladde S., Nyamugafata P., Mpeperekwi S., Ristori G. (2005) Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. *Plant and Soil* 266:41-46.
- Mweetwa A., Lubungo A., Chishala B., Phiri M. (2016) Selected Chemical Properties, Microbial Activity and Biomass of Soils Amended with Aqueous Neem Leaf Extract. *Sustainable Agriculture Research* 5:103-112.
- Nota G., Naviglio D., Ugliano M., Romano R. (2000) Determination of Nicotine in the Soil Mixed With Tobacco Powder as Fertilizer. *Analytical Letters* 33:265-275.
- Othman Z., Zubairi S., Sarmidi M., Aziz R. (2016) Environmental Friendly Bio-Pesticide Rotenone Extracted From *Derris* Sp.: A Review on the Extraction Method, Toxicity and Field Effectiveness. *Jurnal Teknologi* 78:47-69.

- Pietikäinen J., Pettersson M., Bååth E. (2005) Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology* 52:49-58.
- Plaza-Bolanos P., Padilla-Sanchez J.A., Garrido-Frenich A., Romero-Gonzalez R., Martinez-Vidal J.L. (2012) Evaluation of soil contamination in intensive agricultural areas by pesticides and organic pollutants: south-eastern Spain as a case study. *Journal Environmental Monitoring* 14:1182-9.
- Prestes O.D., Padilla-Sánchez J.A., Romero-González R., López Grió S., Garrido Frenich A., Martínez-Vidal J.L. (2012) Comparison of several extraction procedures for the determination of biopesticides in soil samples by ultrahigh pressure LC-MS/MS. *Journal Separation Science* 35:861-8.
- Rodrigues E.T., Pardal M., Salgueiro-González N., Muniategui-Lorenzo S., Alpendurada M.F. (2016) A single-step pesticide extraction and clean-up multi-residue analytical method by selective pressurized liquid extraction followed by on-line solid phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for complex matrices. *Journal Chromatography A* 1452:10-7.
- Romero-González R., Frenich A., Martínez-Vidal J. (2015) *Biopesticide residues in soil*. Milton Park. Taylor and Francis; pp. 119-138.
- Romero González R., Fernández Moreno J.L., Plaza Bolaños P., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L. (2007) Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española de Salud Pública* 81:461-474.
- Rousidou C., Evangelia P., Kortsinidou M., Giannakou I.O., Singh B., Menkissoglu-Spiroudi U., Karpouzias D. (2013) Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology and Biochemistry* 67:98-105.
- Sadowska-Rociek A., Surma M., Cieslik E. (2013) Application of QuEChERS Method for Simultaneous Determination of Pesticide Residues and PAHs in Fresh Herbs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90.

- Salehi Jouzani G., Valijanlian E., Sharafi R. (2017) *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. Applied Microbiology and Biotechnology 101:2691-2711
- Sarawaneeyaruk S., Krajangsang S., Pringsulaka O. (2015) The effects of neem extract and azadirachtin on soil microorganisms. Journal of soil science and plant nutrition 15.
- Saxena D., Flores S., Stotzky G. (1999) Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. Nature 402:480.
- Saxena D., Flores S., Stotzky G. (2002) Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. Soil Biology and Biochemistry 34:111-120.
- Saxena D., Stotzky G. (2001) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. Soil Biology and Biochemistry 33:1225-1230.
- Seiber J.N., Coats J., Duke S.O., Gross A.D. (2014) Biopesticides: state of the art and future opportunities. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62:11613-9.
- Selim S., Martin-Laurent F., Rouard N., Gianinazzi S., van Tuinen D. (2007) Impact of a new biopesticide produced by *Paenibacillus sp.* strain B2 on the genetic structure and density of soil bacterial communities. Pest Management Science 63:269-75.
- Sengottayan S.-N. (2015) A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. New York, Springer; pp. 49-63.
- Soto-Barajas M., González-Martin I., Hernández-Hierro J.M., Prado B., Hidalgo C., Etchevers J. (2012) NIR spectroscopy to identify and quantify imazapyr in soil. Analytical Methods 4:2764-2771.
- Spyrou I.M., Karpouzias D.G., Menkissoglu-Spiroudi U. (2009) Do Botanical Pesticides Alter the Structure of the Soil Microbial Community? Microbial Ecology 58:715-727.
- Stotzky G. (2002) Clays and humic acids affect the persistence and biological activity of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* in soil, in: A. Violante, *et al.* (Eds.), Developments in Soil Science, Elsevier. pp. 1-16.
- Stotzky G. (2005) Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. Plant and Soil 266:77-89.

- Sun C.X., Chen L.J., Wu Z.J., Zhou L.K., Shimizu H. (2007) Soil persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin from transgenic Bt cotton tissues and its effect on soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils* 43:617-620.
- Sundaram K.M.S. (1996) Sorptive interactions and binding of  $\delta$ -endotoxin protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in forest soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 31:1321-1340.
- Tabashnik B.E., Gassmann A.J., Crowder D.W., Carrière Y. (2008) Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat Biotechnol* 26:199-202.
- Tadeo J.L., Pérez R.A., Albero B., García-Valcárcel A.I., Sánchez-Brunete C. (2012) Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide residues in soil. *Journal AOAC International* 95:1258-71.
- Tapp H., Stotzky G. (1995) Insecticidal Activity of the Toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* Adsorbed and Bound on Pure and Soil Clays. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1786-90.
- Tapp H., Stotzky G. (1998) Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30:471-476.
- Telesiński A., Michalcewicz W., Płatkowski M., Stręk M., Onyszko M., Wiśniewska J. (2015) The side-effect of organic insecticide spinosad on biochemical and microbiological properties of clay soil. *Journal of Ecological Engineering* 16:191-197.
- Urkude R., Dhurvey V., Kochhar S. (2019) 15 - Pesticide Residues in Beverages, in: A. M. Grumezescu and A. M. Holban (Eds.), *Quality Control in the Beverage Industry*, Academic Press. pp. 529-560.
- Vera J., Correia-Sá L., Paíga P., Bragança I., Fernandes V., Domingues V., Delerue-Matos C. (2013) QuEChERS and soil analysis. An Overview. *Sample Preparation* 1:54-77.
- Young D.L., Mihaliak C.A., West S.D., Hanselman K.A., Collins R.A., Phillips A.M., Robb C.K. (2000) Determination of spinosad and its metabolites in food and environmental matrices. 3. Immunoassay methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5146-53.
- Zhang L., Xu C., Chen Z., Li X., Li P. (2010) Photodegradation of pyrene on soil surfaces under UV light irradiation. *Journal of Hazardous Materials* 173:168-172.

- Zhao E., Xu Y., Dong M., Jiang S., Zhou Z., Han L. (2007) Dissipation and Residues of Spinosad in Eggplant and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78:222-225.
- Zhou Y., Zhang N., Wang K., Li W., Li H., Zhang Z. (2013) Dissipation and residue of rotenone in cabbage and soil under field conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:251-5.
- Zimdahl R.L. (2018) Chapter 15 - Herbicides and Soil, in: R. L. Zimdahl (Ed.), *Fundamentals of Weed Science (Fifth Edition)*, Academic Press. pp. 445-462.
- Zuleta-Castro C., Rios D., Hoyos R., Orozco-Sánchez F. (2017) First formulation of a botanical active substance extracted from neem cell culture for controlling the armyworm. *Agronomy for Sustainable Development* 37: 1-8.

