



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

**CORRECTORES BIODEGRADABLES DE
CARENCIAS DE Ca Y MICRONUTRIENTES:
DETERMINACIÓN DEL ELEMENTO
COMPLEJADO, REACTIVIDAD Y
EFECTIVIDAD.**

Memoria presentada por Dña. María Villén Gómez,
Licenciada en Ciencias Químicas, para optar al grado en
Doctor en Ciencias

Este trabajo se ha financiado gracias a los siguientes proyectos:

- * Determinación de la capacidad complejante de los lignosulfonatos. Influencia de la procedencia y características químicas. Efectividad como fertilizantes. BASF-CURTEX. 2001
- * Determinación de la capacidad complejante y presencia de elementos complejados en productos basados en aminoácidos de hidrólisis enzimática. BIOIBÉRICA. 2001
- * Evaluación y sistematización de los agentes complejantes y nuevos agentes quelantes de micronutrientes para optimizar su eficacia agronómica. M.C.yT. AGL2001:1142. 2001-2004.

Parte de este trabajo se ha presentado en los siguientes congresos:

- * Calcium and micronutrients in the Spanish fertilizer market. Comunicación Oral
Publicación: Fertilizers in context with resource management in agriculture. Proceedings. CIEC Volume II, E. Schnug, J. Nagy, T. Németh, Z. Kovács and Dovényi-Nagy. Eds., pages 433-440. 14th International Symposium of Fertilizers celebrado en Debrecen (Hungría) en junio de 2003.
- * Investigación en métodos de Análisis de Micronutrientes Quelados o Complejados en Fertilizantes. Comunicación Oral.
Publicación: Libro de resúmenes. D.L.: M-32232-2003. Página 683.
XXIX Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química celebrado en Madrid (España) en julio 2003.
- * Potential use of biodegradable chelate N-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid (IDHA/Fe³⁺) as Fe fertiliser. Comunicación Oral.

13th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants celebrado en Montpellier (Francia) en Julio de 2006.

* Evaluación de la aplicación foliar de complejos de Ca y Zn a plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Ashley) desarrolladas en hidroponía. Póster.

XI Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas celebrado en Pamplona (España) en julio de 2006.

Ha sido publicado, o ésta siendo objeto de revisión, en revistas de ámbito internacional bajo los siguientes títulos:

* Villén, M.; Lucena, J. J.; Cartagena, M. C.; Bravo, R.; García-Mina, J. M.; Martín de la Hinojosa, M. I. 2007. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. J. Agric. Food Chem.

* Villén, M., García-Arsuaga, A., Lucena, J. J. 2007. Potential Use of Biodegradable Chelate N-(1,2-Dicarboxyethyl)-D,L-aspartic Acid/ Fe^{3+} as an Fe Fertilizer. J. Agric. Food Chem. 55(2), 402-407.

ABREVIATURAS

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
AMPSO	Ácido N-(1,1-Dimetil-2-hidroxiethyl)-3-amino-2-hidroxiopropanesulfónico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CAPS	Ácido 3-(Ciclohexilamino)-1-propanesulfónico
CEN	European Committee for Standardization
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid],
IDHA	Ácido N-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartico
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
<i>o,o</i> -EDDHA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxifenilacético)
<i>o,p</i> -EDDHA	Ácido etilendiamino N-(<i>o</i> -hidroxifenilacético)-N'-(<i>p</i> -hidroxifenilacético)
<i>p,p</i> -EDDHA	Ácido etilendiamino di(<i>p</i> -hidroxifenilacético)

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Juan José Lucena, por haberme brindado la posibilidad de introducirme en el mundo de la ciencia y por su confianza.

Al Dr Felipe Yunta por su apoyo en la especiación del IDHA y a Iván Frutos y José Antonio Sentis por su participación en los ensayos de invernadero.

A Ana e Irene

A Ángel

A mi familia

ÍNDICE GENERAL

	pág
1. Introducción	1
2. Objetivos	35
3. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents.	39
4. Evaluation of micronutrient and Ca complexes as fertilizers in soil, fertirrigation and foliar applications.	63
5. Potential use of biodegradable chelate n-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid (IDHA/Fe ³⁺) as Fe fertiliser	89
6. IDHA chelates as micronutrient fertilizer in fertirrigation.	107
7. Discusión general	125
8. Conclusiones	151
9. Bibliografía	155
Anexo 1	171
Anexo 2	191
Anexo 3	195

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

	pag
1.1. Tratamiento de las deficiencias de micronutrientes y Ca	3
1.2. Agentes complejantes en la agricultura española	4
1.2.1. Procedencia y características de los agentes complejantes	5
1.2.1.1. Lignosulfonatos	5
1.2.1.2. Sustancias húmicas	10
1.2.1.3. Aminoácidos	16
1.2.1.4. Gluconatos	17
1.2.1.5. Ácidos orgánicos	19
1.2.1.6. Poliflavonoides	20

1. Introducción

1.2.2. Evolución del mercado de agentes complejantes	21
1.2.2.1. Correctores de carencias simples y múltiples	22
1.2.2.2. Contribución de los complejos al mercado de Ca y micronutrientes	23
1.2.2.3. Estado físico y riqueza en el metal	24
1.2.3. Legislación española y europea	24
1.2.4. Métodos analíticos	25
1.3. Agente quelante IDHA	26
1.4. Estabilidad de complejos y quelatos en diferentes condiciones agronómicas	28
1.4.1. Estabilidad en disolución frente al pH	28
1.4.2. Reactividad frente a suelos y materiales edáficos	29
1.4.2.1. Arcillas	30
1.4.2.2. Óxidos e hidróxidos	31
1.4.2.3. Constituyentes orgánicos	32
1.4.2.4. Carbonato cálcico	33
1.4.3. Perdurabilidad	33

En mercado español podemos encontrar productos con quelatos o complejos en su formulación que son empleados como correctores de carencias de micronutrientes y Ca. Los complejos, se presentan como una alternativa biodegradable al igual al nuevo agente quelante IDHA, que ha sido recientemente propuesto para su uso en agricultura. En la legislación tanto española como europea, se establece como se forman los quelatos y complejos y sus usos.

En esta introducción, nos proponemos hacer una revisión de lo que de ellos conocemos.

1.1. Tratamiento de las deficiencias de micronutrientes y Ca.

Cuando un cultivo se desarrolla en condiciones de suelos calizos se favorece la deficiencia de nutrientes como el Fe, Zn y Mn y este bajo aporte para la planta hace que disminuya la producción de fotosintatos (Miller y col., 1984) y de proteínas (Srivastava y Gupta, 1996) necesarios para el crecimiento y desarrollo de la misma, implicando una merma de la producción.

En cuanto a la deficiencia de Ca en ocasiones es causada por una mala distribución de este elemento en planta, debido a que se mueve principalmente por la corriente de transpiración (Marschner, 1995). Su incremento en el suelo puede no ser eficaz, ya que la deficiencia puede incluso ocurrir en suelos calizos.

En la agricultura española, las deficiencias de Ca y micronutrientes pueden ser tratadas empleando sales, quelatos sintéticos o complejos. El uso de quelatos derivados de los ácidos poliaminocarboxílicos es la práctica más común y eficaz para paliar la clorosis férrica y las deficiencias de otros micronutrientes (Álvarez-Fernández y col., 2005), pero su elevado coste hace que sólo se empleen en cultivos de alto valor añadido. En España se estima que el gasto sólo en tratamientos de hierro alcanza cada año cifras superiores a 45 millones de euros (Hernández-Apaolaza y col, 1997). En la cuenca del Ebro se ha estimado en 12 millones de euros al año el gasto que suponen los tratamientos correctores de la clorosis férrica (Sanz y col. 1992). Nos encontramos por tanto con un

1. Introducción

serio problema, ya que muchos cultivos de la zona mediterránea requieren del uso de quelatos, pero el elevado precio de éstos hace que se esté dejando sin tratamiento o con tratamientos poco efectivos a gran cantidad de plantaciones. Por el contrario, los complejos que son productos de menor coste, son empleados en un gran número de cultivos a pesar de su menor eficacia.

Como consecuencia de la gran demanda de soluciones para corregir deficiencias de micronutrientes y Ca, se han planteado nuevas vías que atiendan además la necesidad de una agricultura respetuosa con el medio ambiente. Cada vez es más importante la presencia de los agentes complejantes basados en sustancias que, por lo general, son subproductos de otras industrias, de manera que por un lado proporcionan productos biodegradables para su uso en agricultura y por otro se reduce el problema de tratamiento de residuos.

Siguiendo con la línea de productos biodegradables, recientemente se ha propuesto el uso de un nuevo agente quelante, el IDHA (ácido n-(1,2-dicarboxietil)-D,L-aspartico), también conocido como ácido imidodisuccínico. Aunque se han realizado estudios de su eficacia en aplicaciones foliares (Fernández y col., 2006 y Schlegel y col., 2006), su comportamiento en otras condiciones agronómicas no han sido evaluadas.

En esta introducción trataremos de hacer una breve descripción de los aspectos que se deben tener en cuenta a la hora de estudiar las características químicas y el comportamiento en distintas condiciones agronómicas de los agentes complejantes y del agente quelante IDHA.

1.2. Agentes complejantes en agricultura

Los agentes complejantes normalmente empleados como correctores de carencias de micronutrientes y Ca son los lignosulfonatos, aminoácidos, ácidos orgánicos, gluconatos y humatos.

1.2.1. Procedencia y características de los agentes complejantes

Los lignosulfonatos son subproductos de la industria papelera y los gluconatos se obtienen de la oxidación enzimática (glucosa oxidasa y catalasa) de la glucosa (Lantero y Shetty, 2005). Los extractos de aminoácidos son principalmente obtenidos de la hidrólisis parcial o total de polipéptidos procedentes de residuos animales y los ácidos orgánicos (fenólico, acético y ácidos carboxílicos) provienen de distintas fuentes. A continuación se hace un breve resumen de las características de los distintos productos.

1.2.1.1. *Lignosulfonatos*

La madera está constituida por celulosa, hemicelulosas, ligninas y cantidades menores de otras sustancias que se engloban bajo el nombre genérico de componentes minoritarios.

La lignina es definida como un sistema termoplástico, de polímeros altamente aromáticos que se puede dividir en tres tipos de monómeros básicos procedentes de: 1) de maderas blandas, 2) de maderas duras y 3) de césped, bambú y palma. Muchos de los C están unidos a radicales OH, en los cuales, el comportamiento del H es el mismo que en los grupos carboxílicos de los ácidos orgánicos. Un ejemplo de la unión entre monómeros en la lignina procedente de maderas blandas se ve en la figura 1.1.

En las plantas leñosas, durante el crecimiento, los carbohidratos son sintetizados primero y la formación de la lignina comienza después, de manera que los espacios existentes entre las fibras de celulosa se rellenan gradualmente de carbohidratos lignificados. Este proceso, denominado lignificación, tiene las siguientes funciones: cementa y une las fibras entre sí, aumenta la resistencia de las fibras frente a la rotura física y química y aumenta la rigidez y la fuerza de las paredes celulares.

Se piensa que tras la lignificación, el tejido lignificado no juega un papel activo en la vida de las plantas, sino que sirve como estructura de soporte. Las partes de las

1. Introducción

plantas que no están lignificadas contienen mayor humedad, son blandas y se rompen más fácilmente.

La mayor parte de la lignina se encuentra en la pared celular secundaria asociada a la celulosa y a la hemicelulosa. El contenido de lignina aumenta con la edad de la planta y una gran parte se encuentra en el tejido vascular, probablemente con la intención de endurecerlos y darles mayor resistencia al agua.

La lignina es insoluble en agua y en muchos disolventes orgánicos y posee una elevada resistencia a la descomposición microbiana que la hace acumularse en el suelo. Se cree que, dependiendo de las condiciones, puede resultar en la formación de la turba que a su vez puede convertirse en lignita, carbón y depósitos de petróleo.

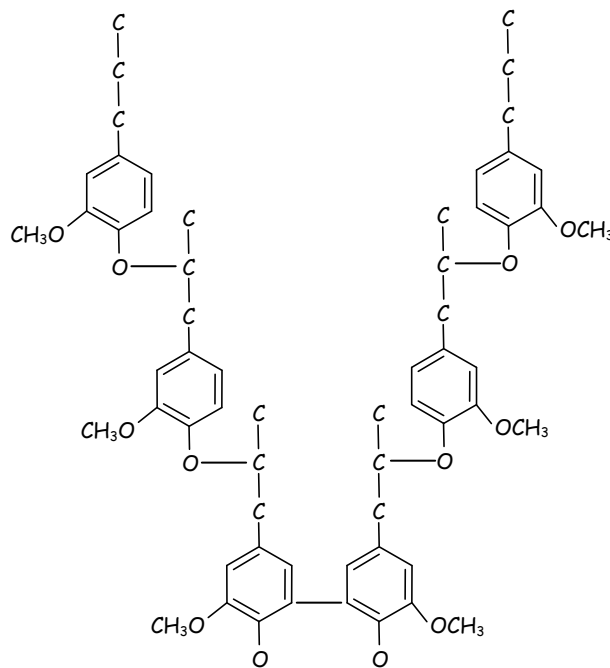


Figura 1.1. Hipótesis de la estructura simplificada de la lignina procedente de maderas blandas y formada por la unión de monómeros de alcohol coniferílico (Tan, 1993).

Los procesos de obtención de la pasta de celulosa individualizan las fibras que forman la madera. Para ello se recurren a 1) tratamientos mecánicos, que convierte la

madera en fibras moliendo y refinando y con los que se obtienen elevados rendimientos, pero que demandan mucha energía, 2) tratamientos químicos de la madera, por los cuales la lignina, hemicelulosas y componentes minoritarios son disueltos para obtener fibras libres, dejando poco alterada la celulosa. Con este propósito, dos métodos son normalmente empleados: proceso al sulfito y proceso al sulfato o proceso Kraft.

× Proceso al sulfito: se emplea bisulfito sódico para promover la separación de la lignina de las fibras celulósicas. La acción del bisulfito sobre la lignina produce la sulfonación de las moléculas de lignina, generando ácidos lignosulfónicos más hidrofílicos. La efectividad de la deslignificación durante este procedimiento se debe las reacciones de hidrólisis y sulfonación. Esto hace que la lignina sea más hidrofílica al haberse introducido grupos sulfónicos en su estructura y la posterior rotura hace que se generen enlaces éteres dando lugar a nuevos grupos fenólicos. Además surgen moléculas de menor tamaño molecular. Este procedimiento es importante en la fabricación de derivados de celulosa como la viscosa.

× Proceso Kraft: actualmente es el más empleado para producir pasta sin blanquear ya que es que permite emplear cualquier tipo de madera, incluso con alto contenido en resina. La pasta kraft tiene como característica más destacada su gran resistencia mecánica, que la hace adecuada en papeles para envoltorios y embalajes. Esta característica, junto con el hecho de poder recuperar los reactivos químicos de la cocción, son grandes ventajas, que como contrapartida, produce una pasta más oscura que las pastas al sulfito y por tanto su blanqueo es más difícil y costoso. Las astillas de la madera son tratadas a 150-170°C en una disolución con hidróxido sódico y con sulfuro sódico como agentes deslignificantes. Durante este procedimiento la fracción no celulósica de la madera se disuelve en la lejía como sales sódicas de los productos de degradación de lignina y hemicelulosas, como los lignosulfonatos sódicos. Las unidades estructurales de la lignina se unen entre sí por enlaces C-C y enlaces éter. Por ser esos últimos más débiles, la fragmentación producida durante la cocción se debe casi exclusivamente a la ruptura de estos enlaces. Los iones bisulfuro e hidroxilo rompen los enlaces y producen la liberación de un grupo fenólico, la combinación de estos dos efectos

1. Introducción

(fragmentación y liberación de grupos fenólicos) hace más hidrófila la lignina, que se queda disuelta en la lejía como fenolatos sódicos.

Tabla 1.1. Composición típica de la materia orgánica de una lejía negra kraft de pino (Kringstad y Lundstrm, 1984)

Componente	Contenido (% respecto sólido seco)	Composición (% de hidroxiacidos)
Lignina	47	
Hidroxiacidos	28	
Láctico		15
2-hidroxibutanoico		5
2,5-dihidroxipentanoico		4
Xiloisosacarínico		5
α -glucoisosacarínico		15
β - glucoisosacarínico		36
Otros		20
Ácido fórmico	7	
Ácido acético	4	
Extractos	5	
Otros compuestos	9	

En el ciclo de cocción Kraft, la incineración de la materia orgánica disuelta en las lejías se emplea para producir energía y eliminar un residuo altamente contaminante. En la tabla 1.1. se indica la composición típica de este material residual. Además puede variar en función de la composición de las cortezas. Una corteza típica posee contenidos elevados, entre el 20 y 40%, de compuestos solubles formados por 1) la fracción lipofílica, extraíble en disolventes no polares y consistente en grasas, terpenos, terpenoides y

alcoholes y 2) por la fracción hidrofílica, soluble en agua o en solventes orgánicos polares formada por compuestos de tipo fenólico.

También existen casos en los que se recupera los sólidos de las lejías negras. En método más frecuente para recuperar la lignina es por precipitación con CO_2 . En este procedimiento, se protonan los grupos fenolato y los grupos carboxílicos que estabilizan la lignina en la disolución y ésta precipita. Para eliminar el Na unido a los grupos carboxilos, se baja el pH hasta 2-3 con ácido sulfúrico, que además provoca la precipitación de más lignina.

En cuanto a las lejías negras tienen varios aprovechamientos (fabricación de neumáticos, colorantes, pesticidas, combustibles, etc.) entre los que se encuentra su uso como fertilizante. Para ello, después de la precipitación de la lignina por acidificación con CO_2 , se hace una oxidación con HNO_3 . Una vez realizada la oxidación se somete el producto a una reacción de amoxidación con el fin de incrementar el contenido en N (González, 1986).

Con respecto a la aplicación de lignosulfonatos de Zn a suelos ácidos produce un aumento de Zn en maíz con respecto al tratamiento control (López-Valdivia y col., 2002). Los mayores contenidos de Zn en planta se producen para los tratamientos de EDTA/Zn y lignosulfonato Zn. Además, la especiación del Zn en el suelo después de la cosecha muestra que los fertilizantes con mayores contenidos de Zn lábil son el fenolato de Zn, el EDTA/Zn y el lignosulfonato de Zn.

Álvarez y col. (1996) estudiaron la movilidad relativa del lignosulfonato de Zn y EDTA/Zn en suelos calizos en función de si estaban recubiertos o no. Pudieron observar que el EDTA migraba a lo largo de la columna y que alrededor del 50% del Zn era lixiviado cuando el fertilizante no estaba recubierto. Sin embargo, esta migración se reducía al 10% en el caso de los recubiertos. Para el lignosulfonato de Zn, los resultados mostraron una baja migración del producto. El hecho de que el fertilizante estuviera recubierto beneficiaba al EDTA, mientras que no se observan mejoras para el lignosulfonato.

1. Introducción

Los lignosulfonatos en concentraciones apropiadas, tienen un efecto bioestimulante en la raíz y en el crecimiento de la planta (Kevers y col. 1999). Otros autores (Raese y col, 1988) han demostrado la eficacia de los lignosulfonatos para aliviar la clorosis férrica cuando este producto es aplicado vía foliar y sin causar un efecto fitotóxico en el fruto.

Al margen de los beneficios como fertilizantes, se ha demostrado que aplicados a suelos pueden inhibir la actividad de la ureasa, disminuyendo la hidrólisis de urea (Xie y col. 1993). Además se ha visto que en los suelos tratados con lignosulfonatos, el N se acumula en forma de NH_4^+ , lo que hace pensar que también inhiben la nitrificación (Meier y col., 1993).

1.2.1.2. Sustancias húmicas

Las sustancias húmicas son el resultado de las transformaciones químicas y biológicas llevadas a cabo por los microorganismos del suelo de los residuos procedentes de plantas, animales y microbios. No existen dudas con respecto a que las sustancias húmicas se originan a partir de un número variado de precursores con numerosos procesos químicos o biológicos. Sabemos de la presencia en las macromoléculas húmicas de componentes atribuibles a las ligninas, pero esto no implica que estas macromoléculas surjan directamente a partir de modificaciones degradativas de la lignina. Hayes (1992) asume que es igualmente probable la recombinación mediante procesos de síntesis biológica o química, bien fragmentados de la lignina, como de compuestos moleculares liberados a partir de éstas. A causa de la naturaleza heterogénea de los sustratos y de los procesos de síntesis, es posible que dos moléculas distintas se produzcan simultáneamente, por lo que importante considerar la existencia de mezclas para una posterior caracterización de las sustancias húmicas. En el suelo, las sustancias húmicas están unidas a los componentes minerales a través de distintas interacciones químico-físicas (Theng, 1979) y mezcladas con otros componentes de diferente naturaleza.

Para su caracterización, las sustancias húmicas pueden fraccionarse en componentes con diferentes propiedades físicas y químicas. El método más común y aceptado se basa en la diferente solubilidad en agua a varios pH (Aiken y col., 1985). Los ácidos húmicos son definidos como la fracción insoluble en agua a pH inferiores a 2, pero soluble a pH superiores; los ácidos fúlvicos es la fracción que es soluble en agua en todo el intervalo de pH y las huminas la que es insoluble en todo el intervalo de pH.

Existen numerosos modelos estructurales para representar las sustancias húmicas, todos ellos basados en estudios sobre su composición elemental, grupos funcionales, productos de degradación datos espectroscópicos y propiedades físico químicas (Stevenson, 1994). El uso de estos modelos permite la representación de nuevas estructuras hipotéticas e ilustrar los mecanismos de enlace de los iones metálicos.

La presencia de anillos aromáticos y de cadenas aromáticas es importante en las estructuras de las sustancias húmicas, en especial de los ácidos húmicos.

Los ácidos húmicos y fúlvicos comparten algunas características comunes, pero existen significativas diferencias entre ellos. Los ácidos fúlvicos presentan un mayor tamaño molecular, un contenido de O más elevado, menores contenidos de C y además, contienen más grupos funcionales ácidos, particularmente los carboxílicos. Otra importante diferencia es la asociación de los oxígenos. Mientras que en los ácidos fúlvicos suelen asociarse a grupos funcionales como carboxilos, cetonas o alcoholes, una elevada proporción de los oxígenos presentes en los ácidos húmicos lo hacen como componentes estructurales de núcleos, tales como enlaces éteres o ésteres.

Los ácidos grasos y las largas cadenas hidrocarbonadas son estructuras que parecen ser componentes de algunos, pero no todos, los ácidos húmicos y fúlvicos. La presencia de estos grupos puede contribuir a las características hidrofóbicas de las sustancias húmicas. Las estructuras cíclicas condensadas, no parecen contribuir de forma prominente a las características de los ácidos húmicos y fúlvicos.

Los anillos aromáticos presentes en estas moléculas pueden enlazarse entre ellos o con cadenas alifáticas, formando el esqueleto de las sustancias húmicas (figura 1.2). La

1. Introducción

agregación de estos bloques forman complejos de peso molecular que puede variar de cientos a miles Dalton para los ácidos húmicos (Linehan, 1977) y de cientos de miles para los ácidos fúlvicos (Swift y Posner, 1971).

La acidez total o capacidad de cambio es atribuida a la presencia de protones disociables presentes en los carboxilos aromáticos y alifáticos y en los grupos fenólicos e hidroxílicos. Los ácidos húmicos se caracterizan por tener una menor acidez total y menor contenido en carboxilos que los ácidos fúlvicos.

En general, la reactividad de las sustancias húmicas es controlado por dos grupos funcionales, los carboxilos y los fenoles. Los grupos carboxilos comienzan a disociar el protón a pH 3.0 (Posner, 1964), de manera que la molécula húmica está electronegativamente cargada. A pH inferiores a 3.0, la carga es muy pequeña e incluso cero. A pH 9.0, los grupos fenólicos empiezan a disociarse y la molécula posee una elevada carga negativa.

Muchas reacciones o interacciones tienen lugar como consecuencia de la presencia de estas cargas. A pH bajos, la molécula húmica es capaz de atraer cationes, lo que conduce a reacciones de intercambio catiónico. La capacidad de intercambio catiónico (CEC) es mayor en los ácidos fúlvicos que en los ácidos húmicos.

A pH elevados, cuando los grupos fenólicos están también disociados, las reacciones de complejación y quelación entre los metales y las sustancias húmicas comienzan a cobrar importancia.

En cuanto a la formación de complejos entre iones metálicos y la materia orgánica, cabe decir que aunque la mayor parte de los elementos metálicos en suelos se presentan precipitados o retenidos por las arcillas y coloides húmicos, la solubilización de cationes presenta gran importancia, ya que la formación de complejos metal-materia orgánica puede tener diferentes efectos. La principal consecuencia de estas reacciones es la actuación de las sustancias orgánicas como transportadores de elementos traza en la solución del suelo incrementando su disponibilidad en este medio (Chen y Stevenson, 1986, Stevenson, 1981, 1991). También puede aumentar la solubilidad de componentes del suelo

que son insolubles, como es el caso de la solubilización de fosfatos minerales procedentes de fosfatos insolubles a través de la complejación de Fe y Al en suelos ácidos y del Ca en suelos calizos.

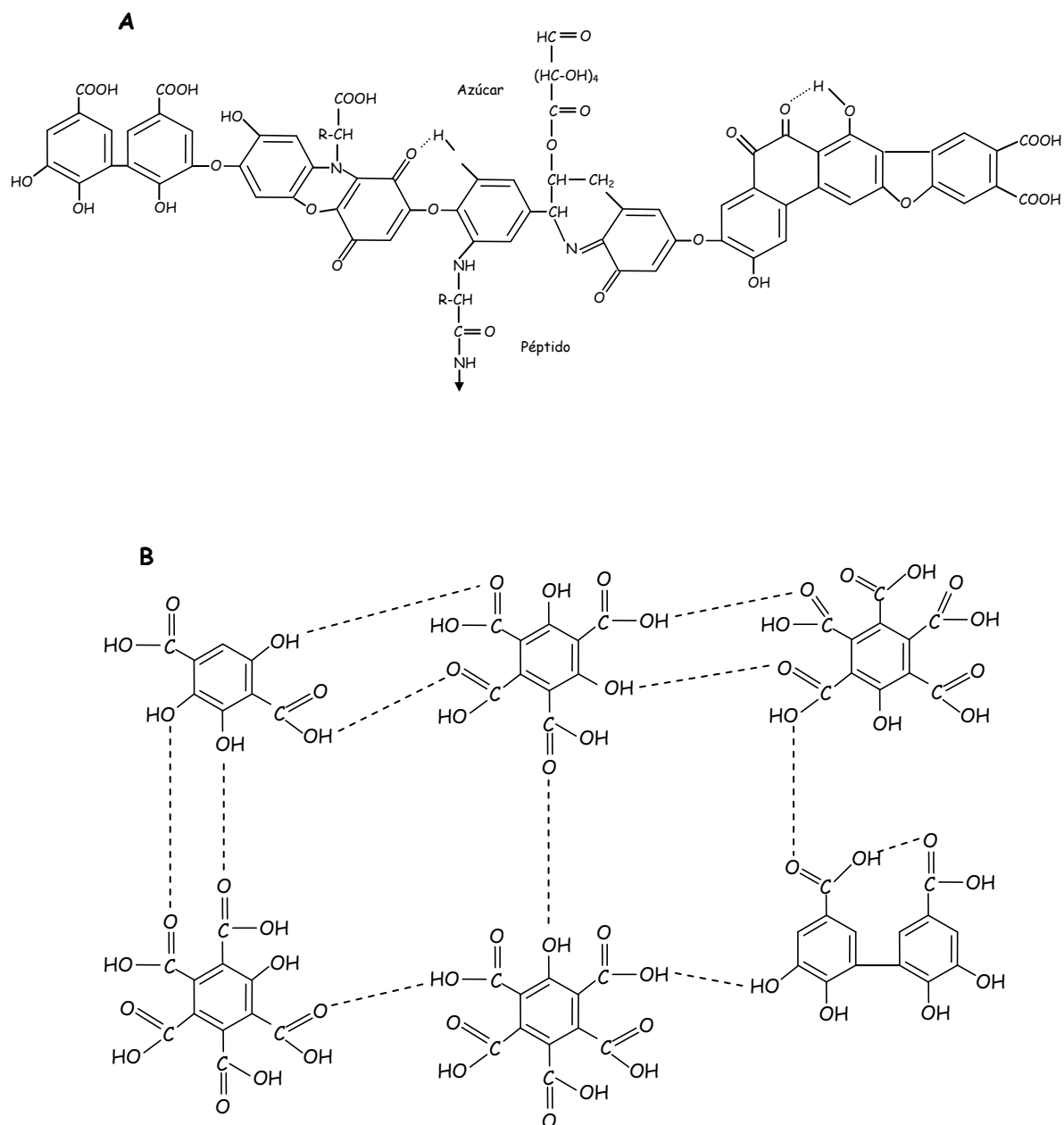


Figura 1.2. Estructuras de (A) ácido húmico propuesto por Stevenson (1994) y (B) ácido fúlvico propuesto por Schnitzer y Khan (1972).

1. Introducción

Centrándonos en el influencia de los formación de complejos sobre la nutrición de la planta y atendiendo al tipo de enlace, los metales pueden clasificarse en tres grupos (Stevenson, 1994): 1) metales esenciales para las plantas pero que no están enlazados a los compuestos de coordinación (K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), 2) metales esenciales para las plantas y que forman enlaces coordinados con ligandos orgánicos (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Mo) y 3) metales que no presentan una función bioquímica concreta en las plantas, pero que son acumulados en el medio ambiente (Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+}).

La formación de estos complejos depende de el contenido en grupos funcionales donadores de electrones presentes (Stevenson, 1994). La formación de más de un enlace entre el metal y la molécula húmica, generalmente se traduce en una mayor estabilidad del complejo y esta estabilidad también depende del número de átomos que se unan al metal, del número de anillos que se formen, de la naturaleza y concentración del metal y del pH (Stevenson, 1994). La mayoría de estos iones metálicos pueden aceptar más de un par de electrones y coordinarse simultáneamente con el correspondiente número de átomos donadores. Cuando dos o más posiciones de un ion metálico se coordinan con dos o más grupos donadores de un único ligando para originar una estructura de anillo se forma un quelato.

La complejación de los metales puede ocurrir de dos modos: en el primero y más importante, los metales se unen por los grupos fenólicos y carboxílicos (Van Dijk, 1971) y en el segundo, sólo se unen a grupos carboxílicos (Schnitzer, 1969 y Gamble, y col., 1970). También se pueden producir interacciones a través de puentes de agua, enlace relativamente débil que sólo cobra importancia para metales con una elevada energía de hidratación.

La formación de complejos metálicos con la materia orgánica puede tener diferentes efectos en el suelo y algunos de ellos inciden directamente sobre la planta, como es el caso de los ácidos orgánicos de bajos peso molecular y otros compuestos bioquímicos que forman compuestos solubles con los micronutrientes. Estos compuestos

pueden actuar como transportadores dando lugar al incremento de la disponibilidad de los micronutrientes a las plantas superiores.

Diversos autores han estudiado el efecto beneficioso de la materia húmica sobre el crecimiento de las plantas. Los mayores beneficios resultan de la mejora de las propiedades del suelo como agregación, aireación y permeabilidad. También mejoran la actividad enzimática en el tejido de la semilla favoreciendo la germinación y el crecimiento de las plántulas (Dixit y Kishore, 1967) y otros autores demuestran que en concentraciones intermedias, las sustancias húmicas benefician el desarrollo del tallo y de la raíz (Lulakis y Petsas, 1995). Las sustancias húmicas parecen tener un efecto mayor sobre las raíces que sobre otras partes de las plantas (Sladky, 1959). La estimulación del crecimiento de la raíz y de la iniciación radicular son efectos comúnmente observados. Ya Khristeva (1949), estudió la respuesta de diferentes plantas a un humato sódico y observó que tanto la longitud de la raíz, como la del tallo, se incrementaron casi el doble en el mejor de los casos.

Independientemente del origen de las sustancias húmicas, su aplicación tanto en disolución nutritiva como en aplicación foliar, produce un aumento en el desarrollo radicular afectando a la elongación y a la formación de raíces secundarias. Los resultados sobre experimentos vegetales indican que los ácidos fúlvicos tienen un efecto ligeramente mayor que los ácidos húmicos. Por último, hay que señalar que la concentración del ácido húmico es importante, y generalmente la respuesta decrece en concentraciones elevadas. (Chen y Aviad, 1990).

Se piensa que las sustancias húmicas pueden ser tomadas por las plantas, ejerciendo sobre ellas efectos beneficiosos. Vaughan y Ord (1981) sugieren que las moléculas de bajo peso molecular son tomadas activa y pasivamente por la planta y son consideradas biológicamente activas, mientras que las moléculas de pesos moleculares más altos son tomadas activamente. Es por este motivo por el que se ven involucradas en mecanismos de estimulación del crecimiento de la planta como: interacción con los fosfolípidos de las membranas celulares y funcionamiento como transportadores de

1. Introducción

nutrientes a través de ellas (Chen y Schnitzer, 1978), aumento de la energía de metabolismo potenciando la fotosíntesis y la respiración (Vaughan, 1967), afectando al metabolismo del ácido 3-indol-acético (AIA) y a la actividad de otras enzimas como la fosfatasa, invertasa, colin esterasa y peroxidasa.

1.2.1.3. Aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades estructurales fundamentales de las proteínas. Son moléculas que contienen un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) libres. La fórmula general se muestra en la figura 1.3.

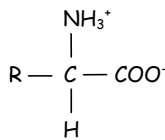


Figura 1.3. Fórmula general de un aminoácido

Los aminoácidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteínas pueden clasificarse en aminoácidos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos (figura 1.4.).

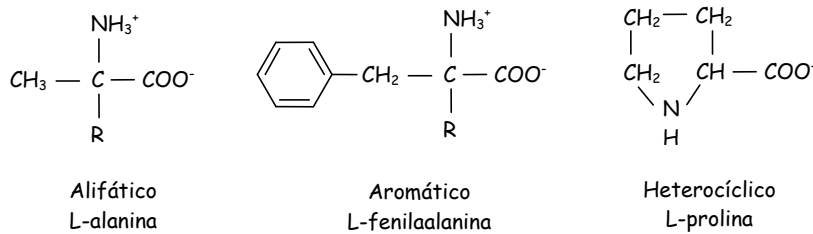


Figura 1.4. Clasificación de los aminoácidos obtenidos a partir de la hidrólisis de las proteínas.

Los aminoácidos son importantes ligandos de bajo peso molecular en los sistemas biológicos. Tanto los aminoácidos ácidos como los básicos pueden enlazar iones metálicos a través de los grupos α -amino y carboxílicos.

Aunque la formación de complejos entre metales y aminoácidos es, en general baja, existe una mayor afinidad entre el Zn y la glicina, metionina, cisteína, ácido aspártico, arginina, tirosina e histidina. El Fe, sin embargo, sólo forma complejos estables con cisteína y el ácido glutámico.

Los aminoácidos están presentes en residuos industriales, como es el caso de las melazas generadas en industrias azucareras o los residuos de animales de la industria ganadera.

Los aminoácidos tienen distintas funciones en la planta como: aumentan la disponibilidad de aminoácidos fácilmente utilizables, son fuente de energía ya que facilitan el uso de nitrógeno por la planta, mejoran de los mecanismos de defensa de los cultivos frente a condiciones adversas (Breteler y col., 1985) y poseen acción quelante (Ashmead, 1986), bioestimulante y/o fitohormonal.

1.2.1.4. Ácido glucónico

El ácido glucónico (figura 1.5) es el producto de oxidación de la D-glucosa en el C1. En soluciones acuosas el ácido se encuentra en equilibrio con la δ y γ lactonas que son los productos directos de la deshidrogenación de la glucosa.

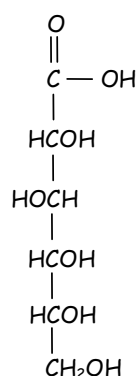


Figura 1.5. Fórmula del ácido glucónico

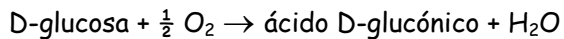
La sal sódica del ácido glucónico es el derivado con mayor importancia comercial, debido a sus excelentes propiedades como agente complejante.

Si bien es posible oxidar la D-glucosa a D-glucono- δ -lactona por métodos electroquímicos, químicos y enzimáticos, el método fermentativo es el actualmente utilizado por su bajo coste. Gran variedad de bacterias y hongos producen glucónico a partir de glucosa. Los más utilizados son los hongos y entre ellos cepas de *Aspergillus niger* siendo en

1. Introducción

general la cepa de elección la NRRL 3 debido a que no produce paralelamente ácidos cítrico y oxálico bajo condiciones de operación.

La principal enzima involucrada en la oxidación de la δ -D-glucosa es la comúnmente llamada glucosa oxidasa. Esta enzima es una flavoproteína que remueve dos hidrógenos de la glucosa reduciéndose. La forma reducida de la enzima luego se reoxida con oxígeno molecular dando agua oxigenada que es luego hidrolizada por una catalasa. La ecuación neta se puede escribir



El último paso en la obtención de glucónico es la hidrólisis de la δ -lactona. Esta puede ocurrir espontáneamente o por intermedio de una lactonasa (que se halla presente en *A. niger*). El pH es importante para favorecer la ruta metabólica que lleva a la producción de glucónico, ya que a valores de éste neutros o alcalinos *A. niger* produce este ácido casi exclusivamente. Además, a valores de pH entre 1 y 3, el glucónico es rápidamente metabolizado por *A. niger*.

Para la obtención del gluconato de calcio, el efluente del medio de cultivo se decolora con carbón activado, se concentra evaporando el 15-20 % del agua y se deja cristalizar a temperaturas cercanas a 0°C. La sal se filtra y se lavan los cristales con agua fría. Si se quiere obtener la sal sódica se puede preparar concentrando el efluente del cultivo a 40-45% de sólidos, ajustando el pH a 7.5 con NaOH y luego secando en tambor rotatorio.

Los polisacáridos presentes en el suelo tienen propiedades distintas a los que se encuentran en la planta, debido a que están sometidos a descomposición por parte de los microorganismos para la obtención de alimento y energía. Pero estos polisacáridos presentes en el suelo pueden protegerse de la degradación uniéndose a otros constituyentes del suelo como las arcillas o cationes metálicos.

Los polisacáridos, tienen influencia en las propiedades físicas del suelo como las reacciones de intercambio catiónico, retención de aniones, metabolismo del carbono,

actividad biológica y las reacciones de complejación de metales. Pueden reaccionar con la lignina y los aminoácidos de manera que contribuyen a la formación del humus, ácidos húmicos y compuestos relacionados. También la presencia de los polisacáridos mejora la agregación de las partículas del suelo (Greenland y col., 1961 y 1962 y Baver, 1963).

A través de la interacción con las arcillas, pueden cambiar las propiedades de éstas a la hora de retener agua. Los compuestos orgánicos, compiten con el agua por los sitios de adsorción, reduciendo la humedad y la expansión de las arcillas, de manera que aumenta la cementación.

1.2.1.5. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos pueden definirse como compuestos de bajo peso molecular que contienen uno o más grupos carboxílicos y que se encuentran en todos los organismos. Dependiendo del grado de disociación y del número de grupos carboxílicos, los ácidos orgánicos pueden poseer carga negativa variable que les permite complejar cationes metálicos y desplazar aniones de la matriz del suelo. Por esta razón, están implicados en varios procesos como la movilización y toma de nutrientes por las plantas y microorganismos, detoxificación de metales como el Al, proliferación microbiana en la rizosfera, etc.

Mientras que algunos de los ácidos orgánicos presentes en el suelo proceden de la deposición atmosférica (Millet y col., 1997), la mayor parte se estos proceden de los exudados de las raíces, de los restos de plantas muertas y de la descomposición microbiana de estos productos. Los principales ácidos orgánicos presentes en las raíces de las plantas son el lactato, acetato, oxalato, succinato, fumarato, malato, citrato, isocitrato y aconitato.

Los ácidos orgánicos poseen la capacidad de complejar metales en disolución. El grado de complejación depende del ácido orgánico en particular (número y proximidad de los grupos carboxílicos), de la concentración y tipo de metal y del pH de la disolución del suelo. Los ácidos orgánicos con un sólo grupo carboxílico como el lactato o acetato,

1. Introducción

poseen una baja capacidad de complejación. A partir de las constantes de formación publicadas por Martell y Smith (1976-1989) se puede concluir que el malato, citrato y oxalato presentan una elevada afinidad por metales trivalentes como el Al^{3+} y Fe^{3+} . Sin embargo, esto no implica que se produzca una buena complejación al pH de los suelos (Mench y Martin, 1991). Por ejemplo, empleando el programa de especiación química Geochem-PC (Parker y col., 1995), se puede predecir que la complejación del Fe por el malato, citrato y oxalato es altamente dependiente del pH de la disolución del suelo con una baja o nula complejación en suelos con pHs elevados. Además, el citrato, malato y oxalato tienen tendencia a precipitar en presencia de Ca^{2+} .

Debido a su capacidad de complejar, los ácidos orgánicos participan en biodisponibilidad y en el transporte de metales en los suelos. Pueden formar complejos específicos con los grupos funcionales presentes en las superficies de los minerales afectando a las características de la carga de estas superficies (Yao y Yeh, 1996) y competir con otras sustancias retenidas por los lugares de adsorción (Geelhoed y col., 1998, Grafe y col., 2002).

Generalmente estos compuestos se obtienen industrialmente de la fermentación de azúcares como por ejemplo, el ácido cítrico es obtenido de la fermentación de la sacarosa por *Aspergillus Níger* y el ácido láctico se obtiene a partir del almidón, azúcar de uva (glucosa) o azúcar de caña (sacarosa) utilizando el *Bacillus Delbrücki*.

1.2.1.6. Poliflavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico). La estructura base puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos, solubles en agua y por poseer una intensa

absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: flavanos, flavonoles, flaonas y antocianidinas.

Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares, donde cumplen funciones metabólicas como ser responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta, intervenir en el transporte de la hormona auxina, atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores.

1.2.2. Evolución del mercado de agentes complejantes

Para evaluar la importancia de los complejos en el mercado nacional se ha realizado un estudio de su evolución, empleando para ello, los datos presentados en Vademecum (Liñán 1990-2007) y la información proporcionada por el Registro de Fertilizantes y Afines del M.A.P.A.

Debido al gran número de moléculas empleadas en la formulación de estos productos, se ha hecho una clasificación de éstas en familias (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Clasificación de los agentes complejantes según familias

Agente complejante	Abreviatura	Moléculas incluidas
Lignosulfonatos	LS	ácido lignosulfónico, lignosulfonatos y ligninas
Aminoácidos	AA	Aminoácidos libres y polipéptidos de cadena corta
Ácidos Orgánicos	AO	ácido cítrico, ácido acético, ácido fenólico, ácidos carboxílicos, policarboxílicos, etc.
Ácidos Glucónicos	AG	ácido heptagluconico y hexagluconico
Ácidos Húmicos y Fúlvicos	AHF	
Flavonoides	F	flavonoides y poliflavonoides

1. Introducción

1.2.2.1. Correctores de carencias simples y múltiples

La evolución a lo largo de los diecisiete años del número de productos que contienen agentes complejantes es estudiada y se puede observar en la figura 1.6. El número total de formulaciones basadas en complejantes se ha triplicado en estos años, pasando de 85 productos en el año 1990 a 299 en 2007.

Al realizar un estudio más detallado, se puede observar que la familia de los

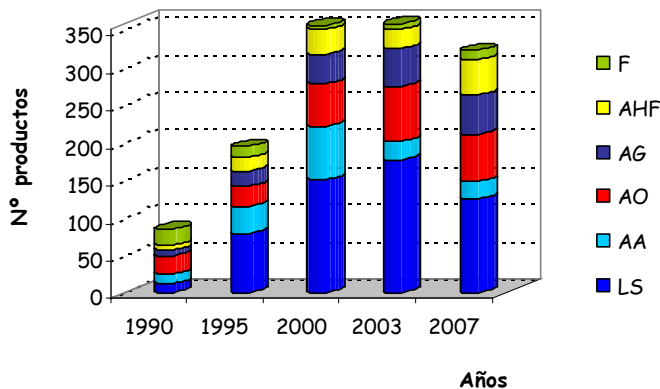


Figura 1.6. Distribución del mercado de complejos para los distintos años y en función del agente complejante

lignosulfonatos comienza siendo una de las tres más representativas en el año 1990 con un aporte del 14% y llega a multiplicar por 15 el número de formulaciones pasando a ser los complejantes por excelencia ya que abarcan el 49% del mercado en

2003. Sin embargo, en el año 2007 se puede apreciar una pequeña disminución en la contribución al total de formulaciones comercializadas (42%).

De igual manera, los productos basados en las moléculas de la familia de los ácidos glucónicos aumentan de 28 en el año 1990 a 63 en 2007, pasando a representar el 21% del mercado en este año frente al 14% que representaban en 1990.

Por el contrario, el número de productos de la familia de los flavonoides que es la más representativa en 1990, disminuye a la mitad en 2007. Su contribución al total pasa de ser del 26% en 1990 a apenas el 4% en 2003.

En cuanto a los aminoácidos, el número de productos se triplica en los cinco primeros años, en los cinco siguientes se dobla, para luego pasar a ser la cuarta parte en tan sólo tres años. Su representación en el mercado es del 10% en 1990 y disminuye al 8% en 2007.

La contribución de los ácidos orgánicos, es del 8% en 1990 y aumenta hasta el 18% en el año 2007.

Las formulaciones basadas en la familia de los ácidos húmicos y fúlvicos aumentan en los diez primeros años para luego sufrir una disminución de manera que su contribución al total del mercado pasa del 4% en el año 1990 al 11% en 2007.

1.2.2.2. Contribución de los complejos al mercado de micronutrientes y Ca

En la figura 1.7 se puede observar cual ha sido la contribución de los complejos al total del mercado a lo largo de los años en los que se basa el estudio. Se ha dividido el mercado de los correctores de carencias de micronutrientes y Ca en: *Quelatos* (HEDTA, DTPA, EDTA, EDDHA, EDDHMA y EDDHSA), *Complejos*, *Sales* (sales inorgánicas) y *Otros* (productos con vitaminas, citoquinonas, extractos de algas, moléculas sin identificar, etc.).

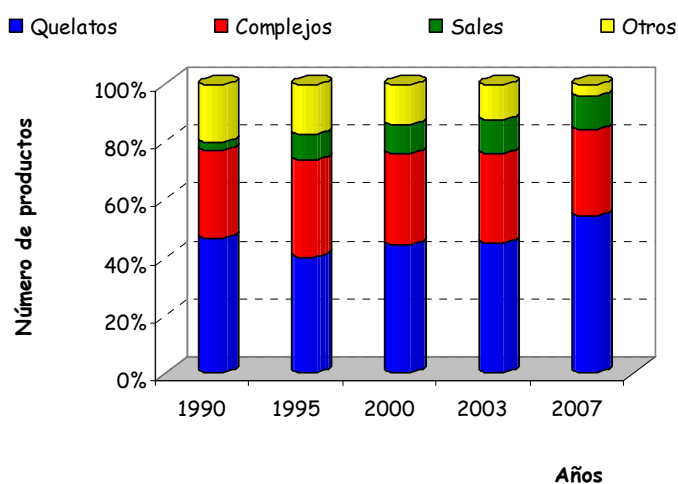


Figura 1.7. Distribución del mercado de correctores de carencias en distintos años en función del tipo de producto. (Liñán)

En el año 1990, los quelatos son los productos mayoritarios en el mercado con un aporte del 40%, seguido por los complejos cuya contribución es del 30%. Este mismo año, los productos denominados "Otros" suponen un 20%, mientras que las "sales" sólo

1. Introducción

constituyen el 3%. En el año 2007, la contribución de los complejos permanece constante en un 30% y la presencia de los quelatos aumenta hasta el 55%

1.2.2.3. Estado físico y riqueza en el metal

En los años en los que se ha realizado el estudio, la mayor parte de los complejos comercializados son líquidos. En el año 1990, el porcentaje de formulaciones líquidas es del 77% y aumenta hasta el 94% en 2007.

La Normativa Europea sobre Fertilizantes requiere que los productos líquidos tengan al menos un 2% de elemento soluble y para los sólidos este porcentaje aumenta hasta el 5%.

Para los productos sólidos el número de formulaciones con riqueza superior al 5% disminuye a lo largo del tiempo, sin embargo más del 80% de las formulaciones líquidas cumplen la legislación todos los años del estudio.

1.2.3. Legislación española y europea

Al igual que los quelatos, los complejos son moléculas formadas por un ión metálico que es un aceptor de electrones y por una sustancia orgánica capaz de compartir los electrones con el metal. Mientras que en la terminología química un quelato es un tipo de complejo en el que la sustancia orgánica comparte dos o más pares de electrones, en la terminología agrícola, la diferencia entre quelatos y complejos está basada en la fortaleza del enlace y se encuentra recogida en el Reglamento (CE) nº 2003/2003 (D.O.C.E. 21 de noviembre de 2003). En dicho Reglamento, se definen los productos autorizados como agentes quelantes, pero se deja la lista de agentes complejantes pendiente de elaboración.

Con la intención de concretar algunas de las disposiciones de este Reglamento y de refundir y actualizar la normativa española existente, el R.D. 824/2005 hace pública la lista de agentes complejantes permitidos para su uso exclusivo en aplicaciones foliares

y en fertirrigación en España y que son: ácido lignosulfónico, ácido glucónico, ácido heptagluónico, sustancias húmicas, aminoácidos libres y ácido cítrico. En este mismo Real Decreto se hace una revisión de los métodos analíticos existentes para la determinación del contenido de nutrientes totales y solubles en agua entre otros, pero los métodos analíticos necesarios para la determinación de la fracción de nutrientes complejados por los distintos agentes complejantes están pendientes de elaboración.