## 8. Capítulo 2: Evaluación del efecto fitotóxico de dos potenciales herbicidas a base de *Metopium brownei* (chechén) y *Viguiera dentata* (tajonal)

### 8.1. Resumen

En el presente estudio se presentan los resultados de comparar los efectos fitotóxicos de herbicidas botánicos (HB) de *Metopium brownei* (MB) y *Viguiera dentata* (VD) con un herbicida sintético atrazina. Los HB se prepararon con agua [1:3 (v/v)], realizándose bioensayos *in vitro*, evaluándose su efecto en semillas de maíz y tamizajes fitoquímicos a las 24 y 72 h de preparación de los extractos. En bioensayos en campo realizados en dos etapas, se evaluó, en la primera fase (I), la efectividad de HB y atrazina en forma pura y combinados en diferentes proporciones; en la segunda (II) los cuatro mejores tratamientos de etapa I se evaluaron en un cultivo de maíz. La eficacia de los tratamientos se evaluó determinándose el porcentaje de cobertura de malezas, identificándose además las especies presentes en cada tratamiento. El tamizaje fitoquímico indicó pérdidas de metabolitos secundarios a las 72 h de elaboración. Se encontraron diferencias significativas en los bioensayos *in vitro* ( $p > 0.05$ ), en los efectos de los HB sobre la germinación y longitud del talluelo y en la longitud de radícula ( $p \leq 0.05$ ). En la etapa 1, los tratamientos de MB, HB combinados y VD combinado con atrazina fueron los más eficaces en el control de arvense, a los 90 días de la primera aplicación. Las maleza dominantes fueron *Digitaria ischaemum* y *Sorghum halepense* (*poáceas*) y algunas fabáceas. En la etapa 2 los tratamientos de HB combinados y VD combinado con atrazina presentaron un control cercano al 50% sobre la arvense, a los 44 d. Las especies dominantes fueron *Senna tora* y *Ballota nigra* y la familia dominante fue fabácea. Los HB no afectaron de forma negativa el crecimiento del maíz. Los HB combinados entre sí y con atrazina tuvieron un control de 50.0% sobre la maleza a los 44 d.

**Palabras clave:** *Metopium brownei*, *Viguiera dentata*, herbicida botánico, atrazina, maleza, maíz.

## 8.2. Introducción

El uso recurrente de herbicidas sintéticos como principal forma de control de arvenses provoca resistencia, lo que implica que los agricultores deban realizar un aumento constante de las dosis de aplicación (Khan y Khan, 2015). Se ha comprobado que en EE.UU. en campos de soya tratados constantemente con glifosato (N-(fosfometil) glicina) las arvenses como *Sorghum halepense* han adquirido resistencia a este herbicida (Johnson *et al.*, 2014). De igual forma los herbicidas una vez que se aplican pueden contaminar cuerpos de agua causando daños a especies no objetivas, por otro lado en el suelo por sus características xenobióticas, impiden la proliferación de algunos microorganismos benéficos, como los fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo (Mahmood *et al.*, 2015).

Situaciones de este tipo conducen a la necesidad de generar nuevas tecnologías agrícolas y sustentables para disminuir o evitar usar compuestos sintéticos (herbicidas) para permitir cuidar el medio ambiente.

La alelopatía, es una característica de las plantas que puede estimular o inhibir el crecimiento de arvenses, a través de la liberación de metabolitos secundarios. El extracto de planta que libera metabolitos secundarios son un sustituto adecuado de herbicidas sintéticos porque son menos residuales y tóxicos en el medio ambiente (Cheng y Cheng, 2015). Los metabolitos secundarios han tomado importancia comercial e industrial porque proporcionan nuevos modelos para el desarrollo de productos biodegradables como bioplaguecidas (Edriss *et al.*, 2012). Benvenuti *et al.* (2017) y Anaya *et al.* (1999) probaron la respuesta alelopática de metabolitos secundarios de algunas plantas (*Metopium brownei*, *Artemisia annua* y *Xanthium strumarium*) que se pueden aplicar como potenciales herbicidas botánicos en cultivos.

Sin embargo, los productos alelopáticos no pueden ofrecer los resultados óptimos para el control de arvenses en comparación con herbicidas sintéticos, ya que el efecto alelopático es de umbral bajo y transitorio (Zhou *et al.* 2013; Cerda *et al.* 2019). Es por eso que la combinación de extractos de plantas (herbicida botánico) y herbicidas sintéticos es una opción para control de malezas ya que ofrece un efecto de mayor manejo para las arvenses en comparación con aplicaciones de un herbicida botánico solo (Razzaq *et al.*, 2012; Jabran *et al.*, 2010).

*Metopium brownei* (chechén) y *Viguiera dentata* (tajonal), son dos especies con propiedades alelopáticas, con amplia distribución en la Península de Yucatán. El objetivo de la investigación

fue la caracterización fisicoquímica y análisis de la fitotoxicidad de herbicidas botánicos preparados con extractos acuosos de *M. brownei* y *V. dentata* solos, combinados entre si y combinados con dosis bajas de atrazina (herbicida sintético), para determinar a través de bioensayos *in vitro* y de campo sus efectos fitotóxicos y generar alternativas para el control de malezas de la región.

### 8.3. Materiales y métodos

La investigación de campo se efectuó en la Unidad Experimental rancho "Xamantún" perteneciente al Instituto Tecnológico de Chiná, localizado en el Km 60.0 de la carretera Chiná-Hool, en el estado de Campeche, México latitud: 19°43'10.85"N y altitud: 90°24'55.42"O. En el misma unidad experimental se presentan en abundancia las especies de *Viguiera dentata* y *Metopium brownei*.

El experimento se realizó en dos etapas, la primera etapa fue de febrero a mayo del 2019, en que los extractos se aplicaron directamente al suelo sin cobertura vegetal (sin la presencia de cultivos y a través de la eliminación de malezas de forma manual); y la segunda etapa, de agosto a noviembre del 2019, en que se estudió el efecto de los extractos en el terreno con un cultivo de maíz (con eliminación de malezas de forma manual).

#### 8.3.1. Elaboración de los herbicidas botánicos

Se recolectó hojas de *M. brownei* y *V. dentata*, se almacenaron en bolsas de plástico; se cortaron en secciones de aproximadamente 5.0 cm por lado, para depositarlas en un contenedor de 40.0 L de capacidad, al cual se le agregaron tres partes de agua corriente por cada parte de material vegetal (v/v).

Se evaluaron 12 tratamientos de mezclas de *M. brownei* y *V. dentata* con atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-triazina-2,4-diamina) (Cuadro 5).

La relación de los tratamientos se calculó con base en las concentraciones en la que se observó efecto inhibitorio de la germinación y desarrollo inicial de plántulas en *Raphanus sativus* (rábano) y *Lactuca sativa* (lechuga) en condiciones controladas, como en un estudio en que los herbicidas botánicos se elaboraran de forma similar (Farooq *et al.*, 2018).