1.2.4. Métodos analíticos

Los agentes complejantes, tanto de estructura química definida (citratos, ácidos glucónicos, etc.) como los de estructura química variable (aminoácidos, lignosulfonatos y sustancias húmicas) no se encuentran aún incorporados a la legislación europea y su inclusión en ella debe estar sujeta al conocimiento que sobre su acción agronómica y sobre los métodos analíticos que para su determinación se dispongan.

El análisis de los productos fertilizantes es necesario ya que:

- * Permite al agricultor conocer la composición del fertilizante que va a emplear.
- * Permite al productor y distribuidor controlar la calidad de su producto.
- * Permite el control por parte de las autoridades del cumplimiento de las normas.

Pero en el caso de los complejos además se requieren para ayudar al legislador a definir aquellos productos que tengan valor agronómico.

Las principales características que se deben poder controlar en un complejo o en un quelato son:

- * Concentración de elemento soluble
- * Concentración de elemento complejado o quelado.
- * Naturaleza y concentración del agente complejante o quelante.

La determinación del elemento soluble está bien resuelta mediante el método oficial (Método Oficial 9.2. del Reglamento (CE) nº 2003/2003) tanto para quelatos como para complejos. En los últimos años se han desarrollado métodos analíticos para la cuantificación de quelatos (Lucena y col. 1996, Hernández-Apaolaza y col. 1997, EN 13368-2001:1, EN 13368-2001:2). Como consecuencia la calidad de estos productos ha mejorado considerablemente en los últimos años (García-Marco, 2005).

De igual manera, los agentes complejantes necesitan tener su propia metodología analítica. Estos métodos analíticos deberían proporcionar información de la cantidad de metal que está complejo e identificar el agente complejante. Con el fin de identificar los agentes complejantes existen diferentes metodologías: HPLC para aminoácidos (Pfeifer y col., 1983), infrarrojos para lignosulfonatos (Karklins, 1981) y humatos (Stevenson y col., 1971). Las constantes de estabilidad para aminoácidos libres pueden ser determinadas mediante valoraciones potenciométricas (Dogan y col., 2001) aunque no se han encontrado métodos específicos para la cuantificación del elemento complejo por extractos de aminoácidos. La determinación del metal complejo en humatos puede hacerse a través de varias técnicas: separación mediante columna de intercambio iónico seguido de la detección por ICP-MS o por espectrofotometría de fluorescencia con generador de vapor frío (Appelblad y col., 1999), cromatografía de exclusión molecular unida a un espectrofotómetro UV-Vis e ICP-MS (Sadi y col., 2002) o detección por FAAS (Pérez-Sanz y col., 2006). También se emplea la cromatografía de filtración sobre gel seguida de ICP o FAAS para los lignosulfonatos (Brandt, 1991).

Sin embargo, para la determinación rutinaria por laboratorios de control del metal complejo en fertilizantes, se debe emplear un método sencillo y único que diferencie el elemento complejo de las formas libres del metal ha de ser empleado.

1.3. Agente quelante IDHA

Recientemente el agente quelante IDHA (ácido n-(1,2-dicarboxietil)-D,L-aspártico), comúnmente conocido como ácido imidodisuccínico ha sido propuesto para su

uso en agricultura (Mitschker y col., 2004). El IDHA comparte similitudes estructurales con el EDTA, pero también con el *o,p*-EDDHA ya que sólo contiene cinco grupos funcionales capaces de enlazar al Fe^{3+} (figura 1.8).

García-Marco y col. (2006), sugieren que el *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} , con sólo cinco grupos funcionales para quelar Fe, es el sustrato más rápido para la Fe quelato reductasa en raíces de plantas de pepino (planta eficiente), y también es más rápido que *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} reverdeciendo plantas de soja cloróticas (planta no eficiente). Además, *o,p*-EDDHA, es bastante rápido solubilizando Fe desde las formas insolubles. Este comportamiento se debe a la presencia de sólo cinco grupos funcionales (Gómez-Gallego y col., 2002) capaces de enlazarse con el Fe mientras que quelatos con seis enlaces (ejm. *o,o*-EDDHA o EDTA) presentan cinéticas de acción más lentas. Por este motivo, se espera que la estabilidad del IDHA/ Fe^{3+} sea inferior a la del EDTA/ Fe^{3+} , pero su capacidad para proporcionar hierro a la planta aún no está probada.

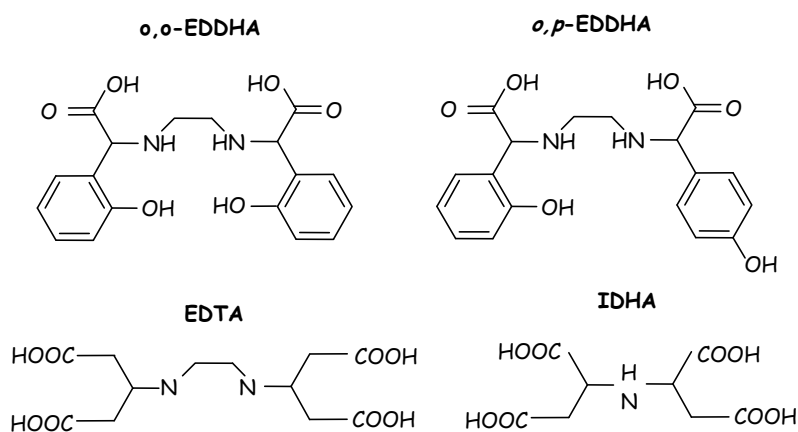


Figura 1.8. Agentes quelantes descritos en el texto

El IDHA es biodegradable (Novack y col., 2005), de manera que puede considerarse como una opción más respetuosa medioambientalmente que otros quelatos sintéticos.

Fernández y col. (2006) demostraron que el Fe procedente del IDHA/ Fe^{3+} produce un aumento mayor del contenido en clorofilas que el DTPA/ Fe^{3+} , pero menor que

1. Introducción

el EDTA/ Fe^{3+} cuando son aplicados vía foliar junto con surfactantes y otros adyuvantes. Schlegel y col. (2006) probaron la penetración foliar de diferentes compuestos de Fe en discos de hojas de haba. Pudieron observar que la penetración seguía una cinética de primer orden y que ésta era mayor para CaCl_2 , luego para el lignosulfonato, IDHA y el menos efectivo era el citrato. Aparte de las publicaciones sobre las constantes de estabilidad (Hyvönen y col., 2003) y sobre el comportamiento de las aplicaciones foliares de IDHA no existen más estudios ni sobre su capacidad quelante con Fe, Mn, Cu o Zn, ni de su comportamiento en otras condiciones agronómicas.

1.4. Estabilidad de complejos y quelatos en diferentes condiciones agronómicas

Para que un complejo o quelato sea eficaz en su aplicación ya sea en hidroponía, radicular, fertirrigación o aplicación foliar, éste debe ser capaz de mantener el elemento soluble, o cuanto menos, disponible para la planta. Cuando un complejo o quelato es aplicado al medio de cultivo, son varios los factores que afectan a su estabilidad. A continuación se ofrece un resumen de estos factores:

1.4.1. Estabilidad en disolución frente al pH

Uno de los factores que afectan a la eficacia del complejo o quelato es su estabilidad con el pH. En concreto, el intervalo de pH en el cual es estable un quelato férrico depende del agente quelante (Hjelte y Aminken, 1989; Cadahía y col., 1987; Lucena y col., 1992)

Tanto los ligandos como los nutrientes van a sufrir la competencia de otros aniones y metales presentes en la disolución. En suelos calizos ha de tenerse en cuenta la posible sustitución del metal quelado o complejoado por el Ca y Mg presentes en la disolución. La presencia de cantidades elevadas de Cu, Mn y Zn y concentraciones bajas de EDDHA/ Fe^{3+} origina la formación de quelatos de esos micronutrientes con el EDDHA,

pudiendo llegar a provocar clorosis férrica en los cultivos, sobre todo si la cantidad de Cu es importante (Tong y col., 1986).

1.4.2. Reactividad frente a suelos y materiales edáficos

Una de las reacciones que pueden sufrir un complejo/quelato en el suelo son las de desplazamiento del metal por otro metal competidor y la consiguiente precipitación de éste en forma de hidróxido. Este desplazamiento depende principalmente de la estabilidad de éstos compuestos, tanto del metal de interés como de sus competidores, del pH y de la concentración de iones.

Por lo general este desplazamiento se puede predecir adecuadamente usando los modelos de especiación química (MINTEQA2, Allison y col., 1990), siendo necesario conocer los datos termodinámicos correspondientes a la formación de complejos/quelatos y especies ácidas e hidroxiladas que se puedan formar. El empleo de estos modelos sobre quelatos férricos de nueva síntesis sirve para predecir la estabilidad y reactividad de estos compuestos en situaciones reales, de tal forma que se obtiene de herramienta que permite seleccionar, previamente a su comercialización y a su aplicación, el tipo de quelato que más se ajuste a las situaciones concretas.

Sin embargo, en productos naturales de composición variable no se pueden aplicar los modelos tradicionales, por lo que se requiere de experimentación de laboratorio para poder conocer su estabilidad real en la disolución del suelo.

La reactividad de los complejos/quelatos en el suelo depende de los procesos de adsorción en los diferentes componentes del suelo (arcillas, óxidos e hidróxidos, materia orgánica, carbonato cálcico, etc). Debido a que las reacciones de adsorción-desorción son más rápidas que las de precipitación-disolución, ponemos concluir que quién controla la solubilidad de los micronutrientes en el suelo son las reacciones de adsorción (Harter, 1991; Stone, 1977). Los factores que afectan la adsorción de los complejos-quelatos incluyen el tipo de agente complejante o quelante, el ión metálico, el tiempo, el pH y la textura del suelo.

1. Introducción

De los estudios realizados por Álvarez-Fernández, 1995; Álvarez-Fernández y col., 1996; Álvarez-Fernández y col., 1997; Hernández-Apaolaza, 1997, se desprende que la presencia de materiales orgánicos, arcillas tipo montmorillonita-Ca y óxidos de hierro (ferrihidrita) intervienen de forma considerable en la adsorción de quelatos férricos EDDHA/Fe³⁺ y EDDHMA/Fe³⁺ en suelos. En cambio, aunque existen estudios que demuestran la baja estabilidad de los complejos en suelos calizos (Goos y Germain, 2001 y Gangloff y col., 2002), no hemos encontrado bibliografía en la que se evalúe cómo se comportan estos complejos frente a cada uno de los distintos materiales edáficos.

A continuación se describen algunas de las propiedades de adsorción de los componentes de los suelos que usaremos en nuestros ensayos.

1.4.2.1. Arcillas

Las características principales de las arcillas son su capacidad de intercambio de iones, principalmente de cationes, y su gran superficie específica. Estas propiedades están determinadas por distintos factores, entre los que destaca el origen de las arcillas, ya que éste influye sobre las sustituciones isomórficas presentes en su estructura y el tipo de ión que satura la arcilla, que puede intervenir de tres formas diferentes: 1) compitiendo con las moléculas de adsorbato por los lugares de adsorción, 2) ser el origen de lugares de adsorción, actuando bien de una forma directa formando enlaces o bien de forma indirecta, a través de sus moléculas de agua de hidratación y 3) formando asociaciones de arcilla-hidróxido (Calvet y col., 1980). Entre las arcillas destacamos, las que describen a continuación, por su abundancia en suelos españoles:

- * Montmorillonita: pertenece al grupo de los minerales de la arcilla trilaminares o 2:1, es decir, posee una lámina octaédrica en coordinación con dos tetraédricas. Suelen poseer tamaño de partícula muy pequeños, y por tanto su superficie específica suele ser grande (700-800 m²/g) y son expandibles. La carga negativa de se debe fundamentalmente a las sustituciones isomórficas. Van Olphen (1977) menciona que la carga equivalente de la capacidad de intercambio catiónica se sitúa alrededor de 70 cmolc/Kg. Su capacidad de

intercambio aniónico es baja, ya que los aniones sólo pueden reemplazar a los grupos hidroxilos estructurales de las aristas de los cristales montmorilloníticos (Bingham y col., 1965).

- × *Ilita*: se trata de un mineral de la arcilla trilaminar 2:1. Su espaciado interlaminar está ocupado por iones K^+ , acompañado a veces por Na^+ y Ca^{2+} lo que hace que las láminas estén unidas más fuertemente que en la montmorillonita y que por tanto no sea expandible. Poseen una capacidad de intercambio catiónico de 30 cmolc/Kg. Los minerales de este grupo están presentes en la mayoría de los suelos de las regiones templadas (Allen y Hajek, 1989). Presenta tamaños de partícula muy variados.

1.4.2.2. Óxidos e hidróxidos

Estos compuestos surgen como consecuencia de procesos de meteorización en suelos, especialmente en aquellos que se encuentran en estados de desarrollo avanzado. Existen una gran variedad de óxidos e hidróxidos en el suelo, desde los cristalizados hasta los amorfos.

La carga neta de los óxidos e hidróxidos es dependiente del pH, pasando de ser predominantemente positiva a pH bajos a ser negativa a pH altos, aunque también se caracterizan por tener un pH al cual son eléctricamente neutros. Son poderosos adsorbentes de aniones y cationes, en especial de micronutrientes y metales pesados.

La cantidad de un determinado ión adsorbido dependerá de la actividad de dicho ion en la disolución, del pH y de la fuerza iónica de las disoluciones. Para un pH dado, la adsorción aumenta al aumentar la actividad de este ión (Schwetmann y Taylor, 1989).

La capacidad de adsorción de los compuestos cristalinos es poco importante en el caso de bases débiles, por el contrario, para los ácidos débiles, los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio pueden presentar propiedades de adsorción importantes.

1. Introducción

Los óxidos de hierro, son los óxidos metálicos más abundantes en suelos. Se encuentran presentes en la mayoría de los suelos de diferentes zonas climáticas. Además de su participación en el color de los suelos, afectan a la estructura de los mismos, a menudo induciendo la formación de agregados y la cementación de otros tipos de componentes del suelo. Son además, la mayor fuente de Fe para las plantas.

Entre los óxidos de Fe destaca la ferrihidrita, que aparece en los suelos cuando el Fe se oxida y precipita en presencia de altos niveles de materia orgánica. Es común que con el tiempo, se transforme en otros óxidos de acuerdo con el ambiente del suelo, lo que conlleva una pérdida de disponibilidad de Fe en éste. Es un óxido pobremente cristalizado, también llamado fase amorfa que forma partículas esféricas muy pequeñas, de 3 a 7 nm de diámetro, las cuales generalmente, presentan un elevado grado de agregación. Posee elevada área superficial.

1.4.2.3. *Constituyentes orgánicos*

Están formados por la materia orgánica no viva del suelo. Se suelen clasificar en dos grupos: compuestos húmicos y no húmicos. Estos últimos están constituidos por residuos vegetales en vías de descomposición y comprenden productos de peso molecular muy variable, pero de naturaleza química bien definida, tales como proteínas, lípidos y ácidos.

Los compuestos húmicos se dividen en tres fracciones: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y humina. Todos poseen los mismos grupos funcionales (carboxílicos, fenólicos, alcoholes, carbonilo, etc.)

La materia orgánica tiene gran influencia en la solubilidad y disponibilidad del hierro para las plantas. La liberación de Fe durante la descomposición por microorganismos de los residuos orgánicos contribuye directamente a la nutrición férrica de los cultivos, pero el Fe liberado tiende a precipitar rápidamente y no estar disponible para la planta (Lindsay, 1991)

Son capaces de adsorber determinadas moléculas orgánicas así como también pueden dar lugar a la formación de compuestos metálicos como humatos y fulvatos.

1.4.2.4. Carbonato cálcico

La presencia de CaCO_3 en el suelo es importante, ya que da lugar a pH elevados e iones Ca^{2+} posibles sustitutos del Fe en los complejos y en estas condiciones se favorecen las reacciones de fijación de los complejos. También es importante su granulometría, ya que es una de las fracciones más finas, y por tanto, más activas químicamente.

1.4.3. Perdurabilidad

La degradación que sufren los complejos y quelatos en el suelo y su perdurabilidad son otros factores importantes que afectan a los complejos y que pueden verse afectados por: la acción de los microorganismos, factores climáticos, procesos de adsorción, desplazamiento del metal y de competencia con otros iones presentes en el medio.

La degradación afecta fundamentalmente a la parte orgánica de la molécula (ligando). En el caso de los quelatos sintéticos tradicionales se trata de un proceso lento, Lahav y Hochberg (1975) comprueban que el EDDHA permanece inalterado en suelos durante más de dos meses. Hernández-Apaolaza (1997) no encontró pérdidas de Fe-EDDHA en productos comerciales de 25 años, conservados en forma sólida. Factores como la biodegradación y la fotodegradación pueden afectar sobre la estabilidad de estos quelatos.

Como se ha podido comprobar son muchos los factores que afectan a la eficacia y persistencia de los complejos y quelatos además de su estabilidad. Es por eso que centramos nuestro trabajo en este aspecto.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

La utilización de complejos de micronutrientes y Ca puede ofrecer ventajas como sustitutos totales o parciales de los quelatos sintéticos, dado que son sustancias biodegradables y tienen un menor precio. Además, el agente quelante IDHA, que también es una molécula biodegradable, ha sido propuesto para su uso en agricultura.

Sin embargo, es necesario conocer sus características físicas y químicas y evaluar la eficacia estos productos como correctores nutricionales. De esta manera, se pueden proporcionar las herramientas necesarias para que por una parte, el sector productor agrícola, pueda tener un criterio adecuado de selección de los productos comerciales de mayor efectividad y por otra, complementar la legislación española y europea.

Por ello, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo 1

Obtener un método analítico que posibilite la determinación del elemento complejo en productos comerciales.

Para ello se compara el método de la resina (CEN EN 13366:2001) y un método de precipitación desarrollado a partir del publicado por la A.O.A.C. (Método Oficial 983.03) para la determinación de Fe quelado. El método seleccionado, combinado con adiciones sucesivas, se utiliza para definir la capacidad complejante de diversos agentes complejantes.

Objetivo 2

Estudiar la estabilidad de distintos complejos en disolución frente al pH y al tiempo y comparar su reactividad frente a materiales edáficos y suelos. Así como evaluar la eficacia como fertilizante de Ca y Zn en aplicaciones foliares.

De esta manera, se obtiene información sobre la viabilidad de los productos destinados para ser utilizados vía radicular, foliar o en fertirrigación.

Objetivo 3

Determinar del comportamiento agronómico de quelatos con el nuevo agente quelante IDHA.

Objetivo 3.1. Evaluar de la estabilidad química y de la reactividad con distintos suelos y materiales edáficos, así como de la eficacia para proporcionar Fe a plantas de pepino y soja cultivadas en hidroponía.

Objetivo 3.2. Comparar la eficacia del IDHA y EDTA para proporcionar micronutrientes en cultivos de tomate y judía verde en fertirrigación.

CAPÍTULO 3

COMPARISON OF TWO ANALYTICAL METHODS FOR THE EVALUATION OF THE COMPLEXED METAL IN FERTILIZERS AND THE COMPLEXING CAPACITY OF COMPLEXING AGENTS

3. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents.

	pag
3.1. Abstract	43
3.2. Introduction	43
3.3. Material and Methods	46
3.3.1. Chemical and Reagents	46
3.3.2. Fertilizers	46
3.3.3. Soluble metal analysis	49
3.3.4. Complexed metal analysis	50
3.3.4.1. CEN method	50

3. Comparison of two analytical methods

3.3.4.2. AOAC modified method	50
3.3.5. Effect of the organic matter removal and matrix modifier addition on AOAC modified method	51
3.3.6. Removal of organic compounds, matrix modifier and element quantification	51
3.3.7. Global interlaboratory trial	52
3.3.8. Metal complexing capacity analysis	52
3.4. Results and Discussion	53
3.4.1. Comparison of two methods for complexed metal determination	53
3.4.2. Effect of the organic matter removal and matrix modifier addition on AOAC modified method	57
3.4.3. Global interlaboratory trial	58
3.4.4. Complexing capacity	59

3.1. ABSTRACT

The aim of this research is to develop an analytical methodology for the determination of complexed element on fertilisers and then, to obtain an adequate criteria for the inclusion of this products on European Regulations on Fertilisers.

In this paper we compare the CEN method EN 13366:2001, based in the retention of the cations into a sulfonated resin and an AOAC modified method based on the precipitation of the inorganic forms at pH 9. A limited interlaboratory trial was carried out to demonstrate the applicability of the AOAC modified method and to study the effect of the removal of organic compounds and the addition of a matrix modifier solution before the element quantification. Then, a global interlaboratory trial was developed to evaluate the validation and quality parameters of the method.

As a second objective, the AOAC modified method was applied to the determination of the complexing capacity of complexing agents based on lignosulfonates and aminoacids.

The AOAC modified method was the choice methodology since it is adequate for the determination of complexing capacity of micronutrients in fertiliser.

3.2. INTRODUCTION

In Mediterranean Agriculture, micronutrient deficiencies are usually corrected using synthetic chelates or either natural or synthetic complexes (Lucena, 2003). Iron chlorosis is a problem in areas of calcareous and/or alkaline soils (Pestana et al., 2003) and the lack of zinc (Thind et al., 1990) and manganese constitutes an important problem too, due the low solubility of these elements in such as soils.

3. Comparison of two analytical methods

The use of synthetic chelates derived from polyamine-carboxylic acids is the most common and efficient agricultural practice to treat iron chlorosis and other micronutrient deficiencies (Álvarez-Fernández et al., 2005) but it is an expensive practice only used in cash crops. However, complexes are cheaper (2-4 € Kg⁻¹) than synthetic chelates (6-12 € Kg⁻¹) so they can be used in a larger number of crops despite their lower efficacy.

Complexes are obtained by complexation of the micronutrients with natural substances or biosolids in order to increase their availability to plants. Complexing agents normally used are lignosulfonates, aminoacids, organic acids, gluconates and humates, etc. Aminoacids extracts are mainly obtained from acid or enzymatic partial or total hydrolysis of polypeptides from animal processing industries. Lignosulfonates are by-products of the paper industry and gluconates are obtained by enzymatic oxidation (glucose oxidase and catalase) from glucose (Lantero and Shetty, 2005). Organic acids (mainly phenolic, acetic and carboxylic acids) are from different sources, mainly food industry residues such as potato juice.

The number of products containing synthetic chelates in the Spanish market is 553 in 2007 (Liñán, 2007) while the number of products containing complexes is 299 (150% more than in 1990). In 2007, lignosulfonates and gluconates were the preferred complexing agents used to form complexes (42% and 21% of the total number of products marketed, respectively). The commercialization of products containing aminoacids has slightly decreased along the years. Flavonoids only represent 0.3% of the total number of complexes marketed in 2007.

Despite the widespread use of complexes, and due to the lack of knowledge, the European regulations on Fertilisers do not list the complexing agents allowed to complex micronutrients. Most of these products, mainly the natural ones, have a variable chemical structure, since the raw materials from which they are obtained may vary with time. Also complexing agents are generally by-products of plant or animal processing industries, so they are a complex mixture of compounds with similar functional groups

but with variable complexing ability. Then its classification is difficult. Moreover, despite the concentration of the complexed element is one of the quality indexes required by the European and national Regulations, there is not analytical methodology available to determine the amount of the element complexed that is present in commercial products. In recent years, a lot of effort has been directed in providing analytical methods for the quantification of synthetic chelates (Lucena et al., 1996, García-Marco et al., 2006, EN 13368-2:2006), but not on complexes. As a consequence the quality of the synthetic chelates has improved considerably in the last years (García-Marco, 2005). In order to identify and characterize different complexing agents, different methodologies can be use (HPLC for aminoacids (Pfeifer et al., 1983), infrared for lignosulfonates (Karklins, 1981) and humates (Stevenson and Goh, 1971)). As far as we know there are no specific methods for the quantification of the element complexed by aminoacid extracts. For the quantification of metal chelated by humates, separation by coupled ion exchange column followed by detection by ICP-MS or cold vapour atomic fluorescence spectrometry (Appelblad et al, 1999) may be used. For the determination of the distribution of different elements among the molecular fractions of humic substances, size exclusion chromatography coupled on-line with UV-Vis spectrophotometry and ICP-MS (Sadi et al., 2002) or FAAS detection (Pérez-Sanz et al., 2006) methods are published. Also, gel permeation chromatography follow the ICP-AES or FAAS determination has been used for lignosulfonates (Brandt, 1991).

These methods apply to single complexing agents and are difficult to develop in a quality control of fertilizers program. However, for the determination of the complexed metal in a wide type of fertilizers, a sole and simple method that differentiates the complexed and the free forms of the metals should be used.

Therefore, the aim of our study is to present an experimental method for the determination of the complexed micronutrients in commercial fertilisers. We compare the CEN method (EN 13366:2001), with a precipitation one that is a modification of AOAC method (Official Method 983.03). For the validation of the new methodology, a

3. Comparison of two analytical methods

limited interlaboratory trial was carried out. In this test, the necessity of removal the organic compounds and addition of the matrix modifier solution was studied. Once the conditions for the application of the AOAC modified method were set, a global interlaboratory trial was carried out to evaluate the quality of results obtained and to determine the validation parameters for the analytical method.

Also, as a second objective, the proposed method was tested for its application in the quantification of the complexing capacity of ligands (lignosulfonates and aminoacids) in order to provide an adequate criterion for the inclusion of these products as complexing agents in European regulations on fertilisers.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Chemical and reagents

All reagents (in particular $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ used to form the complexes and titrate the complexing agents; HNO_3 , HCl , NaOH , H_2O_2 , used in the extraction of the soluble or complexed elements or to remove the organic compounds; and HCl , CsCl and LaNO_3 in the matrix modifier solution) and standards (EDTANa_2 , Titriplex III, Merck, and FAAS standards) were of recognized analytical grade. All water used for the preparation of reagent, standard or fertilizer solutions conforms to ISO 3696 (1987), grade I and free of organic contaminants.

3.3.2. Fertilizers

Complexing agents used were mainly lignosulfonates (LS) and aminoacids (AA). Solid NaLS1 (sodium lignosulfonate from fir, Germany and Norway) and NaLS2 (American modified sodium lignosulfonate) were provided by BASF-CURTEX (Tarragona, Spain) and their characteristics are shown in the table 3.1. The aminoacid extracts (AA) were provided by Bioibérica (Barcelona, Spain) and their characteristics are shown in the

table 3.2. In order to establish their complexing capacity 100 g L⁻¹ lignosulfonates solutions were prepared. Aminoacid extracts were directly used.

Table 3.1. Chemical composition of the lignosulfonate products NaLS1 and NaLS2

Analysis	NaLS1	NaLS2
Water content (g·Kg ⁻¹) ¹	75	37
Lignosulfonates (g·Kg ⁻¹) ²	677	348
C ³ (g·Kg ⁻¹)	450	305
H (g·Kg ⁻¹)	46.3	30.2
N (g·Kg ⁻¹)	1.4	0.6
S (g·Kg ⁻¹)	57.5	101.1
Na ⁴ (g·Kg ⁻¹)	69.8	180.8
K (g·Kg ⁻¹)	21.1	19.7
Ca (g·Kg ⁻¹)	1.1	0.09
Mg (g·Kg ⁻¹)	0.05	0.06
Fe (mg Kg ⁻¹)	316	170
Cu (mg Kg ⁻¹)	2.78	1.91
Mn (mg Kg ⁻¹)	5.41	5.42
Zn (mg Kg ⁻¹)	2.15	3.30

¹ determined by weight loss at 105°C

² Joyce and Kleinert, 1957

³ Elemental Analysis. Elemental Analyzer LECO CHNS-932.

⁴ Dissolution, filtration, mineralization and FAAS determination.

Fe(II)LS1, Fe(II)LS2, Zn(II)LS1, Zn(II)LS2, Cu(II)LS1, Cu(II)LS2, Fe(II)AA1, Fe(II)AA2, Zn(II)AA1, Zn(II)AA2 complexes, used for the comparison of the AOAC modified and CEN methods, were prepared from the lignosulfonates (NaLS1, NaLS2) and aminoacid extracts (AA1 and AA2) after addition of the appropriate amount of metal solution (200 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O or 100 g L⁻¹ ZnSO₄·H₂O or CuSO₄·5H₂O) to lignosulfonate solutions (100g L⁻¹) or aminoacid extracts.

Also complexes of a humate with Fe(II), Fe(III), Cu(II), Co(II) and Zn(II) were used for the comparison of the methods. EDTA complexed at various percentages (25%, 50%, 75% or 100%) with Fe(III), Cu(II), Co(II) and Zn(II) were prepared as reference.

3. Comparison of two analytical methods

Table 3.2. Chemical characterization of aminoacids extracts (AA1, AA2, AA3 and AA4).

Analysis	AA1	AA2	AA3	AA4
Free aminoacids ¹ (g Kg ⁻¹)	191	57	69	47
Total aminoacids ¹ (g Kg ⁻¹)	267	248	114	57
Hydrolysis degree ¹ (%)	71.8	23.0	60.3	81.8
Total N ¹ (g Kg ⁻¹)	56	42	14	11
α -aminic N ¹ (g Kg ⁻¹)	27.6	13.4	11.2	7.7
Ammonium N ¹ (g Kg ⁻¹)	4.29	2.29	0.86	0.95
Total P ¹ (g Kg ⁻¹)	1.57	0.47	0.69	0.10

¹Official Methods of Analysis (MAPA, 1994)

Table 3.3. Characteristics of products used in the limited interlaboratory trial.

Sample	Complexing agent	Element	Soluble element concentration (g Kg ⁻¹)
FeAA3	Aminoacid	Fe	53 ± 3
ZnAA3	Aminoacid	Zn	58 ± 10
AA multi	Aminoacid	Fe	4.1 ± 0.5
		Zn	5.0 ± 1.2
		Mn	5.0 ± 1.0
		Cu	4.1 ± 0.7
GA multi	Gluconate	Fe	12 ± 2
		Zn	17 ± 2
		Mn	11 ± 1
FeGA	Gluconate	Fe	88 ± 10
FeLS3	Lignosulfonate	Fe	120 ± 2
ZnLS3	Lignosulfonate	Zn	120 ± 13
Fe-CuH	Humate	Fe	3.1 ± 0.4
		Cu	2.9 ± 0.0

The humic system used in the preparation of the complexes was a humic acid extracted from leonardite using the International Humic Substances Society (IHSS)

methodology (Garcia-Mina et al., 2006). The main composition of the purified humic acid was: 585 g Kg⁻¹ C, 14.6 g Kg⁻¹ N, 26.9 g Kg⁻¹ H, 258 g Kg⁻¹ O, 0.1 g Kg⁻¹ P, 9.9 % S, 10.2 g Kg⁻¹ Fe, and 9.5 g Kg⁻¹ Al. The contents of C, H, and N were obtained using elemental analysis (LECO CHN 2000), whereas the contents of P, S, Fe, and Al were obtained by ICP-OES spectrometry (Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL). The content of O was calculated by difference. The main acidic functional group concentration, obtained using potentiometric analysis as described below was: 1.98 mmol g⁻¹ humic acid of carboxylic groups and 1.18 mmol g⁻¹ humic acid of phenolic groups.

In the limited interlaboratory trial the commercial complexes used were: lignosulfonates (FeLS3 and ZnLS3), aminoacids (FeAA3, ZnAA3 and AA multicomponent), gluconates (FeGA and GA multicomponent) and one humate (Fe-CuH). Their composition is given in table 3.3.

Table 3.4. Characteristics of products used in the global interlaboratory trial.

Sample	Complexing agent	Element	Soluble element concentration (g Kg ⁻¹)
ZnOA	Organic acid	Zn	47 ± 2
FeLS4	Lignosulfonate	Fe	54 ± 2
ZnLS4	Lignosulfonate	Zn	76 ± 4
FeGA2	Gluconate	Fe	62 ± 6
MnGA	Gluconate	Mn	78 ± 4

In the global interlaboratory trial the products used were: organic acid (ZnOA), lignosulfonates (FeLS4 and ZnLS4) and gluconate (FeGA2 and MnGA). Their characteristics are shown in table 3.4.

3.3.3. Soluble metal analysis

Determination of soluble element was made in all the complexes using the European Official method for fertilizers (method 9.2. EC 2003/2003 Regulation). In

3. Comparison of two analytical methods

brief, 5g of each product was shaken with 400 mL of Type I water during 30 minutes and then the volume was made to 500 mL. Solutions were filtrated. The soluble element in the fertilisers was determined after removal of organic compound (method 9.3. EC 2003/2003 Regulation) to allow the assessment of the element by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) without interference.

3.3.4. Complexed metal analysis

3.3.4.1. CEN method

The CEN method was applied in accordance with EN 13366. Five grams of each one of the commercial products were extracted for 30 minutes with water and then the volume made up to 500 mL with water and filtered. The conductivity was measured with a Crison micro CM 2200 conductivity meter. When the conductivity was higher than 1.5 dS m^{-1} , the samples were diluted. Fifteen millilitres of sample were placed into a 100 mL beaker and adjusted to pH 7.0 with HNO_3 0.1 M or NaOH 0.1 M. The solution was transferred to a 100 mL volumetric flask and diluted to the mark with Type I water. An aliquot of 25 mL was placed with an amount of resin corresponding to 2.5/CEC of wet sodic resin (Amberlite IR-120 Plus, Sigma) in a polyethylene recipient, protected with aluminium foil to avoid light exposure, and was shaken at $30\text{-}40 \text{ s}^{-1}$ for 4 hours. Samples were filtered and transferred to a 100 mL volumetric flask and made to volume with Type I water. The complexed element content was determined by FAAS after removal of the organic compounds (except for EDTA references and humate samples).

3.3.4.2. AOAC modified method

This method is based on AOAC Official Method 983.03 (1983). In brief 5 g of each of the complexes were dissolved in Type I water and volume made up to 500 mL. Two drops of H_2O_2 (33%, P.A.) were added to 20 mL of sample solution and pH rise to 9.0 with NaOH 0.5M (pH 10 in the EDTA and the humate complexes). pH was risen again to 9.0 after 30 minutes and the beaker stopped with parafilm. The solution was let to stand

for one day in dark. After, the pH was readjusted to 9.0 and the samples were transferred to a 100 mL volumetric flask and dilute to the mark with Type I water. These solutions were filtrated through 0.45 μm Millipore filter. If precipitation was observed then samples were centrifuged at 7500 min^{-1} at 15-25°C for 10 minutes before filtration.

The complexed element in the fertilisers was determined after removal of organic compound (except for EDTA references and humate samples) to allow the assessment of the element by FAAS.

3.3.5. Effect of the organic matter removal and matrix modifier addition on AOAC modified method

A limited interlaboratory trial with four laboratories was carried out in order to demonstrate the applicability of the AOAC modified method. Commercial samples (table 3.3) were sent to the participating laboratories for the determination of the soluble and complexed (AOAC modified method) elements and they were indicated to analyze two replicates. Each laboratory performed the final quantification following their own analytical procedures. Since variability was high, the effect of the removal of the organic compounds before the quantification and the addition of a matrix modifier for the quantification by FAAS were studied for all the samples considered using the AOAC modified method. Data were statistically evaluated using analysis of variance ($\alpha=0.05$) in order to find significant differences among methods. The parameters RSDr and RSDR for each method were obtained too.

3.3.6. Removal of organic compounds, matrix modifier and element quantification

Removal the organic compound was made in accordance with method 9.3. (EC 2003/2003 Regulation) using H_2O_2 (33% w/v) and HCl 0.5M for the digestion of the samples and 0.5% La as $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, 0.2% Cs as CsCl and 5% HCl as matrix modifier.

3. Comparison of two analytical methods

Micronutrients were quantified by FAAS using a Perkin Elmer Analyst 800 spectrophotometer with a hollow cathode lamp, with wavelengths and slit widths as recommended and a spoiler.

3.3.7. Global interlaboratory trial

Once the conditions for the application of the AOAC modified method were set, an interlaboratory test organized by the Grupo de Trabajo Sectorial de Fertilizantes (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) with seven participating laboratories was carried out to evaluate the quality of results obtained in previous experiments and to determine the validation parameters for the analytical methods used. Two replicates of soluble and complexed element were carried out by each participating laboratory. The soluble and complexed elements were measured by FAAS after the removal of organic compounds and the addition of the matrix modifier solution. The characteristics of the commercial products sent to the laboratories are shown in table 3.4. Statistical analysis was performed following ISO 5725-2:1994.

3.3.8. Metal complexing capacity analysis

The complexing capacity of different ligands was studied using a titration technique and the AOAC modified method. Increasing volumes (from 1 to 25 mL) of 200 g L⁻¹ solution of FeSO₄·7H₂O, and 100g L⁻¹ solutions of ZnSO₄·H₂O, MnSO₄·H₂O and CuSO₄·5H₂O were added over 20 mL of complexing agent solutions (100g L⁻¹ NaLS1 and NaLS2 and directly commercial products AA1, AA2, AA3 and AA4) and the complexed element determined by the AOAC modified method were assessed by FAAS after the removal of the organic compounds by digestion and addition of the matrix modifier.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1. Comparison of two methods for complexed metal determination

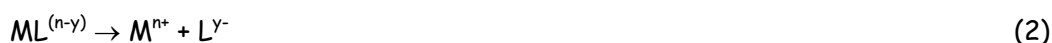
The percentage of complexed element respect the soluble element determined by both methods is presented in figure 3.1 to 3.4. Results obtained for EDTA reference samples are similar in the AOAC modified and CEN methods for all elements studied, except for Cu where CEN method obtained higher amounts of complexed element, and correspond adequately with the calculated percentage of complexation of the reference samples. These results were as expected since both methods are described for synthetic chelates. For humates, the results obtained using both methods are similar too, except for Zn and Co (figure 3.2 and 3.4), where 70% of the soluble Zn and 80% of soluble Co are considered complexed according the CEN method.

Only Fe and Zn were evaluated as soluble and complexed element for lignosulfonates and aminoacids. For lignosulfonates, CEN method give a slight lower percentage of complexed Fe than the AOAC modified method, but, in the case of Zn complexation, differences between methods are higher. For aminoacids the results showed a high difference between both methods. Assayed aminoacid extracts are weak complexing agents for Fe and Zn, but always the CEN method provided lower values.

CEN and AOAC modified method should offer equivalent results because in both methods the element that is not present in a neutral or negative complex is retained or precipitated. However, the chemical reaction in both methods can be more or less displaced toward the element retention or precipitation depending on the conditions. In CEN method the adsorption process is unspecific, but the sulfonic groups that are present in elevated concentrations in the resin can also act as complexing agents for metals (surface complexation) (reaction 1) favouring the release of the metal from the complex (reaction 2) producing a partial destruction of the complex:



3. Comparison of two analytical methods



This displacement should be nil in the case of strong complexes such as the EDTA ones, but of importance for weak complexes.

Something similar should happen in the AOAC modified method: the precipitation (reaction 3) can favour the displacement of the complex (reaction 2)



Since the displacement in the case of the CEN method is larger, the retention reaction (reaction 1) should be more displaced to the formation of products than in the case of the precipitation (reaction 3) indicating a higher affinity of the metals by the resin than for the precipitation reaction. Weak complexes are used in Agriculture in foliar applications and other purposes so the CEN method seems to be not adequate for this type of complexes. Moreover, if the formed complexes are not neutral or negative, they can be retained by the resin and then not quantified as complexed elements by the CEN method. Hence, the CEN method may not evaluate the total amount complexed element, so it is considered less adequate than the AOAC modified.

AOAC modified method can also produce slight displacement of the metals, mainly because pH is fixed to 9, where the precipitation is favoured. Nevertheless, it seems more suitable for the determination of the complexed element, because the complex must be able to maintain the elements in adverse conditions and not only to the pH of products. Moreover, it is an index that does not depend on the ionic form of the complex, but on the stability of the complex at pH 9, and therefore may be applied to determine the complexed element and to compare different complexing agents.

It has to be noted that the obtained value for the complexing capacity is an index, since metal and ligand exchange reactions (involving other ligands, metal complexes and other metals of the fertilizer) may occur during the analysis and therefore the total amount of complexed metal determined may differ from the original

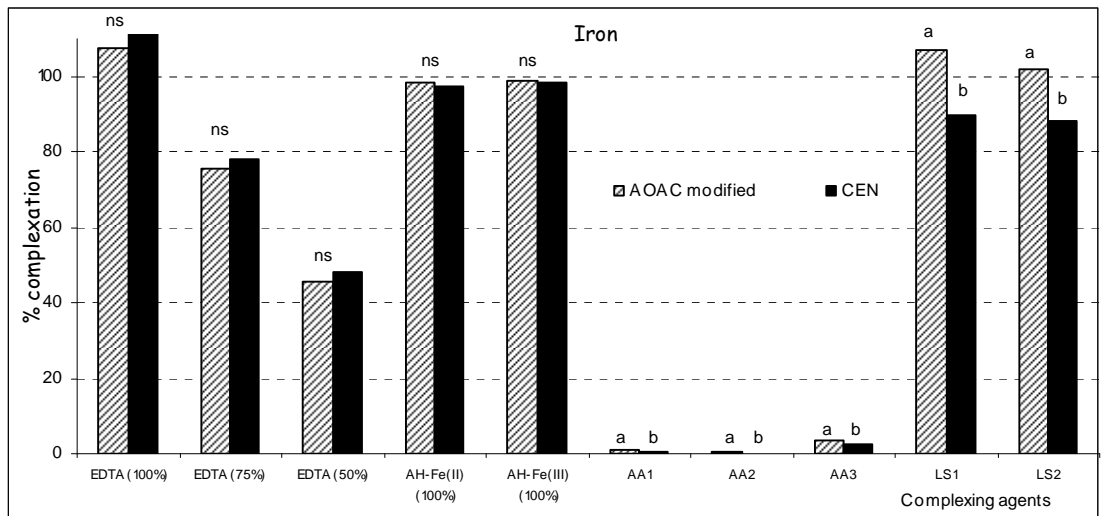


Figure 3.1. Complexed iron determined using CEN and AOAC modified methods in EDTA, humate, aminoacid and lignosulfonate products

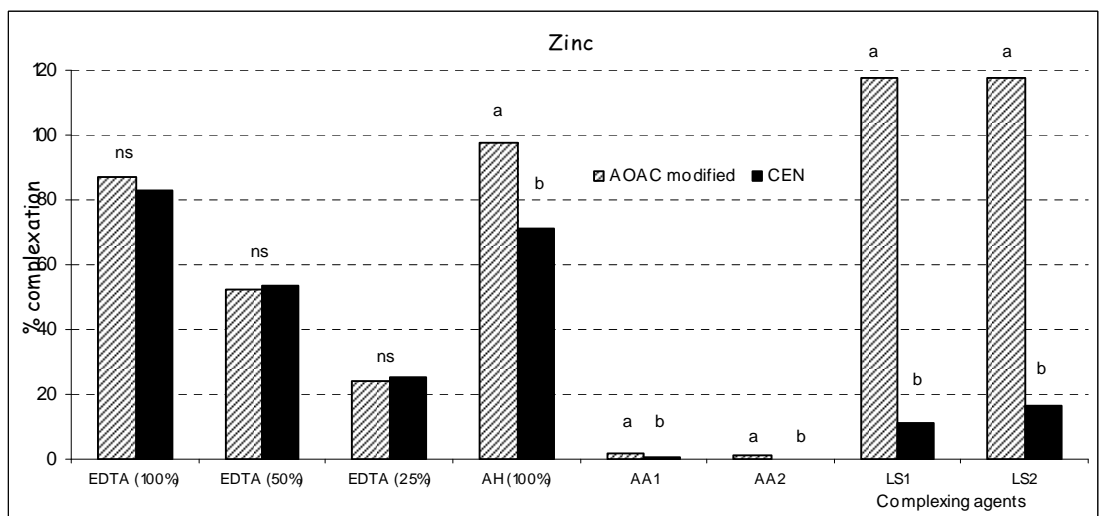


Figure 3.2. Complexed zinc determined using CEN and AOAC modified methods in EDTA, humate, aminoacid and lignosulfonate products.

3. Comparison of two analytical methods

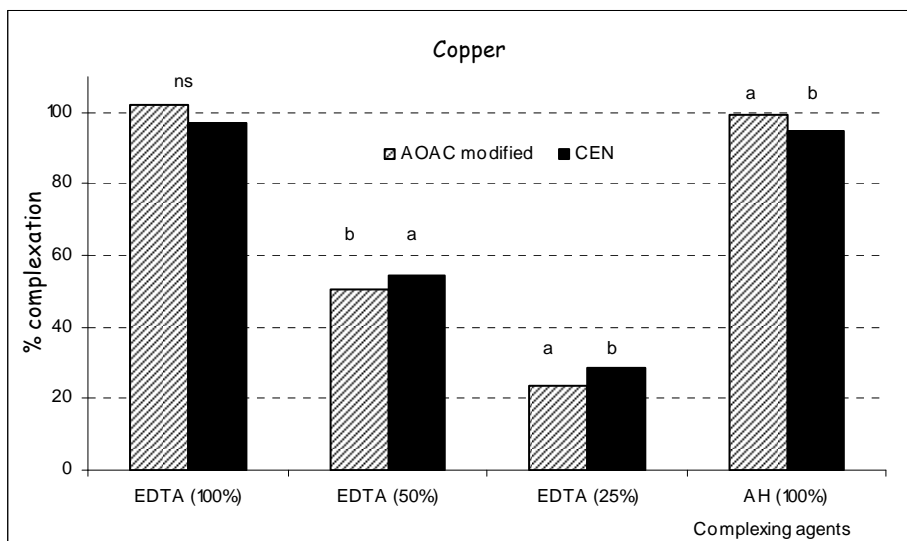


Figure 3.3. Complexed copper determined using CEN and AOAC modified methods in EDTA and humate products.

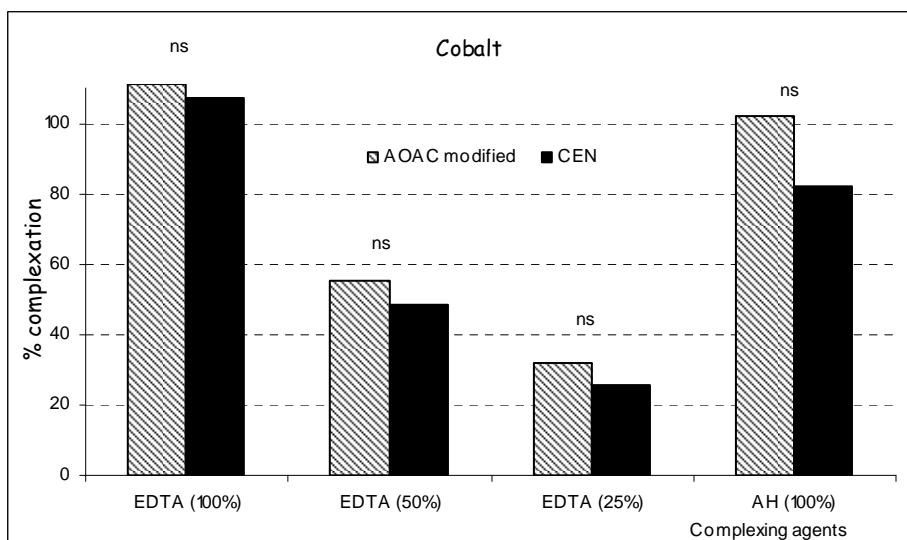


Figure 3.4. Complexed cobalt determined using CEN and AOAC modified methods in EDTA and humate products.

one. However, high pH conditions could well represent the situation that the complexes have to endure when they are applied in agronomic conditions.

3.4.2. Effect of the organic matter removal and matrix modifier addition on AOAC modified method

The results of the limited interlaboratory trial are shown in table 3.5. In general, the Relative Standard Deviation in repetitivity (RSDr) conditions and the Relative Standard Deviation (RSDR) in reproducibility conditions are quite high (average of RSDR = 30%). However it is important to note that for samples that comply with the Spanish Regulation RD 825/2005 (more than 50% complexed element) the variability is not so high for most of the samples (average of RSDR = 16%).

Table 3.5. Interlaboratory trial results. RSDr is the Relative Standard Deviation in repetitivity conditions and RSDR is the Relative Standard Deviation in reproducibility conditions.

Sample	Element	Complexed Element g Kg ⁻¹	% complexed element with respect soluble element	RSDr %	RSDR %
FeAA3	Fe	0.2	0.4	7.9	123
ZnAA3	Zn	12.3	21	13	28
AA multi	Fe	0.7	18	10	80
	Zn	3.1	62	9.4	20
	Mn	0.7	13	13	31
	Cu	4.6	112	0.7	4.7
GA multi	Fe	11.1	94	1.8	21
	Zn	14.4	83	1.4	36
	Mn	11.4	104	1.6	8.7
FeGA	Fe	78.6	89	1.5	5.3
FeLS3	Fe	119	98	4.9	5.5
ZnLS3	Zn	97.7	82	2.3	20
Fe-CuH	Fe	2.7	88	5.8	22
	Cu	2.6	90	2.3	16

3. Comparison of two analytical methods

Regarding the observed percentage of complexation (table 3.5), the aminoacids have a low complexing capacity for iron and manganese (0.4-18%), while gluconates have a good complexing capacity for Fe, Zn and Mn and lignosulfonates for Fe and Zn. The last two complexing agents present more than 50% of metal chelated, the minimum required for complexes in the Spanish Regulation. Copper and iron in the humate present low concentration of soluble element but the complexing capacity was satisfactory too.