La mezcla reposó 24 h a temperatura controlada (18 °C). Después, el extracto resultante, se filtró utilizando dos capas de gasa de algodón colocadas sobre un embudo de plástico.

La atrazina se aplicó con base en las dosis recomendadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1996) dosis mínima 1.0 kg ha<sup>-1</sup> y máxima 2.0 kg ha<sup>-1</sup>.

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos utilizados para la evaluación del control de arvense. La masa indicada se disolvió en un litro de agua corriente

		Atrazina (g)	<i>M. brownei</i> (g)	<i>V.dentata</i> (g)
T1	100% agua	0.00	0.00	0.00
T2	100% MB	0.00	333.00	0.00
T3	100% VD	0.00	0.00	333.0
T4	1:1 MB:VD	0.00	166.50	166.5
T5	3:1 MB:AZ (min)	0.67	249.75	0.00
T6	3:1 VD:AZ (min)	0.67	0.00	249.75
T7	100% AZ (max)	5.40	0.00	0.00
T8	100% AZ (min)	2.70	0.00	0.00
T9	3:1 MB:AZ (max)	1.35	249.75	0.00
T10	3:1 VD:AZ (max)	1.35	0.00	249.75
T11	1/3 AZ (max)	1.35	0.00	0.00
T12	1/3 AZ (min)	0.67	0.00	0.00

MB: Extracto preparado a base de *Metopium brownei*; VD: Extracto preparado a base de *Viguiera dentata*; AZ (min): AZ a la concentración mínima recomendada (1.0 kg ha<sup>-1</sup>); AZ (max): AZ en la concentración máxima recomendada (2.0 kg ha<sup>-1</sup>).

### 8.3.2. Tamizaje fitoquímico de herbicidas botánicos

Se realizó un tamizaje fitoquímico de herbicidas botánicos de *M. brownei* y *V. dentata* para la determinación de metabolitos secundarios cualitativamente descritas por Rufai (2016) para: 1) cumarinas; 2) flavonoides; 3) glicosídicos; 4) quinonas; 5) saponinas; 6) xantonas. Los metabolitos se analizaron el primer día y el tercer día para observar si en ese periodo de tiempo los herbicidas botánicos perdían concentración de metabolitos secundarios después de su elaboración. Los herbicidas se almacenaron en frascos de vidrio de 1 l de capacidad, sellados herméticamente, protegidos de la luz utilizando papel de aluminio, y conservados a 18 °C.

### 8.3.3. Fitotoxicidad de los herbicidas botánicos sobre semillas de *Zea mays* (maíz)

El experimento se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal LABCONCO® (Missouri, EE.UU.) modelo 37400-00 en las condiciones de fotoperiodo de 12.0 h de luz, temperatura de 25

a 28 °C. Los tratamientos que se evaluaron son los mismos que se describieron en la sección de la primera etapa (Cuadro 5), se emplearon tres repeticiones con cinco semillas en cada caja Petri de 10.0 cm de diámetro, colocadas sobre un papel filtro con 3.0 ml de la solución correspondiente a cada tratamiento. Las semillas se regaron diariamente durante los 10 días que se mantuvo el experimento.

#### **8.3.4. Evaluación de los herbicidas**

El sitio experimental fue de una superficie de 2160 m<sup>2</sup> fue dividido en 12 parcelas de 9.0 x 5.0 m, con 1.0 m de separación entre cada una. Para la evaluación porcentual de la cobertura vegetal ocupada por la malezas, cada parcela fue subdividida en 27 cuadrantes que constaban de 1.0 x 1.0 m.

La aplicación sobre la superficie del suelo se realizó utilizando una bomba de aspersión con rociador manual de mochila equipado con boquilla. Posteriormente los efectos sobre el control de las malezas se midió en cada uno de los tratamientos cualitativamente con un método visual (0 – 100%), Frans *et al.* (1986) citado por Raper *et al.* (2019). Evaluando el porcentaje de cobertura vegetal de herbicidas botánicos solos o combinados con atrazina en las parcelas experimentales en ausencia de cultivo.

##### **8.3.4.1. Procedimiento de evaluación de los herbicidas botánicos y atrazina en campo**

La aplicación de los tratamientos en la primera etapa se realizó en tres ocasiones (8 y 20 de febrero y 4 de abril del 2019), en las dosis indicadas para cada tratamiento (Cuadro 5).

La evaluación visual del porcentaje de cobertura vegetal para el control de malezas se realizó en cuatro muestreos a los 51, 64, 85 y 95 días después de la primera aplicación, en las 12 parcelas experimentales, con la finalidad de comparar el efecto fitotóxico de los herbicidas aplicados sobre las arvenses mediante el cálculo de la cobertura vegetal.

En la determinación de la identificación de especies y familias se llevó a cabo mediante la guía en línea de la CONABIO (2012), la identificación por especies a través de claves dicotómicas y la aplicación de naturalista (naturalista.mx).

### **8.3.5. Evaluación de los herbicidas botánicos y atrazina sobre un terreno cultivado**

#### **8.3.5.1. Siembra del cultivo**

La siembra del maíz se realizó el 12 de agosto del 2019. En cada parcela se sembraron seis surcos, con 1.0 m de separación entre cada uno, 2 semillas en cada orificio de siembra, con una separación de aproximadamente 30.0 cm entre cada orificio, para un total de 72 semillas por tratamiento. La fitotoxicidad de los tratamientos sobre el maíz, se analizó a los 46 días post-siembra, según el porcentaje de germinación por parcela, la altura de las plantas y el número de hojas, utilizando como unidad de muestreo el promedio de 5 plantas seleccionadas de forma aleatoria.

#### **8.3.5.2. Aplicación y valuación de los herbicidas**

La aplicación de los tratamientos en la segunda etapa se realizó en cuatro ocasiones (8, 15, 26 de agosto y 2 de octubre del 2019), en las dosis indicadas para cada tratamiento (Cuadro 5). La segunda evaluación visual del porcentaje de cobertura vegetal se realizó en las parcelas experimentales contando con dos repeticiones para cada uno de los cuatro tratamientos a evaluados.

Los tratamientos usados en la segunda etapa son los cuatro de mejor rendimiento de la primera etapa: T2) 100% MB; T4) 1:1 MB:VD; T6) 3:1 VD:AZ (min); T10) 3:1 VD:AZ (max). De igual forma se aplicó un control y un testigo como la primera etapa: T7) 100% AZ (max); T8) 100% AZ (min); T1) 100% agua.

Para la aplicación de los tratamientos en las dos etapas (sin cultivo y con cultivo) se realizaron entre las 17:00 y 18:00 h para evitar la volatilización, retener y adsorber en el suelo los herbicidas. Antes de cada aplicación de los tratamientos, las parcelas experimentales se prepararon con riego previo para humectar el suelo e impedir que los herbicidas botánicos sean adsorbidos por el suelo y no evite que esté disponible. Las parcelas se regaron dos días a la semana, por dos horas.