The metal complexed as determined by the AOAC modified method could be an adequate index of the complexed metal micronutrients Fe, Mn, Cu and Zn but due to the large RSDr and RSDR values the method needs further standardization. Then the elimination of the organic matter and the addition of the matrix modifier solution before the determination by FAAS were studied. An ANOVA indicated that samples analyzed without the organic matter removal and without the addition of the matrix modifier presented significant ($p < 0.05$) lower values than those where both sample preparation techniques were used. These differences were observed using a global statistical analysis (including all the elements and samples) but they were especially important for Zn analysis. The comparison between the addition or not of the matrix modifier in samples where the organic matter was removed by digestion, did not yield statistical differences. However, and due to the recommendation of the EC 2003/2003 Regulation (Method 9.4 Determination of micro-nutrients in fertiliser extracts by atomic absorption spectrometry) to use it we decide to propose the use of the matrix modifier solution in the modified AOAC method.

3.4.3. Global interlaboratory trial

Results obtained in the global interlaboratory trial using the AOAC modified method are shown in the table 3.6. For complexed Zn determination, the repetitivity and reproducibility of the method are good.

The quality parameters obtained for the determination of the complexed iron are questionable. For FeGA2 the method is valid since none of the laboratories detected

appreciable amounts of complexed iron in the sample. The high values of RSDr and RSDR are consequence of the low value of complexed element that is near the quantification limit (0.7, 0.06 and 0.35 g Kg⁻¹ for Fe, Mn and Zn respectively)

Table 3.6. Global interlaboratory trial results of complexed element. RSDr is the Relative Standard Deviation in repetitivity conditions and RSDR is the Relative Standard Deviation in reproducibility conditions.

Product	Complexed Element g Kg ⁻¹	% complexed element with respect soluble element	RSDr %	RSDR %
ZnOA	44.7	96	0.6	2.5
FeLS4	44.6	83	6.4	15.3
ZnLS4	74.2	98	1.9	1.9
FeGA2	3.50	6	23.6	36.7
MnGA	70.9	91	4.5	17.4

Results of complexed manganese present quite high reproducibility due the disagreement among laboratories.

In summary the AOAC modified method has been revealed more reproducible than the CEN method for the determination of complexed Zn in products based in complexing agents. However, this method is not completely satisfactory for the determination of complexed Fe and Mn due the high values of RSDr and RSDR obtained in the global interlaboratory trial. Moreover, the AOAC modified method give better results than CEN method. Then we proposed the use of the AOAC modified method until a better method is developed.

3.4.4. Complexing capacity

Since the AOAC modified method seems a suitable methodology for the determination of the complexed fraction in commercial products, this methodology, combined with a method of successive additions, has been proposed to evaluate the complexing capacity of lignosulfonates and aminoacids.

3. Comparison of two analytical methods

3.4.4.1. Lignosulfonates:

Figure 3.5 shows the measured element versus added element. The type of curve obtained correspond to that presented in figure 3.6.a that have a rising segment, which corresponds with the complexing process, followed of another decreasing that implies the coagulation of the material by the excess of metal. Also in table 3.7 the complexing capacity obtained from the intersection point of the two obtained lines is presented. In general large amount of elements can be complexed by the lignosulfonates and the degree of complexation (percentage complexed respect soluble element) is high.

Table 3.7. Complexing capacity of lignosulfonates with Fe, Zn and Cu. Data are referred to the amount of product or to the amount of lignosulfonate in the product

Fe			
	mol Fe Kg ⁻¹ product	mol Fe Kg ⁻¹ Lignosulfonate	% FeL/soluble Fe
LS1	2.46	3.63	95
LS2	2.96	8.51	97
Zn			
	mol Zn Kg ⁻¹ product	mol Zn Kg ⁻¹ Lignosulfonate	% ZnL/soluble Zn
LS1	1.59	2.35	80
LS2	2.12	6.69	64
Cu			
	mol Cu Kg ⁻¹ product	mol Cu Kg ⁻¹ Lignosulfonate	% CuL/soluble Cu
LS1	2.87	4.24	95
LS2	3.69	10.6	95

3.4.4.2. Aminoacids:

In the titration of the aminoacid extracts two types of curves were observed. For Zn the one described in figure 3.6.b was the most common indicating a normal saturation curve with a slight coagulation effect. For Fe another type of curve (figure 3.6.c.) with four phases has been normally observed: Initially (I), at low Fe/AA ratio exits a low of complexation of the metal. It seems that the strongest complexing places

3. Comparison of two analytical methods

for Fe in the aminoacid extract produces coagulation or precipitation of the polypeptide. With an increase in the Fe concentrations (segment II) the normal complexing process

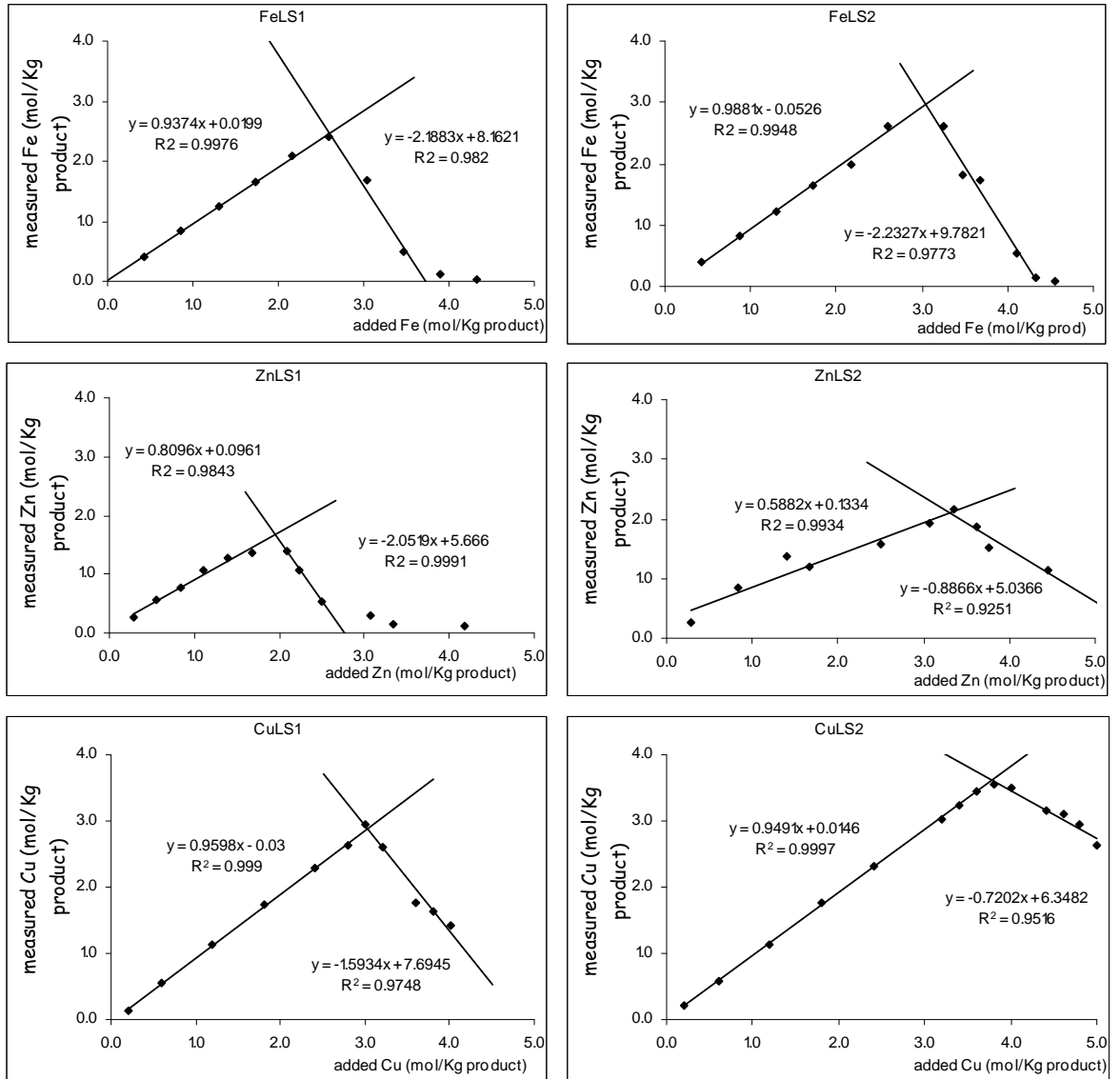


Figure 3.5. Complexing capacity for lignosulfonates with Fe, Zn and Cu.

3. Comparison of two analytical methods

has occurred, forming soluble complexes and Fe concentration measured increased. In the third phase (segment III) an increase in the addition of the metal does not imply more complexation, but the flocculation phenomenon is not important. Finally, an excess of iron created new complexing places, but they are weaker (low slope of the curve). It is

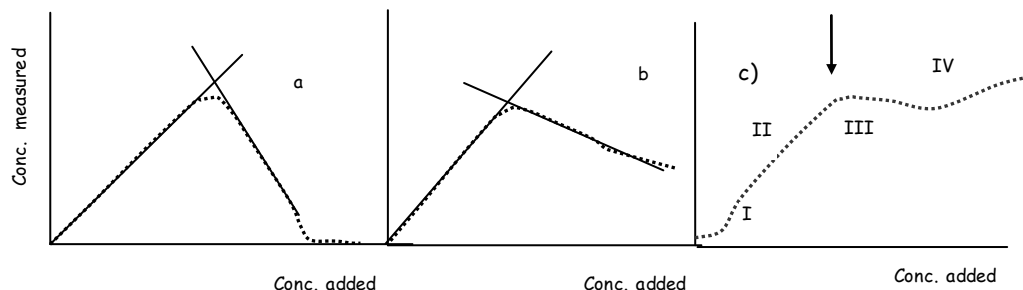


Figure 3.6. Types of titration curves observed for complexing agents with different metals. a) and b) typical, c) detected for some aminoacids titrations with Fe

necessary to emphasize that this second type of curves is the one that has motivated the election of maximum criterion for the quantification of the complexing capacity (value with the maximum complexation in the phase III) that is somewhat arbitrary, instead of the one of the intersection of the lines. However this is not a handicap for the application of the method, since in all the cases, when this type of curve appears the amount of element complexed or the degree of complexation are lower than that expected for the EC and Spanish Regulations, so they can not be considered complexes to be commercialized.

The AOAC modified method combined with addition of metals solutions may provide a tool for the determination of complexing capacity in lignosulfonates and aminoacids. Lignosulfonates presents a good complexing capacity, higher than required for the Spanish Regulation but in aminoacids the capacity of complexing metal is too low.

CAPÍTULO 4

EVALUATION OF MICRONUTRIENT AND Ca COMPLEXES AS FERTILIZERS IN SOIL, FERTIRRIGATION AND FOLIAR APPLICATIONS

**Evaluation of micronutrient and Ca complexes as fertilizers
in soil, fertirrigation and foliar applications.**

4.1. Abstract	67
4.2. Introduction	67
4.3. Material and Methods	69
4.3.1. Products	69
4.3.2. Perdurability of commercial products	69
4.3.3. Reactivity of complexes	71
4.3.3.1. Effect of pH and Ca ²	71
4.3.3.2. Stability in nutrient solution	71

4. Interaction of complexes

4.3.3.3. Interaction with soil and soil materials	72
4.3.4. Efficiency to provide Ca and Zn to cucumber plants	73
4.3.4.1. Plant experiments	73
4.3.4.2. Scanning electron microscopy	74
4.4. Results and Discussion	75
4.4.1. Perdurability of commercial products	75
4.4.2. Reactivity of complexes	78
4.4.3.1. Effect of pH and Ca ²	78
4.4.3.2. Stability in nutrient solution	79
4.4.3.3. Interaction with soil and soil materials	81
4.4.4. Efficiency to provide Ca and Zn to cucumber plants	83
4.4.4.1. Plant experiments	83
4.4.4.2. Scanning electron microscopy	85

4.1. ABSTRACT

Micronutrient and Ca deficiencies in Mediterranean Agriculture are usually corrected using synthetic chelates however or complexes. Despite the widespread use of complexes there is a lack of knowledge of their agronomic behaviour. Therefore the aim of this paper is to evaluate the complexes stability in solution with respect to pH and time, in concentrated nutrient solution and their reactivity with soils and soil materials. The efficiency of Ca and Zn complexes in foliar applications are also studied. In general, complexes present high stability in solution till pH 7-7.5 while interactions with soils and soil materials produce a high retention. The complexes have a high stability in solution with versus time and in concentrated nutrient solutions for irrigation systems. Zn complexes are effective in foliar applications; the effectiveness of the application of Ca complexes is low, as revealed the quantification of the Ca/K ratio in the cross section of the leaf by scanning electron microscopy.

4.2. INTRODUCTION

Micronutrient deficiencies occur in crops grown in calcareous soils and in acidic highly weathered soils. In these conditions, Fe, Mn and Zn deficiencies cause a low production of photosynthates (Miller et al., 1984) and proteins (Srivastava and Gupta, 1996) decreasing crop yield and fruit quality. Calcium deficiencies are normally caused by a poor distribution along the plant and a calcium increase in the soil is not always effective. In fact, the Ca deficiencies can occur even in calcareous soils.

In Mediterranean Agriculture, micronutrient and Ca deficiencies are usually corrected using synthetic chelates or either natural or synthetic complexes (Lucena, 2003). The use of chelates derived from polyaminocarboxylic acids is the most common and efficient agricultural practice to treat iron chlorosis (Álvarez-Fernández et al., 2005), although, for Zn deficiencies, sometimes chelates are no in effective. Moreover, chelates are an expensive practice and it's only used in cash crops. However, complexes are cheaper, so they can be used in a larger number of crops despite their lower efficacy.

4. Interaction of complexes

The number of products containing complexes commercialized in the Spanish market has increased more than three times in the last seventeen years (106 products marketed in 1990 and 323 in 2007 (Liñán, 2007). Other advantage of natural complexing agents is that they are biodegradable, so they are more environmental friendly than synthetic chelates.

Directive Community is studying the inclusion of these complexing agents in the fertilizer, however the Spanish Regulation, published in 2005 (R.D. 824/2005), include the list of complexing agents allowed for it's used in fertirrigation and in foliar applications. These products are lignosulfonic acid, gluconic and heptagluconic acids, free aminoacids, citric acid and humic substances.

Fertilizer can be applying to soils, in fertirrigation or by foliar sprays. For soil applications, high interactions are produced, but a high frequency and the localization of the applications may reduce element losses. In fertirrigation, fertilizers are added in soluble form and in low amounts but at high frequency. This process requires a localized application of the irrigation water and fertilizer (nutrient solution) (Resh, 1991). A nutrient solution has to pass different steps until it reaches the substrate (Medina San Juan, 1979). In general, nutrient solutions are prepared in acidic macronutrient fertilizer concentrates and then diluted with brackish and high HCO_3^- content waters. The final pH normally ranges between 4 and 6. The irrigation solution reaches substrates and when it is a calcareous substrate, the pH increases to 7-8.5. In foliar applications, fertilizers are added in solution and these products have to maintain the element in solution until their penetration through the cuticles. Then, fertilizers must have a good stability in solution for several days and maintain the element in solution in the pH range (around 5) which these products are applied.

In general, the decrease of the soluble form of elements in the soil solution reduces the agricultural value of the soil applied fertilizers. That decrease may be due to both the low stability in solution and the sorption phenomena on soil surfaces. For synthetic chelates, factors that affect sorption include the type of product, time, pH,

salt concentration and soil texture (Norvell, 1991). Chelates stability in solution experiments and interaction with soils and soil materials are an useful tool to predict their chemical stability and their agronomic behaviour. For these reasons, in this paper, these experiments were carried out to evaluate the possible used of complexes.

Despite the widespread use of complexes there is a lack of knowledge of their agronomic behaviour. Therefore the aim of this paper is evaluated the stability of iron and zinc complexes in different agronomic conditions and the reactivity with several soils and soil materials. For Zn and Ca complexes foliar applications to cucumber plants were also studied. Total element determination of the nutrient may result in byass due to the variability of the surface washing when fertilizers are applied in the leave. As an alternative technique, scanning electron microscopy has been used for the evaluation of the distribution of Ca and K through the cross section of the leaf treated with calcium complexes.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Products

Products used in the different experiments are: lignosulfonates (LS), aminoacids (AA), gluconates (GA) and humates (H) and their chemical characteristics are described in table 4.1. Percentage of soluble element determined by the method 9.2 (EC 2003/2003) and complexed element determined by the AOAC modified method (Villén et al., 2007) are included.

4.3.2. Perdurability of commercial products.

This experiment was carried out, to evaluate Fe and Zn complexes stability in solution along time. Complexes solutions (Fe-LS1, Fe-LS2, Fe-GA, Fe-H3, Zn-LS1, Zn-AA and Zn-GA products described in table 4.1) of $2.0 \cdot 10^{-3}$ M each element were prepared. The solutions were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore membranes and aliquots of 20 mL were transfered into sterile polyethylene flasks, the pH was adjusted to 7.0 with

4. Interaction of complexes

HCl or NaOH and volume was raised to 50 mL. The flasks were let to stand for 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 16 weeks at 25°C. An aliquot was mineralized following method 9.2. (EC 2003/2003 Regulation). Complexed element was determined by the AOAC modified method (Villén et al., 2207).

Table 4.1. Characteristics of iron and zinc complexes used in the stability in solution with pH and time and in concentrated nutrient solutions, interaction with soils and soil materials and in perdurability experiments.

Sample	Element	Soluble element (g Kg ⁻¹) ¹	Complexed element (g Kg ⁻¹) ²	Percentage of complexation (% complexed element with respect soluble element)
Fe-LS1	Fe	125 ± 1	114 ± 1	91
Fe-LS2	Fe	56.2 ± 0.1	48.8 ± 1.9	87
Zn-LS1	Zn	132 ± 3	130 ± 1	98
Zn-LS2	Zn	82.5 ± 1.7	80.4 ± 1.6	98
Fe-AA	Fe	57.5 ± 0.6	0.25 ± 0.01	0.43
Zn-AA	Zn	72.9 ± 2.2	20.7 ± 3.0	28
Mn-AA	Mn	60.5 ± 3.9	0.21 ± 0.03	0.35
Cu-AA	Cu	98.4 ± 1.9	23.6 ± 1.8	24
GA-multi	Fe	81.7 ± 1.2	80.3 ± 1.6	98
Zn-GA	Zn	20.8 ± 0.6	17.6 ± 0.35	85
Fe-H1	Fe	3.08 ± 0.04	2.70 ± 0.06	88
Zn-H2	Zn	54.8 ± 0.9	4.43 ± 0.47	8.09
Fe-H3	Fe	70.4 ± 1.6	69.3 ± 2.1	98
Zn-H3	Zn	109 ± 3	1.68 ± 0.15	1.54
Fe-H4	Fe	7.64 ± 0.09	7.26 ± 0.04	94
Zn-H4	Zn	5.88 ± 0.13	6.04 ± 0.26	102
Mn-H4	Mn	6.28 ± 0.06	6.34 ± 0.17	101

¹ European Official method for fertilizers (method 9.2. EC 2003/2003 Regulation).

² Complexed element (Villén et al., 2007).

4.3.3. Reactivity of complexes

To test the amount of soluble Fe and Zn that can be available to plants in different agronomic conditions, several experiments were carried out following the method described by Álvarez-Fernández, et al. (2002). In general, complexes were let to interact (three replicates) in solutions or with soil and soil materials (see below specific procedures). For all experiments blanks of complex solutions and blanks of soils and soil materials were prepared. Samples were made for triplicate. Interactions were made in the dark to avoid the possible photodecomposition of the complexes in the light. After the time considered, supernatants of the samples were filtered through a 0.45 μm Millipore membrane and pH was measured using an Orion Research Ion Analyzer (EA920). A 0.2 mL aliquot of 6.0 M HCl was added to 2.0 mL each filtrate and the soluble Fe and Zn were quantified by Atomic Absorption using a Perkin Elmer Analyst 800 spectrophotometer. For the experiment in nutrient solution Mn and Cu were also measured.

4.3.3.1. Effect of pH and Ca^{2+} : five millilitres of 2.0×10^{-3} M Fe and Zn complexes solutions (Fe-LS1, Fe-AA, GA-multi, Fe-H1, Zn-LS1, Zn-AA, ZnGA and Zn-H2 products described in table 4.1) were added to 25 mL type I water and 5 mL of 10^{-2} M buffer solution (HEPES, MES, CAPS, AMPSO) and 10^{-1} M CaCl_2 . Then pH was adjusted to 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 or 12.0 with HCl or NaOH and volume raised to 50 mL. Samples were placed in a shaker bath at 25°C and 56 min^{-1} for 3 days.

4.3.3.2. Stability in nutrient solution: In commercial greenhouses, the nutrient solutions are prepared concentrated and used diluted with the irrigation water. So, the stability of complexes in concentrated solutions was studied. Ten one-hundred times concentrated micronutrient solutions (see table 4.2 for composition) were prepared in irrigation water (0.1 g L^{-1} CaCO_3 and NaHCO_3). Five millilitres of each product were dissolved in 50 mL of irrigation water. The final micronutrient concentrations were corresponding to one hundred times concentrate of the normal Hoagland nutrient solution (mM): Fe 10, Mn 0.456, Zn 0.154 and Cu 0.0315.

4. Interaction of complexes

Table 4.2. Composition of the micronutrient solutions used in the experiment (product characteristics are shown in table 4.1).

Nutrient solution	Fe	Zn	Mn	Cu
NS1	Fe-LS1	ZnSO ₄	MnSO ₄	CuSO ₄
NS2	Fe-LS1	Zn-LS1	MnSO ₄	CuSO ₄
NS3	Fe-LS2	Zn-LS2	Mn-LS2	Cu-LS2
NS4	Fe-LS2	ZnSO ₄	MnSO ₄	CuSO ₄
NS5	Fe-AA	ZnSO ₄	MnSO ₄	CuSO ₄
NS6	Fe-AA	Zn-AA	Mn-AA	Cu-AA
NS7	Fe-H3	Zn-H3	MnSO ₄	CuSO ₄
NS8	Fe-H4	ZnSO ₄	MnSO ₄	CuSO ₄
NS9	Fe-H4	Zn-H4	Mn-H4	CuSO ₄
NS10	GA-multi	GA-multi	GA-multi	GA-multi

4.3.3.3. Interaction with soil and soil materials: An amount of materials (table 4.3) was allowed to interact with 5mL of $4.0 \cdot 10^{-4}$ M solutions of complex solutions (products described in table 4.1) and 5 mL of $2.0 \cdot 10^{-2}$ M CaCl₂ and $2.0 \cdot 10^{-3}$ M HEPES (pH=8) in sterile polyethylene flasks. The materials have been elsewhere described (see annex 1). The flasks were shaken at 56 min^{-1} for 1 hour, and then were allowed to stand for 3 days in a thermostated incubator at 25 °C.

Table 4.3. Weight of soils and soil materials used in the interaction test. Their chemical characteristics are shown in support information

Soil or soil material	Weight (g)
Peat	0.2
Ca-Montmorillonite	0.2
Illite	0.2
Ferrihydrite	0.1
Sudanell soil	2.0
Carlet soil	2.0
StCS (Standard Calcareous Soil)	2.0

4.3.4. Efficiency to provide Ca and Zn to cucumber plants.

4.3.4.1. Plant experiments: Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Ashley) plants were obtained from cucumber seeds germinated in standard seed germination papers. The bottom of the rolled papers were placed in a macronutrient solution with the following composition (mM): 1.0 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.9 KNO_3 , 3.0 MgSO_4 , 0.1 KH_2PO_4 in the growth chamber for 7 days with a light/dark regime of 16/8 h, 30/25°C temperature and 50/70% of humidity. The stems of two plants were wrapped together with foam and placed in 2 L polyethylene vessels (3 holes for lid, 6 plants per pot).

For Zn deficiency, plants grew during 3 days in a continuously aerated solution of the following initial composition: macronutrient solution as before; cationic micronutrients (mM) (full buffered micronutrient nutrient solution) 10.0 EDDHA/ Fe^{3+} , 2.5 MnSO_4 , 1.0 CuSO_4 , 10.0 ZnSO_4 , 1.0 NiCl_2 , 1.0 CoSO_4 , 115.5 Na_2EDTA , 231 KOH ; and anionic micronutrients (μM) 35.0 M NaCl , 10.0 H_3BO_3 and 0.05 Na_2MoO_4 . The pH was buffered at 7.5 with $1.0 \cdot 10^{-4}$ M HEPES. After this time, the cationic micronutrient solution was changed for the following one (μM): 10.0 EDDHA/ Fe^{3+} , 2.5 MnSO_4 , 1.0 CuSO_4 , 1.0 NiCl_2 , 1.0 CoSO_4 , 105.5 Na_2EDTA and 231 KOH .

4. Interaction of complexes

For calcium deficiency, the nutrient solution used since transplanting was: macronutrients (mM) 0.25 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.4 KNO_3 , 0.3 MgSO_4 , 0.1 KH_2PO_4 , 0.8 NaNO_3 ; and the full buffered micronutrient and anionic micronutrient solution and pH 7.5 buffer. Water was added every two days and the solution renewed every week.

Zn and Ca foliar applications were made 9, 16 and 23 days after transplanting. Zn ($0.25 \text{ mg Zn mL}^{-1}$) was applied as Zn-LS1, Zn-GA, Zn-AA, Zn-H4 products (described in table 4.1) or ZnCl_2 and Ca ($0.25 \text{ mg Ca mL}^{-1}$, 2.5 mL per two plants) as Ca-LS (soluble Ca 14.4%), Ca-AA (8.0%), Ca-GA (8.4%), Ca-H (8.5%)) products or CaCl_2 . Nutrient concentrations were taken according to manufactures recommendations. Three replications were prepared for each treatment and five for the control (hydroponics complete nutrition).

Whole plants (a pair of plants) were sampled 16, 23 and 30 days after transplanting. The sampled roots and leaves were separated and washed first with Tween 80 in 0.1 M HCl for 10 seconds (Álvarez-Fernández et al., 2001), and then with abundant distilled water, weighted and dried. Macro and micronutrients were determined in leaves and roots after dry digestion procedure by AAS.

4.3.4.2. Scanning electron microscopy: Leaves treated with Ca complexes were washed and dried. A small square of the central part of the leaves was cut with a scalpel. An epoxidic resin (EPO-150, CTS, Madrid. Spain) mixed with the catalyst (K-151, CTS, Madrid. Spain) in a 100/25 g proportion was added to polyethylene flasks and to let stand for 30 minutes. Then, the fragment of leaf was place over the resin and vacuum was applied for 30 minutes. The rest of the resin was added and the polyethylene flasks were placed in the stove at 60°C for 24 h.

When resins were completely hardened, they were cut in fragments of 0.5 cm^2 approximately, allowing cross section of the leaf to show up. The faces with the cross section of the leaf were polish consecutively with 15, 9 and $3 \mu\text{m}$ sandpaper. Then, fragments were sprayed with N_2 and washed into an ultrasound bath with hexane during

1 minute. After, the hexane was removed and the hexane wash was repeated once again. A Sputter Coater SC502 was employed to cover with gold.

The distribution of Ca and K through the cross section of the leaf treated with calcium complexes was determined with a scanning electron microscopy Philips XL30, connected to EDAX DX4i analyzer.

Data were processed using the Statistical Package Social Science PC 13.0. Duncan's multiple range test ($\alpha = 0.05$) was used to test for differences among means.

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1. Perdurability of commercial products. In table 4.4 and 4.5 the percentage of soluble and complexed element for Fe and Zn complexes are shown. For Fe-LS1, Fe-LS2, G-multi and Zn-LS1, the amount of soluble and complexed element present in solution are high and constant with time. Fe-H3 has a good level of soluble Fe, but the percentage of complexed Fe is very low. For Fe-AA soluble and complexed element are low for all the periods of time studied. In the case of Zn-AA, the concentration of soluble element is high for the first 21 days and then, begins to decrease with time; however, the concentration of complexed Zn is low and constant with time.

Results of soluble and complexed element in solution are constant with time along the experiment for all the products, except for Zn-AA. Moreover, during the experiment, pe values were also measured (data not shown) and they are constants for the times studied and demonstrated that microbial degradation is not a key factor.

In summary, lignosulfonates and gluconatos are stable complexes versus time while humates and aminoacids may have problems of stability or percentage of complexation.

4. Interaction of complexes

Table 4.5. Concentration (mM) of soluble and complexed element for different Fe complexes and at different times. Results are means \pm SD (n = 3).

Time (days)	7	14	21	28	42	56	84	112
Soluble element (mM)								
Fe-LS1	0.64 \pm 0.01	0.62 \pm 0.01	0.67 \pm 0.00	0.63 \pm 0.01	0.66 \pm 0.02	0.66 \pm 0.00	0.65 \pm 0.03	0.70 \pm 0.04
Fe-LS2	0.66 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01	0.72 \pm 0.03	0.65 \pm 0.00	0.66 \pm 0.01	0.70 \pm 0.01	0.69 \pm 0.04	0.71 \pm 0.00
Fe-AA	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
G-mult	0.62 \pm 0.01	0.59 \pm 0.00	0.66 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01	0.64 \pm 0.00	0.65 \pm 0.00	0.67 \pm 0.02	0.69 \pm 0.01
Fe-H3	0.65 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01	0.69 \pm 0.03	0.64 \pm 0.01	0.66 \pm 0.02	0.64 \pm 0.04	0.64 \pm 0.04	0.64 \pm 0.00
Complexed element (mM)								
Fe-LS1	0.70 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01	0.65 \pm 0.00	0.64 \pm 0.01	0.66 \pm 0.01	0.67 \pm 0.01	0.68 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01
Fe-LS2	0.70 \pm 0.01	0.64 \pm 0.01	0.66 \pm 0.02	0.65 \pm 0.01	0.68 \pm 0.00	0.71 \pm 0.00	0.69 \pm 0.02	0.66 \pm 0.03
Fe-AA	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.04	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
G-multi	0.66 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02	0.62 \pm 0.01	0.61 \pm 0.00	0.66 \pm 0.01	0.64 \pm 0.01	0.66 \pm 0.01	0.63 \pm 0.02
Fe-H3	0.06 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.14 ₇₆ \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00

Table 4.6. Concentration (mM) of soluble and complexed element for different Zn complexes and at different times. Results are means \pm SD (n = 3).

Time (days)	7	14	21	28	42	56	84	112
Soluble element (mM)								
Zn-LS1	0.58 \pm 0.00	0.57 \pm 0.02	0.55 \pm 0.02	0.58 \pm 0.00	0.57 \pm 0.00	0.59 \pm 0.00	0.62 \pm 0.01	0.61 \pm 0.02
Zn-AA	0.60 \pm 0.00	0.59 \pm 0.00	0.58 \pm 0.01	0.28 \pm 0.08	0.14 \pm 0.03	0.16 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03
Zn-GA	0.65 \pm 0.01	0.65 \pm 0.00	0.62 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01	0.62 \pm 0.01	0.64 \pm 0.00	0.63 \pm 0.01	0.63 \pm 0.02
Complexed element (mM)								
Zn-LS1	0.53 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	0.52 \pm 0.02	0.55 \pm 0.10	0.56 \pm 0.01	0.55 \pm 0.01	0.59 \pm 0.01	0.61 \pm 0.01
Zn-AA	0.03 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01
Zn-GA	0.03 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01

4.4.2. Reactivity of complexes

4.4.2.1. *Effect of pH and Ca^{2+}* : Figure 4.1 shows the percentage of elements remaining in a 0.1 M $CaCl_2$ solution respect to pH. Due the high variability between final and initial pH, results are presented versus final pH.

For Fe-LS1 (figure 1a), the percentage of iron remaining in solution is around 80-85% until pH 6.5. At high pH, there is a decrease and Fe in solution and it's near 38 % at pH 9 and 5% at pH 10. The percentage of Fe remaining in Fe-AA decreases to 12% at pH 3 and at higher pH, iron recovery is practically nill. Fe-GA maintains around 40% of iron in solution at pH 5. Then, iron recovery reaches a minimum in the pH range of 5-7 and then, increase to 30% for pH higher than 11. The percentage of iron remaining in solution for Fe-H1 is lower than 10% at any pH.

For Zn complexes (figure 1b), the amount of soluble element remaining in solution is higher than for Fe complexes. Zn-LS2 maintains in solution around 90-100% of the added zinc bellow pH 8 and even 80% at pH 9; then, this percentage decreases to 1% at pH 10 and 19% at pH 12. Zn-GA and Zn-H2 have a similar behaviour. For pH lower than 8, the 90% of the added zinc remain in solution but at pH 8.5 only 20% is present. Zn-AA maintains in solution around 80% of the added Zn bellow pH 7.5 and then this percentage decrease to 5% for pH higher than 9.

Due the high variability in the chemical composition of the complexing agents, stability constants cannot be determined. For this reason, in this work the stability in solution with pH and the percentage of complexed element were related.

Fe and Zn lignosulfonates presented a high percentage of complexation (see table 4.1) and both products maintain in solution around 90-100% until pH 7.5 for Zn and pH 6.5 for Fe complexes. Gluconates also present high percentage of complexation, and soluble Zn is around 100% until pH 7.5 but soluble Fe is near to 30% for pH from 4.5 to 11. GA-multi contains, beside Fe, Mn, Zn and Cu in its formulation, and the low percentage of soluble Fe remaining in solution may be due to Fe displacement ($\text{Log FeL} = 5.52$, (Pecsok and Sandera, 1955)) from the complex for other micronutrient as Cu ($\text{Log CuL} = 18.29$, (Martell, 1989)).

The presence of alcohol binding groups favor that a very high pH the complexing capacity increase. That can be the explanation for the slow increase of stability observed for the Fe-GA as the pH increased

Fe-H1 has a high percentage of complexed element and low stability in solution at any pH. This behavior may be due for the coagulation of the material by the Ca present in the interaction solution. Despite the low percentage of complexed element, Zn-H2 has a good percentage of complexation and high stability in solution. These results are in good agreement with these presented by García-Mina et al. (2004) who demonstrated that Zn complexes with humates have the greatest stability for pH values of 7 and 8, which correspond to those of neutral and alkaline soils.

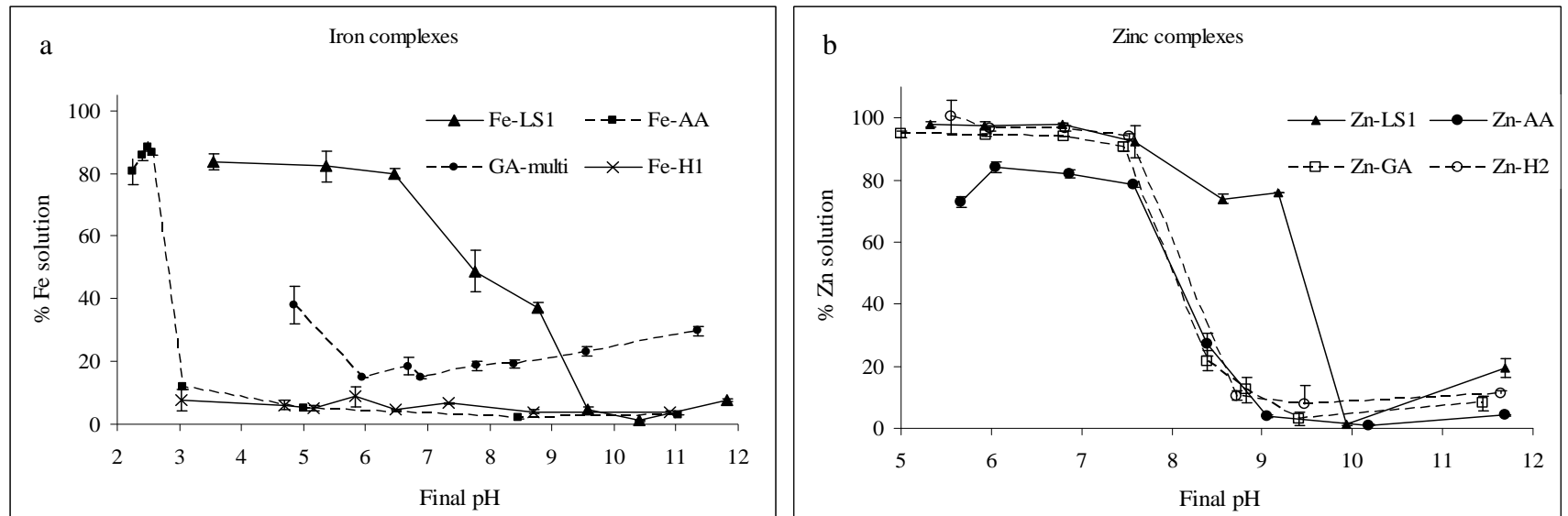
Fe-AA has the lowest complexing capacity among the studied complexes, and the percentage of Fe in solution is around 10% for all the pH values except for pH lower than 3 where the high concentration of Fe remaining in solution is due to the presence of inorganic forms as the theoretical speciation made use MinteqA2 (Allison et a., 1990) reveals. Nevertheless, the percentage of Zn complexed for the amino acid (28%) is higher than for Fe (0.43) and soluble Zn in solution after the interaction is close to 80% until pH 7.5. In commercial products, polypeptides and free aminoacids are found. Fe complexation is favored when polypeptides are presented in the formulation due the geometric demand of Fe as occurred in synthetic chelates. Although the complexation between free amino acids and metals are, in general low, there is a higher affinity between Zn and glycine, methionine, cysteine, aspartic acid, arginine, tyrosine and histidine. Fe only forms stable complexes with cysteine and glutamic acid. This may be the explanation for the greater stability of Zn-AA in solution than Fe-AA (see supporting information for theoretical stability diagrams of metal complexes of micronutrients in agronomic conditions).

4.4.2.2. Stability in nutrient solution:

Results show, in general, a good stability of the complexes in all concentrated nutrient solutions (NS) prepared (data not shown). Fe remain in solution is near 100%, except for NS5 and NS6 which contain aminoacids. As expected, the aminoacid present low

4. Interaction of complexes

Figure 4.1. Effect of final pH on the percentage of Fe (a) and Zn (b) remaining in solution respect to the amount of element added in Fe and Zn complexes at 3 days. Results are means \pm SD (n = 3).

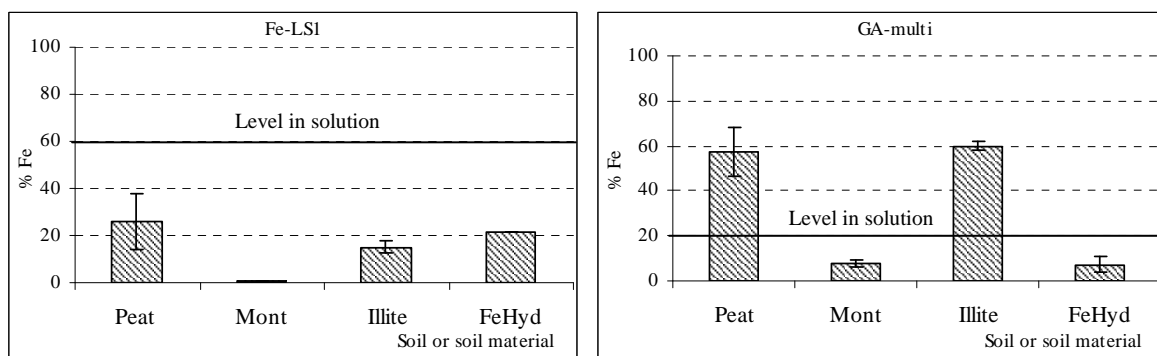


4. Interaction of complexing agents with soils

stability due the low percentage of complexed element (0.43 %) and this may produce the element precipitation in the dripper. For Zn a 100% recovery is observed, but even when it is added as inorganic form.

4.4.2.3. *Interaction with several soil and soil materials:* The percentage of Fe remaining in solution after 3 days interactions is presented in figure 4.2. Also, as reference, the level of Fe in solution at pH 8.0 (from figure 4.1) is indicated. Complexes had a high retention since Fe in solution is lower than 25% for Fe-LS1 and 60% for GA-multi in all soils and soil materials studied. Both calcareous soils and the Standard Calcareous soil (StCS) reacted more extensively with the complexes (data not shown). For Fe-LS1, relatively high amounts of Fe are recovery after the interactions with peat and ferrihydrite due the final pH for these materials are around 3.8 and 4.6 respectively, and Fe in solution is high for GA-multi when interacts with peat; however the interaction with ferrihydrite for this product presents the lowest value of Fe in solution. For Fe-AA1 and Fe-H1 (data not shown), Fe concentration in blanks of products (without soils or soil materials) were quite low, in a good agreement with the results of stability in solution with pH experiment. After the interaction, the amount in solution with pH was null.

Figure 4.2. Results of interaction of Fe complexes with several soils and soil materials during 3 days. Results are means \pm SD (n = 3).). Level in solution is the approximate percentage of Fe in solution at pH 8.0 (figure 4.1).

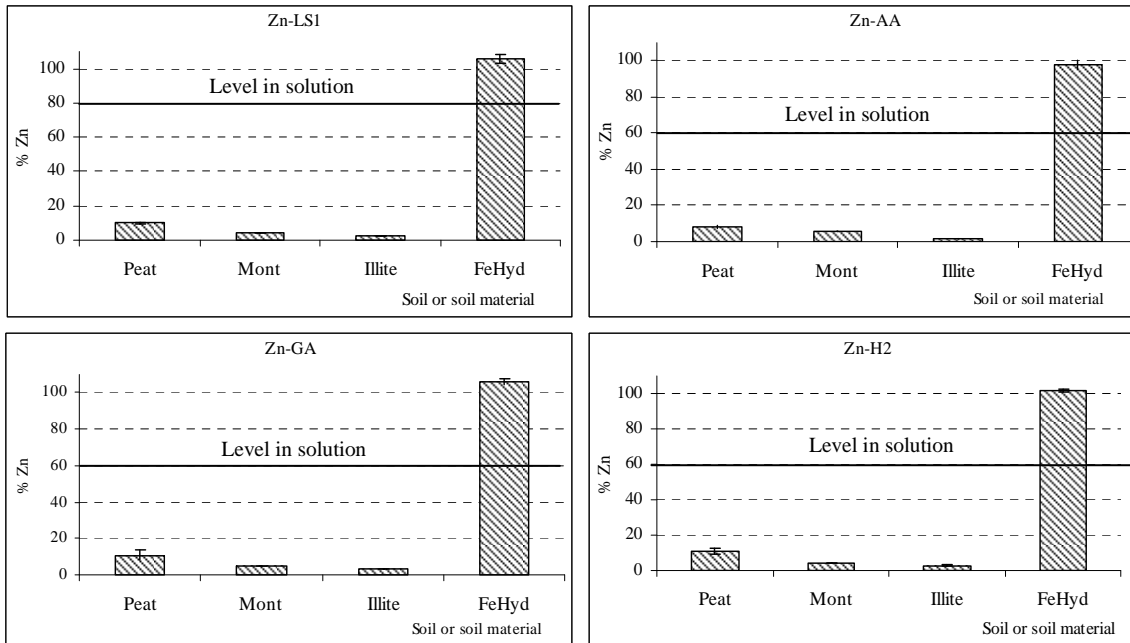


Results of Zn complexes interaction with soils and soil materials are shown in figure 4.3 and the level of Zn in solution at pH 8.0 is also included. There is a large

4. Interaction of complexes

reduction of the amount of soluble Zn and only ferrihydrite maintains around 100% for the complexes studied. Interaction of complexes with calcareous soils produce the high reduction of soluble Zn (data below detection limit). Less retention can be found after interaction with peat and the two clays. Retention in illite is higher than in Ca-montmorillonite.

Figure 4.3. Results of interaction of Zn complexes with several soils and soil materials during 3 days. Results are means \pm SD (n = 3). Level in solution is the approximate percentage of Fe in solution at pH 8.0 (figure 4.1).



In this type of studies a decrease of the element concentration in solution can be due to complex sorption, element displacement from the complex followed by precipitation, or complex degradation. In this experiment, the largest interactions are produced between Fe and Zn complexes with calcareous soils and the StCS. For these interactions, the final pH was around 8.0 and the stability in solution with the effect of pH experiment (see figure 4.1) shows that for pH higher than 7-7.5 there is a large decreased of element remaining in solution for all the complexes studied. Moreover, at pH of calcareous soils, inorganic iron readily precipitate as oxides and form coatings on

4. Interaction of complexing agents with soils

the carbonate minerals (Uygur and Rimmer, 2000) and inorganic zinc co-precipitated with both iron and manganese oxides or form franklinite ($ZnFe_2O_4$) (Lindsay, 1972). Kiekens (1980) also studied zinc being irreversibly fixed by the soil. Interactions with illite and Ca-montmorillonite produce a high retention too due the high specific surface area and that the final pH values after interactions were 7.5-8.0.

Organic matter and iron oxides contributes to an important portion of the surface charge of soil and although large interactions with peat and ferrihydrite would be expected, these materials produce lower losses of soluble element than other soil materials due to the low pH values found at the end of the experiment (around 5 for ferrihydrite and 4 for peat). However, the amount of soluble Zn remaining in solution after their interaction with ferrihydrite is high. At low pH, this ferrihydrite is positively charged (point of zero charge around 5.75) and may not, so an electrostatic interaction with positive Zn complexed may be impaired.

4.4.3. Efficiency to provide Ca and Zn to cucumber plants

4.4.3.1. Effect of Zn complexes in cucumber plants: In general, plants (see annex, plate S1) treated with Zn complexes before the second sampling time present normal visual aspect and growth and comparable with control (hydroponics complete nutrition). Only plants treated with Zn-H4 and -Zn had a lower development.

In table 4.6 the biometric data and the total amount of Zn in roots are presented. There are no significant differences on leaf and dry weight between the control and the treatments Zn-GA, Zn-LS1, Zn-AA and ZnCl₂. However, Zn-H4 and -Zn present lower weight. The total concentration of Zn in roots (the sum of the three sampling times) is an indicative of the transport of this element from the leaves to the roots and is higher for Zn-GA, Zn-LS1, Zn-AA and control. Zn-H4 and -Zn treatments had significant lower values. Results between -Zn and the other treatments including the control, show that element penetration in the leaves has occurred and there is a good distribution of the element along the plant.

4. Interaction of complexes

Table 4.6. Effect of the different Zn complexes treatments on leaf and root Zn concentrations. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

Treatment	Dry weigh (g plant ⁻¹)		Total Zn ($\mu\text{g dry root}^{-1}$)
	root	leaves	
Zn-LS	0.45 abc	1.86 a	94.4 b
Zn-AA	0.39 bc	1.53 ab	77.4 b
Zn-G	0.73 a	2.12 a	220.8 a
Zn-H	0.21 cd	0.98 b	48.5 cd
ZnCl ₂	0.47 abc	1.42 ab	58.4 c
- Zn	0.09 d	0.23 c	33.0 d
Control	0.59 ab	1.77 a	93.3 b

In this experiment, there is no good relationship between effectiveness and percentage of complexed element in the products. The total amount of Zn in roots is higher for plants treated with Zn-GA, however the percentage of complexed Zn for this product (see table 4.1) is lower than Zn-H4 and Zn-LS1. Moreover, among complexes, the worst Zn nutrition is for Zn-H4 treatment and its percentage of Zn complexed is 100%. The organic matter coagulation and element precipitation in leaves may be the causes of the poor Zn nutrition.

4.4.3.2. Effect of Ca complexes in cucumber plants: In table 4.7 results of dry matter of leaves and roots and the total concentration of Ca in the roots are shown. In plants treated with Ca-LS, Ca-H, -Ca and control have a higher dry weight in leaves, while, for roots all the treatments present lower values than control.

4. Interaction of complexing agents with soils

The total content of Ca in roots (the sum of the three sampling times) does not show significant differences among treatments except for control. This can be explained because Ca moves by xylem so, there is a poor element distribution along the plant. But it is necessary to know if Ca has penetrated in the leaves.