El nivel de control de arvenses de herbicidas se determinó de forma visual asignando un porcentaje en cuatro muestreos a los 22, 44, 65 y 73 días después de la primera aplicación y se calculó el porcentaje por especie y familia.

#### **8.3.6. Diseño Experimental**

El efecto fitotóxico sobre las semillas de maíz *in vitro* fue evaluado para cada tratamiento en las variables de germinación, longitud de radícula y longitud de talluelo. Se estimó de forma cualitativa (porcentaje de forma visual) la efectividad de los tratamientos en la etapa sin cultivo (12

tratamientos) y, con cultivo (7 tratamientos) Los datos porcentaje visual se transformaron de forma angular, arco seno. Se evaluó la fitotoxicidad de los tratamientos de la etapa con cultivo sobre las plantas de maíz siendo las variables el porcentaje de germinación, altura de la planta y numero de hojas. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) se utilizó una prueba (Tukey;  $p \leq 0.05$ ) para comparar las medias de los tratamientos con el paquete estadístico Minitab® 17 (Pensilvania, EE.UU).

## 8.4. Resultados y discusión

### 8.4.1. Tamizaje fitoquímico de los herbicidas botánicos

En la prueba M2 (72 h después de su elaboración) los metabolitos secundarios quinonas y xantonas tuvieron una pérdida de concentración pasando de concentración moderada a concentración baja del herbicida botánico de *Metopium brownei* (MB). El resto de metabolitos (cumarinas, flavonoides, glicosídicos, saponinas y taninos) se mantuvo en la misma concentración que en la prueba M1 (24 h después de su elaboración) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Clasificación cualitativa del contenido de los principales metabolitos identificados a través del tamizaje fitoquímico de los herbicidas botánicos.

Metabolitos	M1	M2	V1	V2
Cumarinas	-	-	++	-
Flavonoides	++	++	++	++
Glicosídicos	-	-	-	-
Quinonas	++	+	-	-
Saponinas	-	-	-	-
Taninos	+	+	++	++
Xantonas	++	+	++	-

M1: Herbicida botánico de *Metopium Brownei* (24 h), M2: Herbicida botánico de *Metopium brownei* (72 h), V1: Herbicida botánico de *Viguiera dentata* (24 h), V2: Herbicida botánico de *Viguiera Dentata* (72 h); Alta concentración (+++); concentración moderada (++); baja concentración (+); ausencia (.)

El herbicida botánico de *Viguiera Dentata* (VD) en la prueba V2 (72 h después de su elaboración) perdió concentración de metabolitos, los metabolitos cumarinas y xantonas pasaron de concentración moderada a estar ausentes. El resto de los metabolitos de la prueba V2 permaneció con las mismas concentraciones de la prueba V1 (24 h después de su elaboración) durante el tiempo experimental (Cuadro 6).

En condiciones controladas de radiación solar, temperatura (20 °C) y con los frascos sellados la estabilidad de los metabolitos secundarios presentes en los 2 herbicidas botánicos sufrieron cambios en la concentración a las 72 h. Sin embargo, la disminución en la concentración pudo deberse a que la temperatura de almacenamiento no fue adecuada para los herbicidas botánicos.

Cork y Krockenberger (1991) evaluaron las condiciones óptimas para el almacenamiento de taninos y otros fenólicos (metabolitos secundarios) del follaje de árboles, se comprobó que las condiciones óptimas de almacenamiento del extracto fueron a temperatura de 4 °C y con luz solar indirecta, comparado con las condiciones de almacenamiento en temperatura ambiente.

Otro factor que pudo influir en el cambio de concentración de los metabolitos secundarios fue el método de extracción. Cortés-Rojas *et al.* (2016) estudiaron la estabilidad fisicoquímica de una composición secada por atomización optimizada a partir de un extracto de *Bidens pilosa* (planta medicinal), los autores concluyeron que el secado por pulverización es un método efectivo para almacenamiento en sobres sellados de un periodo de aproximadamente 1 año en condiciones de temperatura de 14 – 25 °C.

#### 8.4.2. Análisis fitotóxico *in vitro* de maíz (*Zea mays*)

Se evaluó con un bioensayo el efecto fitotóxico *in vitro* en semillas de maíz de los tratamientos de la primera etapa. Los resultados en el porcentaje de germinación de semillas de maíz no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Figura 1).

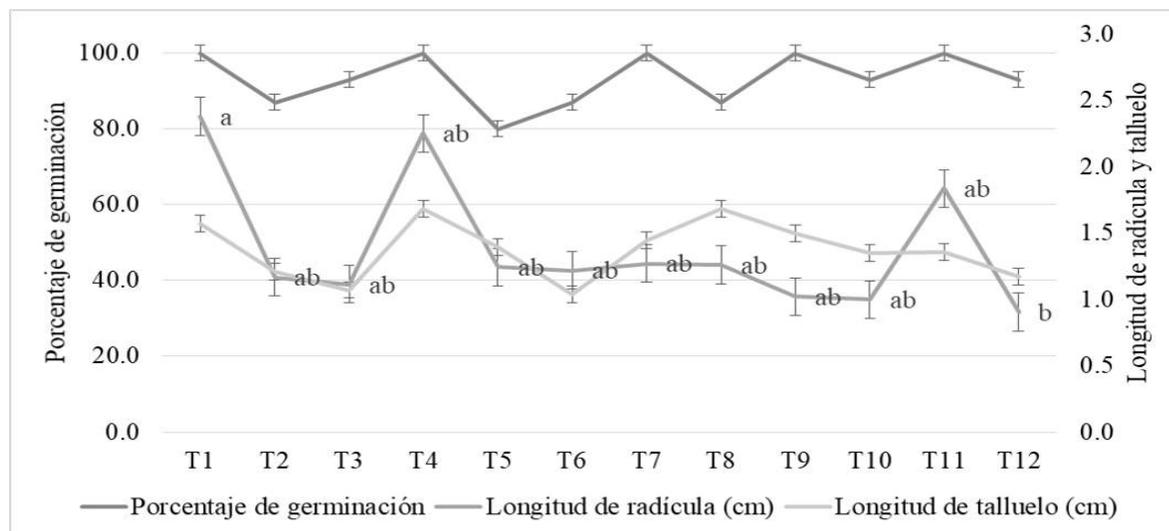


Figura 1. Porcentaje de germinación, longitud de radícula y longitud de talluelo en función de los herbicidas aplicados

Por otro lado, al comparar el efecto de los tratamientos sobre la longitud de radícula, si fueron observadas diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el tratamiento T1 (100% agua) con 2.38 cm y T12 (1/3 AZ min) con 0.90 cm y no se detectaron estadísticas diferentes con relación al tamaño del talluelo ( $p > 0.05$ ) (Figura 1).

Estos resultados del cultivo de maíz indican que no es afectado en su germinación por los herbicidas botánicos, pero podría afectar de forma negativa el crecimiento de la radícula porque en comparación con el tratamiento T1 (100% agua) el resto de los tratamientos, a excepción del tratamiento T4 (1:1 MB:VD), registraron aproximadamente menos del 40.0% de longitud de radícula.

### 8.4.3. Evaluación de los herbicidas botánicos en suelo sin vegetación

Las familias poáceae y fabáceae fueron las de mayor abundancia en todos los tratamientos, las especies dominantes en las parcelas experimentales fueron las siguientes: *Digitaria ischaemum*, *Senna tora* y *Sorghum halapense*.

En relación con el porcentaje de cobertura vegetal, en el análisis estadístico de los cuatro muestreos se encontraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ): M1, M2, M3 y M4 a los 51, 64, 85 y 95 días respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de cobertura vegetal en función del herbicida: Etapa 1

Tratamientos	Relación entre herbicidas	M1	M2	M3	M4
T1	100% agua	29.3 ± 2.46 abc	29.2 ± 2.13 a	30.3 ± 1.88 a	28.5 ± 2.14 cdef
T2	100% MB	21.4 ± 1.54 b	24.7 ± 1.36 abcd	23.7 ± 1.35 abc	22.8 ± 1.50 efg
T3	100% VD	22.2 ± 2.33 b	24.8 ± 2.23 abcd	25.3 ± 2.26 ab	38.2 ± 2.27 ab
T4	1:1 MB:VD	20.4 ± 1.79 cde	20.7 ± 1.76 cd	19.4 ± 2.11 bcd	21.1 ± 1.76 fg
T5	3:1 MB:AZ (min)	30.1 ± 1.75 ab	31.1 ± 1.75 a	31.7 ± 1.81 a	30.1 ± 1.75 bcde
T6	3:1 VD:AZ (min)	20.9 ± 2.74 cde	19.4 ± 1.37 d	14.0 ± 0.50 d	18.3 ± 1.14 g
T7	100% AZ (max)	33.5 ± 2.70 a	24.9 ± 2.85 abcd	26.3 ± 2.09 ab	32.3 ± 2.68 abcd
T8	100% AZ (min)	27.4 ± 1.85 abcd	28.5 ± 1.78 abc	21.2 ± 1.44 bcd	39.2 ± 2.09 a
T9	3:1 MB:AZ (max)	19.4 ± 1.39 de	24.1 ± 1.80 abcd	24.2 ± 2.01 abc	31.1 ± 2.10 abcde
T10	3:1 VD:AZ (max)	21.6 ± 1.27 b	22.8 ± 1.31 bcd	22.0 ± 1.25 bcd	22.9 ± 1.30 efg
T11	1/3 AZ (max)	26.4 ± 1.82 abcde	24.8 ± 1.40 abcd	19.4 ± 1.10 bcd	36.3 ± 1.41 abc
T12	1/3 AZ (min)	17.6 ± 1.11 e	18.0 ± 1.11 d	17.1 ± 2.34 cd	26 ± 0.88 defg

\*Medias con la misma literal no son estadísticamente diferentes. Los valores son promedios ± EE (prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad).

El análisis estadístico demostró que en el M4 a los 95 d los tratamientos T2 (100% MB), T4 (1:1 MB:VD), T6 (3:1 VD:AZ min) y T10 (3:1 VD:AZ max) resultaron los de mejor eficiencia en el control de arvenses con porcentajes de cobertura vegetal de 22.8, 21.1, 18.3 y 22.9% (Cuadro 7).

El efecto del tratamiento T2 (100% MB) se pudo deber al efecto de la molécula urushiol combinado con los flavonoides que se encuentra en las hojas de *M. brownei*, en este sentido, Anaya *et al.* (1999) reportaron que el extracto de *M. brownei* tiene efectos fitotóxicos sobre las arvenses *Echinochloa crus-galli* y *Amaranthus hypochondriacus*.

En los tratamientos T6 (3:1 VD:AZ min) y T10 (3:1 VD:AZ max) se encontró que tenían diferencias significativas en el control de malezas con respecto a los tratamientos T3 (100% VD), T11 (1/3 AZ max) y T12 (1/3 AZ min) (Cuadro 7). La respuesta de control de malezas se pudo deber a un efecto sinérgico entre los componentes del herbicida atrazina y herbicida botánico de *V. dentata* (Farooq *et al.* 2018; Farooq *et al.* 2014; Razzaq *et al.* 2012; Jabran *et al.*, 2010).

En el análisis estadístico, el tratamiento T4 (1:1 MB:VD) tuvo diferencias significativas con el tratamiento T2 (100% MB) y T3 (100% VD). El tratamiento T4 (1:1 MB:VD) tuvo un efecto inhibitor 21.0% mayor en las arvenses en comparación con los tratamientos T2 (100% MB) y T3 (100% VD) con 36.1 y 22.8% esto se pudo deber a la sinergia entre los metabolitos secundarios de los dos herbicidas botánicos (*M. brownei* y *V. dentata*) (Majeed y Muhammad, 2018; Benvenuti *et al.*, 2017).

Se observó que los tratamientos T2 (100% MB), T4 (1:1 MB:VD), T6 (3:1 VD:AZ min) y T10 (3:1 VD:AZ max) fueron diferentes en el control de atrazina en sus dosis puras T7 (100% AZ max) y T8 (100% AZ min), eso significa que los tratamientos T2 (100% MB), T4 (1:1 MB:VD), T6 (3:1 VD:AZ min) y T10 (3:1 VD:AZ max) controlaron mejor las arvenses (Cuadro 7). No obstante, esto se pudo deber a la influencia de las condiciones climatológicas como el calor y temperatura que afectaron el efecto de los tratamientos, se ha reportado que algunos plaguicidas de origen vegetal tienen periodos de vida cortos en condiciones de campo (Cavoski *et al.*, 2007; Cleveland *et al.*, 2002; Stark y Walter, 1995). Los muestreos (M1 - M4) en todos los tratamientos no superaron el 40.0% de cobertura vegetal y entre todos los tratamientos las diferencias del porcentaje de cobertura vegetal fueron de entre el 10.0 y 15.0%. Esta situación se puede atribuir a dos factores externos que pudieron intervenir en el porcentaje reducido de cobertura vegetal encontrado en las parcelas experimentales: (I) las altas temperaturas de Campeche (30 a 35 °C) que pudieron degradar

algunos de los tratamientos (incluida atrazina), y (II) las lluvias escasas que se reportan en esa temporada que no permite desarrollar a las arvenses con facilidad (WheatherSpark, 2018).

Abouziena *et al.* (2014) Por otro lado las malezas anuales usan hasta tres veces mayor cantidad de agua para producir 0.5 kg de materia seca en comparación con los cultivos como maíz; de la misma forma el aumento de densidad de las malezas está relacionada directamente con la cantidad de agua disponible del suelo, debido a que a menor cantidad de agua menor densidad de malezas lo que provoca escasa cantidad de cobertura vegetal.

#### 8.4.4. Evaluación de los herbicidas botánicos con un cultivo de maíz

La familia fabácea fue la de mayor abundancia en todos los tratamientos, las especies dominantes en las parcelas experimentales fueron: *Senna tora* y *Ballota nigra*.

A través del análisis estadístico de los datos obtenidos en la cobertura vegetal se comprobó que los muestreos M1, M2, M3 y M4 a los 22, 44, 65 y 73 d eran estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 8).