Table 4.7. Effect of the different Ca complexes treatments on leaf and root Ca concentrations. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

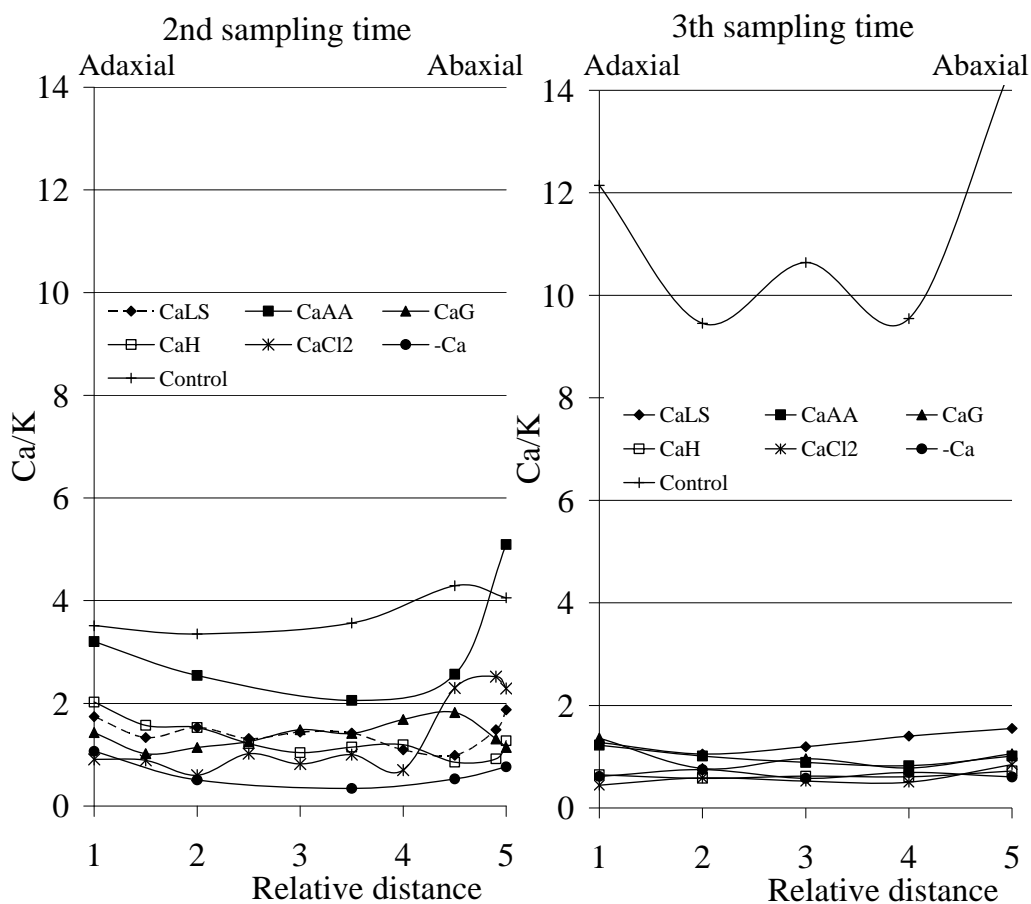
Treatment	Dry weigh (g plant ⁻¹)		Total Ca ($\mu\text{g dry root}^{-1}$)
	root	leaves	
Ca-LS	0.28 b	1.23 ab	3.92 b
Ca-AA	0.28 b	0.99 b	3.35 b
Ca-G	0.13 b	0.57 b	5.03 b
Ca-H	0.23 b	1.11 ab	3.19 b
CaCl ₂	0.20 b	0.91 b	3.02 b
-Ca	0.26 b	1.35 ab	3.54 b
Control	0.59 a	1.77 a	15.2 a

4.4.3.3. *Scanning electron microscopy*: In a previous experiment (see plate S2 annex 1) foliar application to cucumber plants of two different Ca lignosulfonates was studied. Results showed that Ca/K ratio for control (complete nutrition) and Ca deficient treatments are constants along the cross section of leaves. For the most effective Ca-lignosulfonate product, Ca/K ratio was higher in the first and last points than in the middle ones. This behaviour may be explained for Ca penetration on the leaves. For the other Ca-lignosulfonate treatment, Ca/K ratio was similar to Ca deficient treatment. That experiment suggested that scanning electron microscopy could be a useful tool for obtain the penetration pattern of Ca products in leaves. In figure 4 Ca/K ratio versus

4. Interaction of complexes

relative distance between adaxial and abaxial surfaces are presented for the experiment presented in this paper. For the second sampling time Ca-AA, control and Ca-LS are the treatments with a Ca/K ratio with the significant highest values followed by Ca-GA and CaCl₂. Treatments with the lowest values of Ca/K are Ca-H and -Ca. For the third sampling time there are no significant differences among treatments, except for the control. The Ca/K ratio is higher in the first and in the last points, however there are not statistical differences among relative distance. This can be explained by the low rates of Ca absorption and for the poor Ca distribution across the leaves.

Figure 4.4. Ca/K relation versus relative distance for cucumber plants treated with Ca complexes and for 14 days after the beginning of treatments



4. Interaction of complexing agents with soils

In summary, Fe and Zn complexes have adequate stability in solution till pH 7-7.5 and in solution along time. The amount of element in concentrated nutrient solution is high for all complexes, except for aminoacids. However, complexes present great interaction with soil and soil materials. In general, complexes stability in different conditions is related with the percentage of complexed element. Foliar applications for complexes show an adequate nutrition for Zn but no for Ca. Scanning electron microscopy is a useful tool for the determination of Ca distribution cross the leaves.

CAPÍTULO 5

POTENTIAL USE OF BIODEGRADABLE CHELATE N-(1,2-DICARBOXYETHYL)-D,L-ASPARTIC ACID (IDHA/ Fe^{3+}) AS Fe FERTILISER

5. Potential use of biodegradable chelate n-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid (IDHA/Fe³⁺) as Fe fertiliser

	pag
5.1. Abstract	93
5.2. Introduction	93
5.3. Materials and Methods	95
5.3.1. Stability of IDHA chelates in agronomic conditions	95
5.3.1.1. Stability of IDHA/Fe ³⁺ in solution. Effect of the pH	95
5.3.1.2. Interaction of IDHA/Fe ³⁺ with several soil and soil materials.	97
5.3.2. Biological experiments	97
5.3.2.1. Fe uptake from IDHA/Fe ³⁺ by Cucumber grown in Hydroponics.	97

5.3.2.2. Fe uptake from IDHA/Fe ³⁺ by soybean grown in Hydroponics	98
5.4. Results and Discussion	99
5.4.1. Stability of IDHA chelates in agronomic conditions	99
5.4.1.1. Stability of IDHA/Fe ³⁺ in solution. Effect of the pH	99
5.4.1.2. Interaction of IDHA/Fe ³⁺ with several soil and soil materials.	100
5.4.2. Biological experiments	102
5.4.2.1. Fe uptake from IDHA/Fe ³⁺ by Cucumber grown in Hydroponics.	102
5.4.2.2. Fe uptake from IDHA/Fe ³⁺ by soybean grown in Hydroponics.	103

5.1. ABSTRACT

In the last years, concern about the environmental fate of recalcitrant synthetic ligands (e. g. EDTA) has increased. The used of new biodegradable chelating agents such as IDHA has been proposed as an alternative. However its application as an iron ligand to correct iron chlorosis in Agriculture has not been yet studied. Then the objective of this work is to determine the fertilizer capacity of IDHA/Fe³⁺ using interaction assays with soils and soil materials and evaluating Fe nutrition of efficient and susceptible plants.

Interaction of IDHA/Fe³⁺ with soil materials, produce a reduction of the amount of soluble Fe. This is in good agreement with studies on the stability of the IDHA/Fe³⁺ chelate.

In general, plant response to IDHA/Fe³⁺ in hydroponics is acceptable and better than EDTA/Fe³⁺. This good behaviour seems to be related to the lower coordination of the iron in IDHA/Fe³⁺ with respect to EDTA/Fe³⁺.

5.2. INTRODUCTION

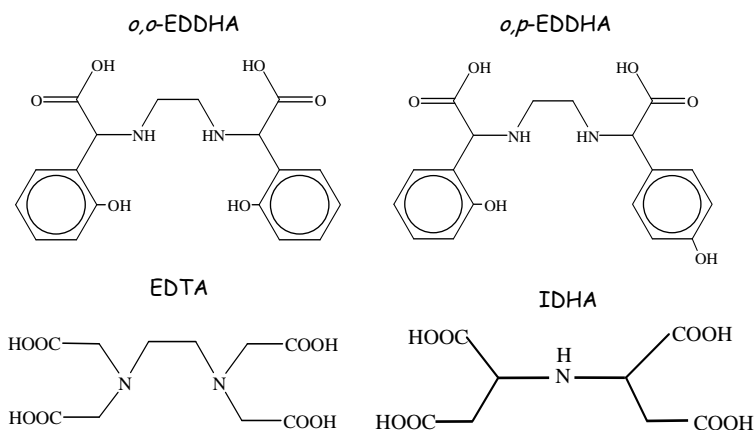
Iron chlorosis is a nutritional disorder in plants that induces leaf yellowing that affects the development and decreases the yield of many crops (Carpena, 1966). It is a widespread agricultural problem, especially in crops grown on calcareous soil, where calcium carbonate buffers soil solution pH in the range of 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982) and high bicarbonate concentration is present (Lucena, 2000).

Fertilisation with Fe chelates is the most effective agricultural practice to provide iron to deficient crops and *o,o*-EDDHA (figure 5.1.) and its analogues are the most efficient chelating agents (Norvell, 1991). *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ and their analogues have two phenolic groups replacing two of the carboxylate groups of EDTA/Fe³⁺, which increases the stability of the iron chelate. Nowadays, in the industrial synthesis of commercial products (Petree et al., 1978), the isomers *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ and *o,p*-EDDHA/Fe³⁺ complexes are formed. *o,p*-EDDHA has only five functional groups that are

able to complex the Fe^{3+} ion, so its stability is lower than the one of o,o -EDDHA/ Fe^{3+} (Yunta, 2003), but higher than the stability of EDTA/ Fe^{3+} . Recently, García-Marco et al. (2006), suggest that o,p -EDDHA/ Fe^{3+} presents several properties that justify its use along with o,o -EDDHA/ Fe^{3+} : it was the best substrate tested for the Fe chelate reductase (FeCR) in cucumber plants, it was faster than o,o -EDDHA/ Fe^{3+} at re-greening Fe chlorotic soybean plants and the chelating agent was able to solubilise Fe native from insoluble materials. However, due to its lower stability constant, o,p -EDDHA/ Fe^{3+} is expected to disappear sooner than o,o -EDDHA/ Fe^{3+} from alkaline soil solutions. This behavior may be related to the presence of only five bonds between the Fe and the ligand (Gómez-Gallego et al., 2002). Thus, while o,p -EDDHA/ Fe^{3+} can be a good chelate to correct Fe chlorosis, it is likely to be active for only a short time due to its low stability in soils (García-Marco et al., 2006).

EDTA/ Fe^{3+} (see figure 5.1.) is also used as a ligand for Fe fertilizer, but due to its low stability its use is recommended for hydroponics, fertigation or other fertilization practices where a thorough interaction between the chelate and high pH soils is avoided (Lucena, 2006). EDTA is recalcitrant, so the concern about the environmental fate of the EDTA applied in Agriculture is risen (Hyvönen et al., 2003). The used of EDTA in Agriculture is low respecting other industrial applications; nonetheless the study of more environmental friendly chelate is convenient.

Figure 5.1. Chelating agents and chelates described in the text.



Recently the biodegradable chelating agent IDHA, commonly known as imidodisuccinic acid, has been proposed for its use in agriculture (Mitschker et al., 2004). IDHA share structural similarities

with EDTA, but, similarly to *o,p*-EDDHA, it contains only five functional groups able to bind Fe^{3+} (see figure 5.1.). Then the stability of its Fe chelate is expected to be lower than EDTA/ Fe^{3+} stability, but its efficacy to provide iron to plants has not been yet demonstrated. Besides the ability to maintain Fe in the soil solution, the efficacy of a Fe chelate depends on the ability of the plant roots to take-up the Fe from the Fe chelate and on the capacity of the free chelating agent to solubilise native Fe presents in the solid phases (Yunta et al., 2003). In this paper we evaluated the chemical stability and reactivity of IDHA/ Fe^{3+} with several soils and soil materials and its efficacy to provide Fe to cucumber (a Fe-efficient plant) and to soybean (a Fe-susceptible plant).

5.3. MATERIALS AND METHODS

5.3.1. Stability of IDHA chelates in agronomic conditions.

5.3.1.1. Stability of IDHA/ Fe^{3+} in solution. Effect of the pH.

The amount of soluble and chelated Fe in IDHA/ Fe^{3+} and EDTA/ Fe^{3+} remaining in solution at different pH was studied following the method of Álvarez-Fernández et al. (2002). Two experimental approaches were used, adjusting the pH initially, or using a pH buffer. For the first one, 5ml of the $2.0 \cdot 10^{-3}$ M IDHA/ Fe^{3+} or EDTA/ Fe^{3+} solutions were added to 25 ml type 1 water and 5 ml 0.10 M CaCl_2 solution. Then pH was adjusted to 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 or 10.0 with HCl or NaOH and volume raised to 50 ml. For the second approach IDHA/ Fe^{3+} solutions were similarly prepared adding 5ml of the $2.0 \cdot 10^{-3}$ M IDHA/ Fe^{3+} , 5 ml of buffer solution (HEPES, MES, CAPS, AMPSO 10^{-2} M) and 0.10 M CaCl_2 before adjusting the pH and rise the volume to 50 ml.

Samples were placed in a shaker bath at 25°C and 56 min^{-1} for 3, 7 or 14 days. Interactions were made in the dark to avoid the possible photodecomposition of the chelates in the light. After the agitation samples were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore membrane and pH was measured using an Orion Research Ion Analyzer (EA920). One aliquot was prepared by the addition of 6.0 M HCl (3.0 mL of sample: 0.30 mL of 6.0

5. Potencial use of biodegradable chelate IDHA

M HCl) and the total element was quantified by Atomic Absorption using a Perkin Elmer Analyst 800 spectrophotometer.

Table 5.1. Chemical and physical characteristics of the soils used in the interaction assays

	Sudanell	Carlet
Sand	46	65
Silt	28	12
Clay	26	23
Texture	Sandy clay loam	Sandy loam
pH (H ₂ O)	7.82	7.69
pH (KCl)	7.23	7.15
E.C extract 1:5 (dS·m ⁻¹)	0.188	0.235
O.M. Oxidizable (g · Kg ⁻¹)	24.0	8.0
N Kjeldahl (g · Kg ⁻¹)	1.40	0.79
C/N	9.9	10.5
CaCO ₃ Total (g · Kg ⁻¹)	179	150
Active lime (g · Kg ⁻¹)	52	40
<i>Macronutrients (Soltampour, cmol·Kg⁻¹)</i>		
Ca	1.55	1.76
Mg	0.66	1.72
K	1.02	1.26
Na	0.047	0.150
<i>Micronutrient (Soltampour, mg·Kg⁻¹)</i>		
Fe	27.0	14.3
Mn	5.4	13.0
Cu	47.1	1.46
Zn	4.3	1.08

5.3.1.2. Interaction of IDHA/Fe³⁺ with several soil and soil materials.

In order to test the amount of IDHA/Fe³⁺ that can be available to plants after its addition to soils, interaction experiments has been performed following Álvarez-Fernández et al. (2002). In brief, the solids phases and amounts used were: 0.2 g of peat, 0.1 g of ferrihydrite, 0.2 g of Ca-montmorillonite, 0.2 g of illite, 2 g of a standard soil, 2 g of Sudanell soil and 2 g of Carlet soil. The materials have been elsewhere described (Álvarez-Fernández et al., 2002) (see also support information, annex 2). Sudanell and Carlet soil characteristics are present in table 5.1. Each one of the materials was allowed to interact with 5 mL of 0.20 10⁻³ M solutions of IDHA/Fe³⁺, EDTA/Fe³⁺ and *o,o*-EDDHA/Fe³⁺, 5 mL of 2.0 10⁻² M CaCl₂ and 2.0 10⁻³ M HEPES (pH=8) in 60 mL sterile polyethylene flasks. Also blank of chelate and blanks of materials were prepared. Interactions were made in the dark to avoid the slow photodecomposition of the chelates in the light. The flasks were shaken for 1 hour at 25 °C and 56 min⁻¹, and then were allowed to stand for 3 days in a thermostated incubator at 25 °C. Finally, the solutions were filtered through 0.45 μm Millipore membranes; pH and soluble Fe, Cu, Mn and Zn by AAs were measured.

5.3.2. Biological experiments

Two biological experiments have been carried out to test the ability of IDHA/Fe³⁺ to provide Fe to two strategy I model plants: cucumber, that is Fe efficient, and soybean, that is iron-inefficient. Both experiments have been done in hydroponics with pH buffer to simulate calcareous soils conditions.

5.3.2.1. Fe uptake from IDHA/Fe³⁺ by Cucumber grown in Hydroponics.

Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Ashley) plants were obtained from cucumber seeds germinated in standard seed germination papers. The bottom of the rolled papers were placed in a macronutrient solution (1.0 10⁻³ M Ca(NO₃)₂, 9.0 10⁻⁴ M KNO₃, 3.0 10⁻⁴ M MgSO₄, 1.0 10⁻⁴ M KH₂PO₄) in the growth chamber for 7 days (16 h with diffuse light at 30°C and 8 h night at 25°C).

The stems of two plants were wrapped together with foam and placed in 2 L polyethylene vessels (3 holes for lid, 6 plants per pot). The vessels contained 2 L of continuously aerated solution of the following initial composition macronutrients: $1.0 \cdot 10^{-3}$ M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $9.0 \cdot 10^{-4}$ M KNO_3 , $3.0 \cdot 10^{-4}$ M MgSO_4 , $1.0 \cdot 10^{-4}$ M KH_2PO_4 ; cationic micronutrients (buffered micronutrient nutrient solution): $2.5 \cdot 10^{-6}$ M MnSO_4 , $1.0 \cdot 10^{-6}$ M CuSO_4 , $10.0 \cdot 10^{-6}$ M ZnSO_4 , $1.0 \cdot 10^{-6}$ M NiCl_2 , $1.0 \cdot 10^{-6}$ M CoSO_4 , $115.5 \cdot 10^{-6}$ M EDTANa_2 , $231 \cdot 10^{-6}$ M KOH ; anionic micronutrients: $35.0 \cdot 10^{-6}$ M NaCl , $10.0 \cdot 10^{-6}$ M H_3BO_3 , $5.0 \cdot 10^{-8}$ M Na_2MoO_4 . The pH was buffered at 7.5 with $1.0 \cdot 10^{-6}$ M HEPES and 2 g of CaCO_3 per pot. Water was added every two days and the solution was renewed every week.

Iron ($5.0 \cdot 10^{-6}$ M) was added as the following treatments: IDHA/ Fe^{3+} (considering 2.79% Fe, analytical total Fe 2.79%), *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} (standard) and EDTA/ Fe^{3+} (standard). Four replications were prepared for each treatment. During the experiment, SPAD readings with a chlorophyll-meter (Minolta SPAD-502) were taken for all the leaf stages (average of three readings per leaf) at several times, although only values measured for the second leaf stage (the youngest fully open leaf at the start of the treatment period) have been presented in the results, since they were the most representative of the whole plant

Whole plants were sampled 24 (a pair of plants) y 37 days (2 pair of plants) after transplanting. The sampled roots and leaves were separated and washed first with Tween 80 in 0.1 M HCl for 10 seconds (Álvarez-Fernández et al., 2001), and then with abundant distilled water, weighted and dried. Micronutrients were determined in leaves after dry digestion procedure by AAs.

5.3.2.2. Fe uptake from IDHA/ Fe^{3+} by soybean grown in Hydroponics.

Soybean (*Glycine max* L. cv. Oshumi) plants were used in this biological experiment. Plants were obtained from soybean seeds that were germinated in standard seed growing procedure in closed sterilised trays. The seeds were washed with water and commercial NaClO diluted 10% during 30 minutes, and then they were rinsed with water and finally with distilled water. The seeds were placed in the trays on a cellulose

paper soaked with 50 mL of distilled water and other paper was placed over them. Thirty millilitres of distilled water and 20 mL CaSO_4 $1.0 \cdot 10^{-3}$ M were added. The trays were placed in a thermostated stove, without light, at 28°C for 3 days. After this time, the seedling of similar development, were placed on a holed plate floating over containers containing diluted nutritive solution for 7 days. The device and the treatments are the same that described in previous experiment. SPAD index was also recorded at several times and whole plants were sampled 14 y 27 days after transplanting. Micronutrients were determined in leaves after dry digestion procedure by AAs.

5.4. RESULTS AND DISCUSSION

5.4.1. Stability of IDHA chelates in agronomic conditions.

5.4.1.1. Stability of IDHA/ Fe^{3+} in solution. Effect of the pH.

During the experiments without pH buffer, pH was well maintained for the low pH solutions, but the higher pH solutions presented a considerably pH decrease, in part due to the OH^- consumption for the $\text{Fe}(\text{OH})_3$ precipitation. In Figure 5.2.A the effect of

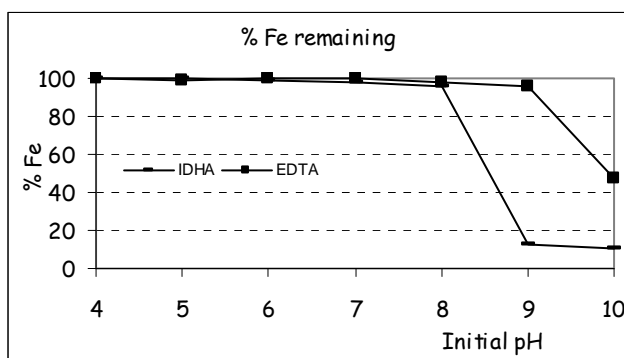


Figure 5.2.A. Effect of the initial pH on the Fe remaining in 0.01 M Ca^{2+} solutions for EDTA/ Fe^{3+} and IDHA/ Fe^{3+} after three days.

the initial pH on the percentage of soluble Fe remaining after three days for each chelate in solution is presented. IDHA/ Fe^{3+} presents lower stability than EDTA/ Fe^{3+} in solution. This lower stability could also be predicted from the theoretical models (e.g. MinteqA2, Alison et al., 1990) using the

stability constants (Hyvönen et al., 2003), but the theoretical chemical speciation of the Fe chelate of IDHA/ Fe^{3+} (see support information, annex 2) indicates that it presents low stability even at low pH and in absence of metal competitors since protons also compete for the ligand. Since experimental data indicates a better stability at acidic and

neutral pHs the validity of the stability constants presented in the literature is questionable.

In Figure 5.2.B the amount of Fe remaining in solution is presented for IDHA/Fe³⁺ when buffered solutions are used. IDHA/Fe³⁺ remains in solution till pH 7 in the first week, but after that a decrease in its presence is observed at this pH. This

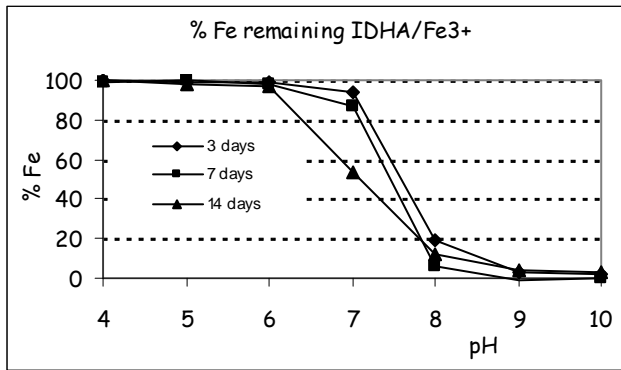


Figure 5.2.B. Effect of the pH on IDHA/Fe³⁺ remaining in buffered 0.01 M Ca²⁺ solutions and for the three periods considered.

could be consequence of the biodegradability of the product. Then it is not expected to have a long lasting effect.

In equilibrium IDHA/Fe³⁺ should not be present in solution in calcareous soils (pH around 8.5) where iron chlorosis is more severe, but it can remain in nutrient

solutions of pH 6.5 or lower, such as those used in fertirrigation or hydroponics.

5.4.1.2. Interaction of IDHA/Fe³⁺ with several soil and soil materials.

In Figure 5.3 the amount of Fe remaining in solution with respect to the total Fe added in the interaction test is presented. More retention is observed for IDHA/Fe³⁺ than for EDTA/Fe³⁺ and very little for *o,o*-EDDHA/Fe³⁺. The material that presents a higher retention capacity is the iron hydroxide for all chelates studied.

In this type of studies a decrease of the Fe concentration in solution can be due to chelate sorption, Fe displacement from the chelate and precipitation, or chelate degradation. For the different regioisomers of *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ sorption has been well studied (Hernández-Apaolaza and Lucena, 2001) and Fe hydroxide has been described as a very reactive phase adsorbing meso *o,o*-EDDHA/Fe³⁺. Also acidic organic materials present a high retention capacity for *o,o*-EDDHA/Fe³⁺, but that retention is reduced at

high pHs. In this case we also observe high retention of EDTA/Fe³⁺ in the Fe hydroxide, but also in the soils. Whether this reduction is consequence of the chelate retention or

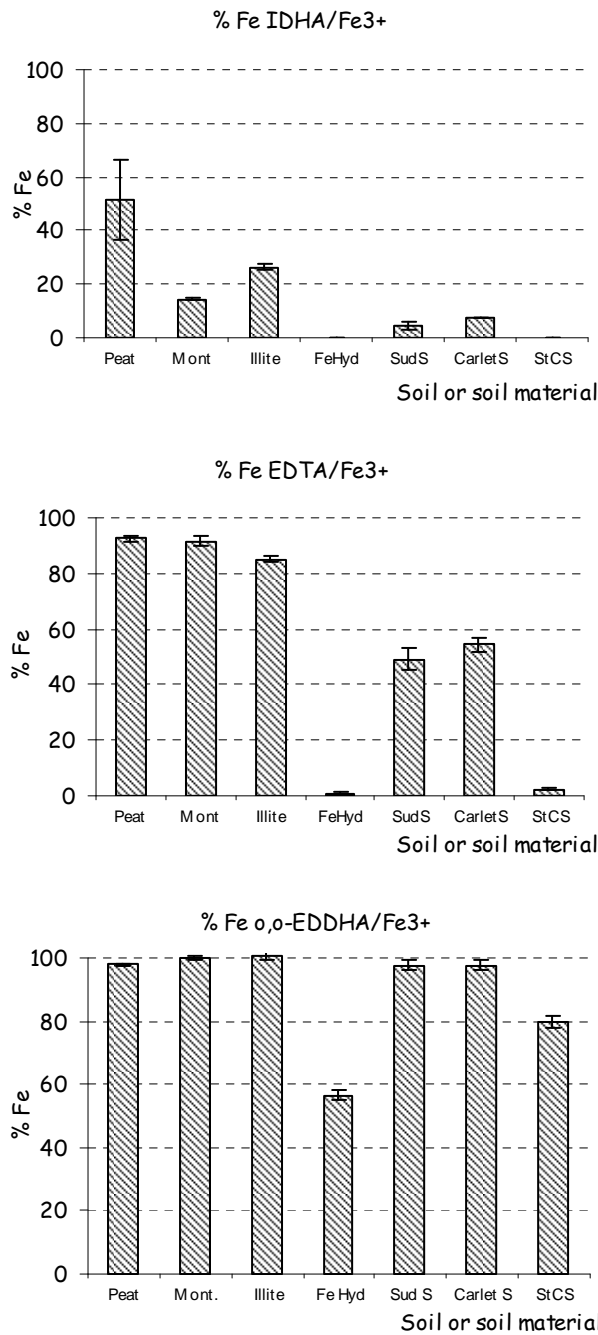


Figure 5.3. Results of Fe remaining respect the total Fe added for the different chelates in the interactions test.

the Fe displacement can not be elucidate from our data. IDHA/Fe³⁺ concentration is highly reduced after the interaction with most of the soils and soil materials. Since initially the solution was buffered to pH 8 Fe displacement should be the main factor affecting the stability of IDHA/Fe³⁺ in these conditions, but surely the other two factors (biodegradation and chelate retention) may play a role in chelate concentration reduction.