El tratamiento T1 (AZ 100% max) tuvo diferencias significativas en los cuatro muestreos (M1 y M4) por lo que fue el más efectivos en el control de maleza (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de cobertura vegetal en función del herbicida: Etapa 2

Tratamientos	Relación entre herbicidas	M1	M2	M3	M4
T1	100% AZ (max)	14.3 ± 0.91 d	20.2 ± 1.67 d	26.1 ± 2.27 d	23.0 ± 2.08 d
T2	100% AZ (min)	31.7 ± 2.02 ab	19.6 ± 1.88 d	48.2 ± 3.55 c	29.0 ± 3.17 d
T3	3:1 VD:AZ (max)	22.2 ± 1.23 c	41.7 ± 2.02 c	36.3 ± 2.22 d	45.0 ± 2.13 c
T4	3:1 VD:AZ (min)	26.5 ± 1.29 bc	54.4 ± 1.75 b	50.5 ± 1.56 c	45.9 ± 2.47 c
T5	1:1 MB:VD	36.9 ± 1.61 a	45.7 ± 2.16 bc	69.9 ± 2.25 a	59.3 ± 2.36 b
T6	100% MB	32.9 ± 1.13 a	63.7 ± 2.82 a	77.4 ± 2.03 ab	68.9 ± 2.00 a
T7	100% agua	36.6 ± 1.51 a	71.5 ± 2.13 a	69.9 ± 2.10 b	69.3 ± 2.08 a

\*Medias con la misma literal no son estadísticamente diferentes. Los valores son promedios ± EE (prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad).

Por otro lado se pudo observar que en los muestreos M2, M3 y M4 en los tratamientos T3 (3:1 VD:AZ max) T4 (3:1 VD:AZ min) y T5 (1:1 MB:VD) tuvieron porcentajes menores al 55.0% de cobertura vegetal, y tuvieron diferencias estadísticas en los tratamientos T6 (100% MB) y T7 (100% agua) (Cuadro 8). En el porcentaje de cobertura vegetal de entre los tratamientos T3 (3:1 VD:AZ max), T4 (3:1 VD:AZ min) y T5 (1:1 MB:VD) que contenían herbicidas botánicos y atrazina en los M2, M3 y M4 el tratamiento T3 (3:1 VD:AZ max) tuvo diferencias significativas y controló de forma eficiente las arvenses.

Se encontró que los tratamientos T3 (3:1 VD:AZ max) y T4 (3:1 VD:AZ min) en el M3 y M4 controlaron las arvenses con porcentajes de cobertura vegetal menor al 50.0% y diferentes estadísticamente que los tratamientos T5 (1:1 MB:VD), T6 (100% MB) y T7 (100% agua) (Cuadro 8). Sin embargo, los tratamientos T3 (3:1 VD:AZ max) y T4 (3:1 VD:AZ min) no tuvieron un mayor control que los tratamientos T1 (AZ 100% max) y T2 (100% AZ min) en el muestreo M3 y M4 (Cuadro 8).

En el T3 (3:1 VD:AZ max) y T4 (3:1 VD:AZ min) pudo presentar una sinergia debido a la interacción entre los componentes químicos de la atrazina, que podrían tener una acción de apoyo en su efectividad con los herbicidas botánicos que afectó negativamente el crecimiento de las diferentes especies de arvenses. Algunos investigadores también han informado que la combinación extractos alelopáticos combinados con herbicidas sintéticos son una herramienta útil en el manejo de arvenses (Razzaq *et al.*, 2012; Farooq *et al.*, 2018).

Razzaq *et al.* (2012) comprobaron que la combinación de extractos a base de agua de girasol combinado con cultivo alelopático de sorgo en dosis de 18 l ha<sup>-1</sup>, añadiendo dosis reducidas (70.0%) de mesosulfuron (Ácido 2 - [(4,6-dimetoxipirimidin-2-il) carbamoilsulfamoil] -4-(metanosulfonamidometil) benzoico) + iodosulfuron (Ácido 4-yodo-2- [(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il) carbamoilsulfamoil] benzoico) (Atlantis 12 EC) a 36 g as ha<sup>-1</sup>, metribuzina (4-amino-6-terc-butil-3-metilsulfanil-1,2,3-triazin-5-ona) + fenoxaprop (Ácido 2-[4-[(6 cloro-1,3-benzoxazol-2-il) oxi] fenoxi] propanoico) (Bullet 38 SC) a 57.0 g as ha<sup>-1</sup>, y mesosulfuron + iodosulfuron (Atlantis 3.6 WG) a 4.3 g as ha<sup>-1</sup>, redujeron el peso seco total de malezas en un 93.0, 92.0 y 90.0%, respectivamente, sobre el control de arvenses.

Farooq *et al.* (2018) evaluaron extractos de *sorghum* y plantas del género *brassicca* (16 l ha<sup>-1</sup>) combinado con dos herbicidas sintéticos: Pendimetalina (3,4-dimetil-2,6-dinitro- N -pentan -3-

ilanilina) y S-Metacloro (2-cloro- N – (2 etil-6-metilfenil) – N – [(2 S) – 1 –metoxipropan-2-il] acetamida) (0.41 kg a.i. ha<sup>-1</sup>) los resultados observados fueron del mismo nivel de reducción de malezas y mejoramiento de cultivos que con aplicaciones de herbicidas sintéticos.

El T5 (1:1 MB:VD) tuvo diferencias significativas con el tratamiento T4 (3:1 VD:AZ min) y mejor control en el porcentaje de cobertura vegetal de 45.7 y 54.4% respectivamente en el M2. El resultado indica que pudo deberse a la asociación de los dos herbicidas botánicos que contienen diferentes metabolitos se pudo complementar en cada uno de los dos herbicidas botánicos y aumentar su efecto de *M. brownei* de forma que aporó quinonas y xantonas a la disolución y *V. dentata* contribuyó con cumarinas y causar efectos negativos en determinada arvense. Algunos investigadores han informado que los extractos alelopáticos se pueden aplicar para manejar arvenses. Sin embargo, se ha probado solo *in vitro* (Anaya *et al.*, 1999; Benvenuti *et al.*, 2017).

En el tratamiento T6 (100% MB), se observó 32.9% de cobertura vegetal en el M1 a los 22 días pero a partir del M2 el porcentaje se incrementó hasta el 63.7% de cobertura vegetal y se mantendría entre el 60.0 y 80.0% de cobertura vegetal hasta el M4 (Cuadro 8). El efecto transitorio del tratamiento T6 (100% MB) pudo deberse al efecto degradador del medio ambiente en los herbicidas botánicos. Hay autores que atribuyen el efecto transitorio de los productos como herbicidas botánicos debido a la acción de las condiciones ambientales (por ejemplo: luz, calor y microorganismos) (Cerdeña *et al.* 2019; Zhou *et al.* 2013; Barrek *et al.*, 2004).

Cerdeña *et al.* (2019) evaluaron la actividad de insecticidas botánicos de cuatro especies de plantas (*Xanthosoma purpuratum*, *Clibadium sp.*, *Witheringia solanácea L'Hér* y *Dieffenbachia costata*) de la Amazonía ecuatoriana en condiciones de campo. Los autores observaron que los insecticidas botánicos tuvieron un efecto inhibitor en los insectos en los 5 primeros días sin embargo el día 7 y 15 después de la aplicación los efectos de los insecticidas botánicos fue igual al testigo. Los autores atribuyen este efecto transitorio a las condiciones ambientales (calor y temperatura). De la misma forma Zhou *et al.* (2013) demostraron que el insecticida botánico rotenona (que es extraído de *Lonchocarpus utilis*, contiene rotenoides e isoflavonoides) al ser aplicado en condiciones de campo tenía una vida media (DT<sub>50</sub>) de 2 a 3 días.

#### 8.4.4.1. Análisis fitotóxico de los herbicidas botánicos sobre el desarrollo de *Zea mays* en campo

El porcentaje de germinación, el número de hojas y altura del maíz fueron estadísticamente diferentes en todos los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 2).

Los tratamientos T5 (1:1 MB:VD), T6 (100% MB) y T7 (100% agua) son estadísticamente diferentes en el porcentaje de germinación que el resto de tratamientos sin embargo, el porcentaje de germinación fue del 100% en el T5 (1:1 MB:VD) y T6 (100% MB) en comparación con el tratamiento T7 (100% agua) con 85%. Los tratamientos T5 (1:1 MB:VD) y T6 (100% MB) con 64.9 y 67.4 cm fueron diferentes estadísticamente en la altura de la planta que el resto de los tratamientos. El promedio de hojas del tratamiento T6 (100% MB), fue significativamente diferente que el resto de tratamientos y promedió 11 hojas por planta siendo el de mayor numero (Figura 2).

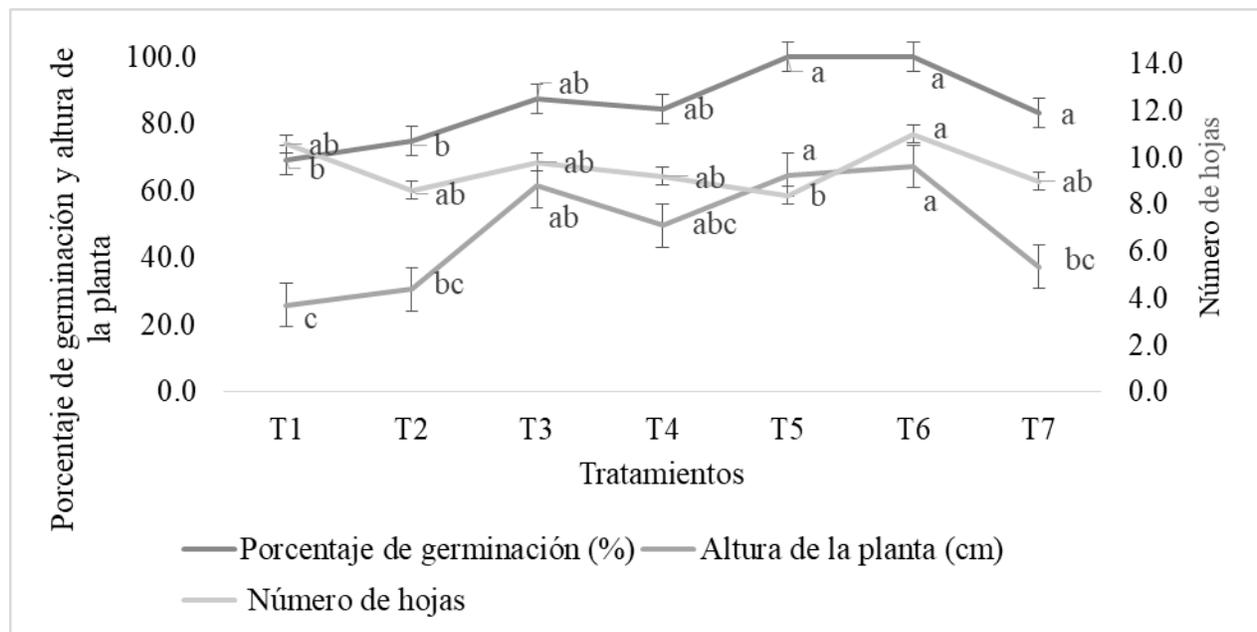


Figura 2. Porcentaje de germinación, altura de la planta y número de hojas en maíz en función del tipo de herbicida aplicado

Los resultados indican que algunos metabolitos secundarios de los herbicidas botánicos tienen efectos alelopáticos que son positivos sobre el crecimiento del maíz. Farooq *et al.* (2014) reportaron que el efecto alelopático de tabaco, en un cultivo de maíz después de establecer cultivos de *Nicotiana tabacum* y con aplicaciones externas, mejoró la emergencia de hojas, altura de la planta y tasa de crecimiento de un cultivo de maíz.

Las deducciones observadas a los 47 días después de realizar la siembra demostraron que la atrazina en dosis máxima fue la que causó mayor efecto negativo de entre todos los tratamientos sobre el crecimiento de las plantas de maíz, en 2 variables (germinación y altura del maíz) (Figura 2). El tratamiento T5 (1:1 MB:VD) fue el menor estadísticamente y promedio el menor número de hojas por planta.

## **8.5. Conclusiones**

A pesar de que los herbicidas botánicos (*Metopium. brownei* y *Viguiera. dentata*) pierden concentración de metabolitos secundarios cuando están expuestos a condiciones ambientales al pasar 72 horas, se comprobó que el uso de herbicidas botánicos combinados entre si y combinados con dosis reducidas de atrazina pueden disminuir la población de arvenses hasta en un 50% a los 50 primeros días de su aplicación, de la misma forma se pueden realizar aplicaciones de herbicidas botánicos antes y durante la siembra del maíz sin tener efectos negativos en la altura y porcentaje de germinación. Estos resultados proporcionan una opción efectiva del uso combinado de herbicidas botánicos con un herbicida sintético y podrían ser incluidos como herramienta del Manejo Integrado de Plagas (MIP) de forma que proporciona seguridad alimentaria y disminuye la posibilidad de resistencia de las malezas.

### **Agradecimientos**

Agradecemos al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el financiamiento del proyecto (Clave: 6380.19).

## 8.6. Literatura citada

- Abouziena H., M. El-Saeid, A. Ahmed, and E.S. Amin. (2014). Water loss by weeds: A review. *International Journal ChemTech. Resesearch* 7:323-336.
- Anaya A.L., Mata R., Rivero-Cruz F., Hernández-Bautista B.E., Chávez-Velasco D., Gómez-Pompa A. (1999) Allelochemical potential of *Metopium brownei*. *Journal of Chemical Ecology* 25:141-156.
- Barrek S., O. Paisse, M.F. Grenier-Loustalot (2004). Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:753-63.
- Benvenuti S., P.L. Cioni, G. Flamini, and A. Pardossi. (2017). Weeds for weed control: Asteraceae essential oils as natural herbicides. *Weed Research* 57:342-353.
- Bianchi M.A., N.G. Fleck, e F. P. Lamego. (2006). Proporção entre plantas de soja e plantas competidoras e as relações de interferência mútua. *Ciência Rural* 36:1380-1387.
- Cavoski I., P. Caboni, G. Sarais, P. Cabras, T. Miano. (2007). Photodegradation of rotenone in soils under environmental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7069-74.
- Cerda H., C. Carpio, C. Ledezma-Carrizales, S. Jessica, L. Ramos, C. Muños-Shuguli, M. Andino, and M. Chiurato. (2019). Effect of aqueous extracts from Amazon plants on *plutella xylostella* (lepidoptera: plutellidae) and *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae) in laboratory, semifield and field trials. *Journal of Insect Science* 19:1-9.
- Cheng F., Z. Cheng. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science* 6:1020-1020.
- CONABIO. (2012). Malezas de México. Recuperado de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>.
- Cork S.J., and A.K. Krockenberger. (1991). Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. *Journal of Chemical Ecology* 17:123-134.

- Cortés-Rojas D.F., C.R. Souza, and W.P. Oliveira. (2016). Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences* 28:141-146.
- Edriss A., Z. Alabjar, A. Satti. (2012). Phytochemical screening of important secondary metabolites in some extracts of two Sudanese plants. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology* 1:199-202.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (1996). Recuperado de: <http://www.fao.org/3/t1147s00.htm#Contents.peter>
- Farooq M., T. Hussain, T. Wakeel, and Z. Cheema. (2014). Differential response of maize and mungbean to tobacco allelopathy. *Experimental Agriculture* 50:611-624.
- Farooq O., Atique-Ur-Rehman, N. Sarwar, M. Hussain, A. Wasaya, M. Naeem, M.M. Iqbal, A. Khaliq. 2018. Herbicidal potential of *Sorghum* and *Brassica* against the weeds of cotton. *Planta Daninha* 36: 1-6.
- Jabran K., Z. Cheema, M. Farooq, M. Hussain (2010). Lower doses of pendimethal in mixed with allelopathic crop water extracts for weed management in canola (*Brassica napus*). *International Journal of Agriculture and Biology* 3:335-340.
- Johnson D., J. Norsworthy, and R. Scott. (2014). Distribution of herbicide-resistant Johnson grass (*Sorghum halepense*) in Arkansas. *Weed Technology* 28:111-121.
- Khan I., y M. I. Khan. 2015. Técnicas ecológicas de control de malezas (extracto alelopático) en el cultivo de trigo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:1307-1316.
- Mahmood I., S. Imadi, K. Shazadi, A. Gul, K. Hakeem. (2015). Effects of pesticides on environment, plant, soil and microbes: Vol. 1 Implications in Crop Science, Springer Internationa. pp. 254-266.
- Majeed A., Z. Muhammad. (2018). Allelopathic Effects of two Asteraceae Weeds (*Artemisia annua* and *Taraxicum officinalis*) on Germination of Maize and Wheat. *PSM Biological Research* 3:44-47.
- Raper T.B., M.A. McClure, S. Butler, X. Yin, R. Blair. (2019). Impacts of single- and a multiple-species cover crop on soybean relative to the wheat–soybean double crop system. *Crop, Forage & Turfgrass Management* 5:180104.

- Razzaq A., Z.A. Cheema, K. Jabran, M. Hussain, M. Farooq, M. Zafar. (2012). Reduced herbicide doses used together with allelopathic sorghum and sunflower water extracts for weed control in wheat. *Journal of Plant Protection Research* 52:281-285..
- Rufai Y. (2016). Comparative phyto-constituents analysis from the root bark and root core extractives of cassia ferruginea (Schrad D. C). *Plant. Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences* 3:275-283.
- Stark J.D., J.F.Walter. (1995). Persistence of Azadirachtin A and B in soil: Effects of temperature and microbial activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 30:685-698.
- WheatherSpark. (2018). Recuperado el 24 de junio de 2020. Recuperado de: <https://es.weatherspark.com/y/11740/Clima-promedio-en-Campeche-M%C3%A9xico-durante-todo-el-a%C3%B1o>.
- Zhou Y., N. Zhang, K. Wang, W. Li, H. Li, and Z. Zhang. (2013). Dissipation and residue of rotenone in cabbage and soil under field conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:251-5.

## 8.7. Acuse de recibido de la revista Agrociencia

De: Sergio S. González Muñoz <[sergio.gonzalez@agrociencia-colpos.mx](mailto:sergio.gonzalez@agrociencia-colpos.mx)>

Enviado: miércoles, 24 de junio de 2020 10:51

Para: norma laura rodríguez avila <[norma.ra@china.tecnim.mx](mailto:norma.ra@china.tecnim.mx)>

Asunto: [agrociencia] Acuse de recibo del envío

Norma Laura Rodríguez,

Gracias por enviar el manuscrito "Evaluación del efecto fitotóxico de dos potenciales herbicidas a base de *Metoplum brownei* (Chechén) y *Vigüera dentata* (Tajonal)" a Agrociencia. Con el sistema de gestión de publicaciones en línea que utilizamos podrá seguir el progreso a través del proceso editorial tras iniciar sesión en el sitio web de la publicación:

URL del manuscrito: <http://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/authorDashboard/submission/2038>

Nombre de usuario/a: normargz

Si tiene alguna duda puede ponerse en contacto conmigo. Gracias por elegir esta editorial para mostrar su investigación.

Sergio S. González Muñoz

---

(\$journalName) <http://localhost/sagro/index.php/agrociencia>

---

 [López-Vadillo et al 2020.docx](#)  
290K [Ver como HTML](#) [Descargar](#)

## 9. Conclusiones finales

Se necesita ampliar la investigación de la eficacia y efectos de bioplaguicidas en el suelo debido a que no hay la suficiente información y la cantidad de bioplaguicidas investigada es reducida en 4 (rotenona, spinosad, azadirectina y *Bacillus thuringiensis*).

Hay evidencia de que los bioplaguicidas investigados en la presente revisión no producen efectos secundarios negativos en el suelo debido a que su periodo de degradación es muy corto, y presenta solo efectos negativos en especies objetivas. Sin embargo, en cada caso particular de cada bioplaguicida, se sugiere indagar más en la investigación, ya que cada compuesto podría sugerir resultado diferentes para los organismos que conforman al suelo y el destino final de los compuestos secundarios.

Asimismo se encontró que las técnicas analíticas avanzadas como UHPLC y QuEChERS permiten analizar compuestos de degradación rápida como los bioplaguicidas. También, estos analizadores permiten realizar análisis en periodos de tiempo cortos. Por ejemplo: QuEChERS permite extracciones simples y de alto rendimiento en muestras de suelo y UHPLC reduce el tiempo del análisis en comparación con HPLC lo que permite acelerar los análisis.

Por su parte la investigación realizada en campo del efecto de los herbicidas botánicos a base de *Metopium. brownei* y *Viguiera. Dentata* dejó evidencia de que estos compuestos se presentan como una opción en el manejo de arvenses. Estos dos herbicidas botánicos combinados entre si y combinados con dosis reducidas del herbicida atrazina redujeron en 50% la población de arvenses en los primeros 50 días de aplicación. Estos resultados permiten que los herbicidas botánicos se incluyan como potencial herramienta en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) de forma que proporciona seguridad alimentaria y disminuyan la posibilidad de resistencia de las malezas.