Cu and other metal concentrations were measured in the soil extracts in order to determine the displacement of Fe from the chelate by this cation. Only the Sudanell soil gives significant increase of the Cu amount in solution respect the controls. This is related to the high Cu availability of this soil (see table 5.1) as consequence of the heavy Cu fungicides addition on the peach grove during the last years. Cu solubilization for IDHA/Fe³⁺

treatment accounts for around 10% of the Fe displaced while for EDTA/Fe³⁺ represents 14%. This data supports the hypothesis of the Fe displacement as a major effect on the Fe reduction after IDHA/Fe³⁺ reaction with soils.

5.4.2. Biological experiments

5.4.2.1. Fe uptake from IDHA/Fe³⁺ by Cucumber grown in Hydroponics.

In table 5.2 the SPAD readings are presented. EDTA/Fe³⁺ is the treatment that present lower values until the 18nd day, so a less chlorophyll content is expected for this treatment. IDHA/Fe³⁺ presents lower SPAD indexes than *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ for the second leaves, but the values are only statistically different in the 7 days reading.

Table 5.2. Effect of different iron chelates in SPAD index measured in the second leaves in cucumber plants.

Treatments	SPAD									
	Days after treatments									
	7	9	11	14	18	22	24	28	30	35
EDTA/Fe ³⁺	38.6 c	35.4 b	41.0 b	34.4 b	33.0 b	30.0 ns	32.4 ns	28.5 ns	27.6 ns	24.8 ns
IDHA/Fe ³⁺	43.6 b	42.7 a	46.4 a	40.6 a	39.6 a	32.9	36.6	30.4	28.2	22.4
<i>o,o</i> -HA/Fe ³⁺	48.1 a	44.2 a	48.5 a	41.8 a	40.2 a	35.4	28.9	28.7	28.0	21.4

In table 5.3 the biometric data for all the treatments at both sampling times are presented. While there are no significant differences among treatments, EDTA/Fe³⁺ presents lower plant growth.

Fe, Mn and Zn concentrations in leaves are also presented in table 5.3. EDTA/Fe³⁺ provided less iron to the plants in the first sampling time. There is non statistical differences among *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ and IDHA/Fe³⁺ at that moment, but in the second sampling time significantly higher concentrations of Fe were obtained for *o,o*-EDDHA/Fe³⁺. Mn presents larger concentrations for EDTA/Fe³⁺ and Zn for *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ in the first sampling time but differences became not significant at the second sampling time.

Table 5.3. Effect of the different chelate treatments on the dry weight, leaf Fe, Mn and Zn concentration in cucumber plants grown in hydroponics, 24 and 37 days after transplanting. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

	Biomass	Concentration in leaves ($\mu\text{g}/\text{g d.w.}$)		
	$\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}\text{ d.w.}$	Fe	Mn	Zn
24 days after transplanting				
EDTA/ Fe^{3+}	1.73 ns	29.9 b	38.7 a	20.2 c
IDHA/ Fe^{3+}	1.83	36.9 a	33.3 ab	23.8 b
<i>o,o</i> -EDDHA/ Fe^{3+}	1.74	33.1 ab	32.5 b	27.0 a
37 days after transplanting				
EDTA/ Fe^{3+}	2.62 ns	20.5 b	56.0 ns	131.9 ns
IDHA/ Fe^{3+}	2.84	20.7 b	53.2	128.2
<i>o,o</i> -EDDHA/ Fe^{3+}	2.98	24.6 a	41.5	100.7

The results obtained in this experiment suggest that IDHA/ Fe^{3+} presents a good ability to supply iron for efficient plants grown in hydroponics at pH 7.5. In general it is similar to *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} in the first sampling time, but slightly worst in the second period, despite they present similar SPAD indexes.

5.4.2.2. Fe uptake from IDHA/ Fe^{3+} by soybean grown in Hydroponics.

In table 5.4 SPAD indexes are presented. EDTA/ Fe^{3+} shows lower values than the other treatments for all the periods and leaf stages (data presented only for the 2nd leaf stage) considered. IDHA/ Fe^{3+} presented similar, but systematically higher values than *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} .

The weights of plants are presented in table 5.5 at both sampling times. Trend is similar than that obtained with the SPAD index. From this data it can be concluded that IDHA/ Fe^{3+} and *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} were the best Fe treatments while EDTA/ Fe^{3+} gave less yield to the plants.

5. Potencial use of biodegradable chelate IDHA

Table 5.4. Effect of different iron chelates in SPAD index measured in the second leaves in soybean plants.

Treatments	SPAD								
	Days after treatments								
	7	10	12	14	17	19	21	24	26
EDTA/Fe ³⁺	27.6 b	25.7 b	28.0 b	30.3 c	30.4 b	33.1 b	32.2 b	31.2 b	32.3 c
IDHA/Fe ³⁺	29.7 a	28.7 a	32.4 a	33.6 a	34.6 a	37.0 a	36.3 a	36.0 a	37.4 a
<i>o,o</i> -HA/Fe ³⁺	29.9 a	28.2 a	31.4 a	32.2 b	33.7 a	36.2 a	35.9 a	35.4 a	34.9 b

Also in table 5.5, Fe, Mn and Zn concentration in the leaves are presented. IDHA/Fe³⁺ has the higher Fe content. Mn concentration in leaves is higher for EDTA/Fe³⁺, however Zn increase for IDHA/Fe³⁺ and *o,o*-EDDHA/Fe³⁺.

Table 5.5. Effect of the different chelates treatments on the dry weight, leaf Fe, Mn and Zn concentration in soybean plants grown in hydroponics after 14 and 27 days. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

	Biomass g .plant ⁻¹ d.w.	Concentration in leaves ($\mu\text{g/ g d.w.}$)		
		Fe	Mn	Zn
14 days after transplanting				
EDTA/Fe ³⁺	1.04 b	49.9 b	51.2 a	43.5 b
IDHA/Fe ³⁺	1.16 a	59.9 a	48.4 ab	50.7 a
<i>o,o</i> -EDDHA/Fe ³⁺	1.11 ab	53.6 ab	44.1 b	53.2 a
27 days after transplanting				
EDTA/Fe ³⁺	2.55 b	45.0 b	60.3 a	56.2 ns
IDHA/Fe ³⁺	3.41 a	50.4 a	44.2 b	54.0
<i>o,o</i> -EDDHA/Fe ³⁺	3.23 a	47.4 ab	48.1 b	55.7

The better Fe nutrition from *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ than from EDTA/Fe³⁺ in hydroponics when they are applied at low concentrations has been already described (Lucena, 2006 and Lucena et al., 2007). This is consequence of the higher stability of the *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ respect the EDTA/Fe³⁺ that reduce the Fe displacement from the chelate in the nutrient solution. IDHA/Fe³⁺ is less stable than EDTA/Fe³⁺ and a worst Fe nutrition

was expected. However, not only the stability is important. In fact, Lucena et al (2006) showed that for the highly stable chelates (those containing two phenolate, two amino and two carboxylate donor groups), the less stables were better substrates of the Fe chelate reductase of cucumber plants allowing a better nutrition of the plant (Lucena et al., 2006). Moreover, kinetics is also an important factor. García-Marco et al. (2006) showed that the *o,p*-EDDHA/Fe³⁺ (see figure 5.1.) was faster than highly stable *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ in providing Fe to plants. In a biological experiment, similar to the one we presented here using soybean plants, both of them were applied at low concentrations and plants with *o,p*-EDDHA/Fe³⁺ presented a better response. On that paper the lower coordination of the Fe on that chelates (5 bonds between the chelating agent and the ferric ion, see figure 5.1.) was considered the responsible of the faster Fe nutrition. In the experiments here presented, the good results obtained when IDHA/Fe³⁺ was applied in hydroponics at pH 7.5 can be also consequence of the low coordination in the chelate.

Despite IDHA/Fe³⁺ presents low stability and high reactivity in agronomic conditions, it is quite efficient in provide Fe to cucumber (Fe-efficient) and soybean (Fe-susceptible) plants in hydroponics at pH 7.5 This good behaviour may be related to the presence of only five bindings between the iron and the chelating agent. Since IDHA is biodegradable its use as Fe fertilizer in hydroponics and fertirrigation should be considered.

CAPÍTULO 6

IDHA CHELATES AS MICRONUTRIENT FERTILIZER IN

FERTIRRIGATION

6. IDHA chelates as micronutrient fertilizer in fertirrigation.

	pag
6.1. Abstract	111
6.2. Introduction	111
6.3. Material and Methods	113
6.4. Results	116
6.4.1. Green bean in hydroponics	116

6. Efficiency of chelate IDHA

6.4.2. Tomato on rockwool	120
6.4.3. Tomato on soil mulch (<i>enarenado</i>)	120
6.5. Discussion	120

6.1. ABSTRACT

The new biodegradable chelating agent IDHA (imidodisuccinic acid) has been studied for its application in agriculture. Experiments to assess the efficiency of IDHA formulations to provide micronutrients to green bean and tomato plants grown in soilless and soil cultures under fertirrigation were carried out. In green bean experiment, the effectiveness of IDHA to supply micronutrients is demonstrated. Although EDTA provides nutrients in higher amounts, a chryptogamic infection was observed for this treatment but no for the IDHA one. In tomato on rockwool experiment increments of SPAD index and Zn concentration are higher in plants treated with IDHA than with EDTA and for tomato on soil mulch experiment no differences were found among treatments even the control. Results are in agreement with previous published behavior of IDHA. Then IDHA can substitute EDTA in hydroponics and fertirrigation cultures as chelating agent for micronutrients.

6.2. INTRODUCTION

Iron chlorosis is a nutritional disorder in plants that affects their development and decreases the yield of many crops growing on calcareous soils where calcium carbonate buffers soil solution pH in the range of 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982) and high bicarbonate concentration is present (Lucena, 2000). Chlorosis implies a decrease in the amount of chlorophyll and, therefore, in a gradual disappearance of the green color of the plants (Chen and Barak, 1982 and Mengel et al., 2001).

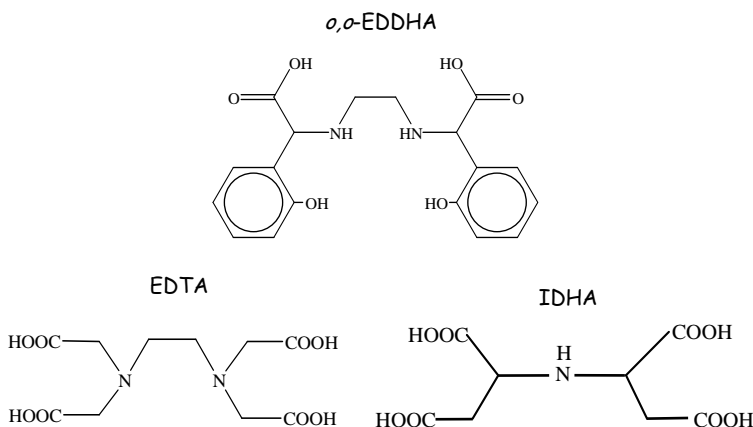
In the case of zinc, the high pH and the presence of active lime in soil induces the retention of the cation, due the adsorption and the precipitation of zinc solid phases (Lindsay, 1972, Papadopoulos and Rowell, 1989 and Uygur and Rimmer, 2000). The solubility of manganese is affected by pH, redox and complexation and its availability is lower in alkaline soils due to low solubility of manganese compounds under high pH conditions (Lindsay, 1979).

The use of chelates is the most common and efficient agricultural practice to treat iron chlorosis and other micronutrient deficiencies (Álvarez-Fernández et al.,

6. Efficiency of chelate IDHA

2005). Recently the biodegradable chelating agent N-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid (figure 6.1), commonly known as imidodisuccinic acid or IDHA, has been proposed for its use in agriculture (Mitschker et al., 2004). IDHA shares structural similarities with EDTA, but only contains five functional groups able to complex the metal. Recently, García-Marco et al. (2006), suggest that *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} , also with five functional groups complexing iron, was the fastest substrate tested for the Fe chelate reductase in cucumber (Fe efficient) plants and, it also was faster than *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} at re-greening Fe chlorotic soybean (Fe susceptible) plants. Moreover, the chelating agent was quite fast to solubilise Fe native from insoluble materials. This behavior may be related to the presence of only five bonds between the Fe and the ligand (Gómez-Gallego et al., 2002) while chelates with six bonds (e. g. *o,o*-EDDHA or EDTA) present slower rates of action. Villén et al. (2007) demonstrated that despite IDHA/ Fe^{3+} presents lower stability than EDTA and high reactivity in agronomic conditions, it is quite efficient in providing Fe to cucumber and soybean plants grown in hydroponics at pH 7.5 in growth chamber. This good behaviour in plant experiments may be related to the presence of only five bindings between the iron and the chelating agent as in *o,p*-EDDHA.

Figure 6.1. Chelating agents and chelates described in the text.



penetration of Fe from IDHA/ Fe^{3+} produced a higher leaf chlorophyll content than DTPA/ Fe^{3+} , but lower than EDTA/ Fe^{3+} when was applied with surfactants and other

IDHA is biodegradable (Novack et al 2005), so its use as Fe fertilizer could be a more environmental friendly choice than other synthetic chelates. Fernández et al. (2006) demonstrated that rates of foliar

adjuvants. Schlegel et al. (2006) tested the foliar penetration in leaf dicks of broad bean of different Fe compounds at 100% humidity. Penetration followed first order-kinetics and the rate constants (h^{-1}) were higher in light than in dark conditions and were larger for $CaCl_2$, then lignosulfonate, IDHA and the less effective was citrate. Despite this foliar uptake studies IDHA has not been tested as complexing agent of Fe, Mn, Cu or Zn in agronomic conditions Application to highly calcareous soils may not be successful due the low stability, but the behavior in fertirrigation conditions should be evaluated. The aim of this paper is to compare the efficacy of IDHA and EDTA formulations to provide micronutrients in tomato and green bean crops grown in soilless and soil cultures under fertirrigation.

6.3. MATERIALS AND METHODS

Three experiments were conducted. Green bean on rockwool (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Perfección negra polo) grown in the experimental greenhouse of the Universidad Autónoma (40° 33' N, 3° 42' W, 724 m elevation, Madrid). Two tomato experiments were developed in commercial greenhouses in Motril region. One of them was conducted in Lobres (36° 46' N, 3° 35' W, 152 m elevation, Granada), using tomato (*Lycopersicum esculentum*. cv. Shiren) as test plants and rockwool as grown media. The other experiment was conducted in Carchuna (36° 42'N, 3° 27', sea level, Almería) using tomato plants (*Lycopersicum esculentum*. cv. Realeza) on a soil mulch (*enarenado*) system. *Enarenado* is commonly used in the greenhouses of Almería (Southeastern of Spain) and is an artificial substrate consisting on a bottom layer (30 cm) of clay soil placed on the original poor soil, then a 2 cm layer of sheep manure and on the top a 10 cm layer of sand. *Enarenado* has many advantages: little management, reduced water loss and salinity problems, and higher temperature during winter (La Malfa et al., 2001). All the experiments describe above were conducted during 2006.

For the green bean experiment, seeds were washed with water and commercial NaClO diluted 10% during 30 minutes, and then they were rinsed with water and finally

6. Efficiency of chelate IDHA

with distilled water. The seeds were placed directly into 'rockwool cubes' previously saturated with water during three days in darkness (28 °C). After, the cubes were placed in a growth chamber for 3 days with a light/dark regime of 16/8 h, 30/20°C temperature and 50% of humidity. During this time, plants were watered with a diluted fertilizer solution of macronutrients. When plants were around 20 cm tall, the cubes were placed into the greenhouse on rockwool bags previously saturated with the macronutrient solution. When roots spread on the rockwool bag only two plants per cube were left. Five lines with three rockwool bags were used (see supporting information, annex 3) each line corresponding with an experimental block.

Nutrient solution was continuously added as irrigation solution. Macronutrients solution consisted in (mM): 3.3 Ca(NO₃)₂, 2.4 KNO₃, 1.0 MgSO₄, 1.0 KH₂PO₄. Three different treatments have being applied in the irrigation: Control (without micronutrient solution), IDHA and EDTA. Micronutrient solutions (μM) contained: 18 Fe, 9.1 Mn, 1.5 Zn, 0.63 Cu, 9.3 B and 0.42 Mo applied as a different IDHA solid products (IDHA/Fe³⁺ 8.5 %, IDHA/Mn²⁺ 7.5%, IDHA/Zn²⁺ 9.0% and IDHA/Cu²⁺ 9.0% (w/w)) or EDTA (a commercial mix product containing EDTA/Fe³⁺ 7.5%, EDTA/Mn²⁺ 3.5%, EDTA/Zn²⁺ 0.7%, EDTA/Cu²⁺ 0.28%, B 0.65% and Mo 0.3% (w/w)). Mo and B were applied in the IDHA treatment as H₃BO₃ and (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O. Irrigation was done during 5 minutes each two hours with a dripper of 2L h⁻¹.

Tomato seedlings used in greenhouse experiments of Granada and Almería were from commercial sources.

In tomato on rockwool experiment, seven blocks (two of them as borders) were used for each treatment. Two paired bags from each treatment were considered to form a block and five plants per bag were used. Two drippers were placed in each bag, one of them feeding two plants and the other one feeding three plants (see plate S5 in supporting information, annex 3). Nutrient solutions were continuously added as irrigation solutions. Macronutrient solution consists on (mM): 3.5 Ca(NO₃)₂, 5.0 KNO₃, 1.0 MgSO₄, 1.5 H₃PO₄. Micronutrients solution had the follow composition (μM): 27 Fe, 11 Mn, 1.8 Zn, 0.94 Cu, 13 B and 0.42 Mo; and was applied in two different treatments:

EDTA (commercial product containing EDTA/Fe³⁺ 7.5%, EDTA/Mn²⁺ 3.5%, EDTA/Zn²⁺ 0.7%, EDTA/Cu²⁺ 0.28%, B 0.65% and Mo 0.3% (w/w)) and IDHA as different solids and liquid products (IDHA/Fe³⁺ 4.3 % (w/v), IDHA/Zn²⁺ 5.4% (w/v), and IDHA/Cu²⁺ 6.1% (w/v), and IDHA/Mn²⁺ 7.5% (w/w))

In tomato in soil mulch experiment, three irrigation lines of the greenhouse were used. Treatments were distributed in four different blocks. In each block, 5 plants in the row were used for each treatment. The chelate solutions were injected (two injections of 25 ml were applied to both sides of plant, 10 cm apart from the stem) every two weeks directly to the soil (see supporting information, annex 3) and their composition were (mM): 1.53 Fe, 0.73 Mn, 0.12 Zn, 0.05 Cu, 0.68 B and 0.04 Mo. Three different treatments have being applied: Control (without micronutrient solution), IDHA and EDTA. Micronutrient solution (the total amount of micronutrients applied during this experiment was calculated to be the half of the total amount applied in the rockwool experiment) was injected as IDHA and EDTA (products described in the previous tomato experiment)

In all experiments, SPAD readings (each data is average of from 15 leaves and three readings per leaf) were taken every week with a chlorophyll-meter (Minolta SPAD-502). The youngest developed leaves were sampled at different times after the beginning of the treatments. The sampled leaves were separated and washed first with Tween 80 in 0.1 M HCl for 10 seconds (Álvarez-Fernández et al., 2001), and then with abundant distilled water, weighted and dried. Micronutrients were determined in leaves after dry digestion procedure by AAS (Perkin-Elmer AAnalyst 800). In the green bean experiment, growth rate (height) was checked during the first days after the application of the treatment. After the first sampling time, the two plants of the intermediate cube of each bag were taken and biometric data recorded. Pod yield was determined at the all sampling times. In tomato on soil mulch experiment, the stem diameter and the fruit yield were checked also. In tomato on rockwool experiment, plants presented an acidic stress from day 80 that could affect fruit yield and another biometric data so they were not recorded.

6. Efficiency of chelate IDHA

Data were statistically evaluated by using Duncan's Multiple Range ($\alpha=0.05$) test with the program SPSS 13.0 and by the analysis of variance ($\alpha=0.05$) with excel in order to find significant differences among treatments.

6.4. RESULTS

6.4.1. Green bean in hydroponics

As expected, Control presents significant lower SPAD values than the other treatments (table 6.1) and these results are related with the micronutrient deficiency visual symptoms that Control presents from the first days of the experiment (see plate S2 in supporting information, annex 3). IDHA and EDTA treatment have similar SPAD readings until day 31 and then, IDHA treatment shows significant higher values than EDTA due to plants treated with EDTA began to show visual symptoms of fungus infection and dryness (see plate S3 in supporting information, annex 3). In the last sampling time EDTA plants were severely injured while IDHA plants showed only few symptoms. The weather was warm during this period and affected the normal plant development, but in different way to plants treated with IDHA and EDTA chelates.

Table 6.1. Effect of the chelate treatments in the SPAD index in the green bean experiment. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

	SPAD									
	Time after treatments (days)									
	3	8	11	15	18	23	31	39	44	49
Control	34.5 a	26.1 b	26.9 b	26.8 c	26.6 b	27.3 b	28.8 b	26.9 c	24.2 c	24.9 c
IDHA	35.1 a	35.8 a	35.6 a	34.3 b	35.9 a	39.6 a	40.4 a	41.8 a	41.0 a	39.2 a
EDTA	32.8 b	35.1 a	35.9 a	35.8 a	37.1 a	40.6 a	38.8 a	34.3 b	34.8 b	35.3 b

Micronutrient concentrations in the leaf are presented in table 6.2. The low concentrations in Control are in good agreement with the visual symptoms of deficiency and SPAD index. Both EDTA and IDHA treatments present significant higher values

than Control and in the sufficiency range (Jones et al., 1991), except for Mn in the IDHA treatment. Fe concentration is higher for EDTA than for IDHA in all the sampling times and Mn and Zn concentrations are different after the first sampling time.

Table 6.2. Effect of the different chelate treatments on leaf Fe, Mn, Zn and Cu concentrations and micronutrient ratios in green bean plants grown in hydroponics 29, 39 and 49 days after the beginning of the treatments. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

	Concentration in leaves ($\mu\text{g/g d.w.}$)				Ratios		
	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe/Mn	Fe/Cu	Fe/micros
29 days after treatments							
Control	51.1 c	20.1 b	6.78 b	7.66 b	2.70 ns	6.70 b	0.60 a
IDHA	74.0 b	29.0 a	38.9 a	13.3 a	2.58	5.61 b	0.48 c
EDTA	91.1 a	33.2 a	36.0 a	8.79 b	2.78	10.4 a	0.54 b
39 days after treatments							
Control	63.4 c	19.6 c	10.4 c	6.53 c	3.41 a	10.0 b	0.64 a
IDHA	91.2 b	35.2 b	26.2 b	9.03 b	2.69 ab	10.1 b	0.56 b
EDTA	154 a	61.3 a	44.8 a	11.74 a	2.51 b	13.4 a	0.57 b
49 days after treatments							
Control	62.8 b	22.6 c	13.0 c	5.19 b	2.88 a	12.5 ab	0.61 a
IDHA	81.6 b	35.3 b	22.6 b	9.10 a	2.51 ab	9.02 b	0.55 b
EDTA	139 a	72.6 a	49.3 a	9.52 a	1.93 b	15.5 a	0.51 b

As Fe nutrition indexes, several nutrient ratios has been considered in table 6.2. Despite the differences in nutrient content between EDTA and IDHA, the Fe/Mn and Fe/micros ratios do not present differences between them, indicating a similar Fe, Mn and Zn nutrient balance. Fe/Cu relation is higher for the EDTA for all the sampling times. IDHA is able to provide micronutrients to the plant in an effective way, but in fewer amounts than EDTA, but nutrient ratios indicate a good equilibrium among micronutrients for both treatments.

6. Efficiency of chelate IDHA

In figure 6.2 plant height at the early stages of the experiment is presented. No differences were found between IDHA and EDTA treatments indicating that the plants

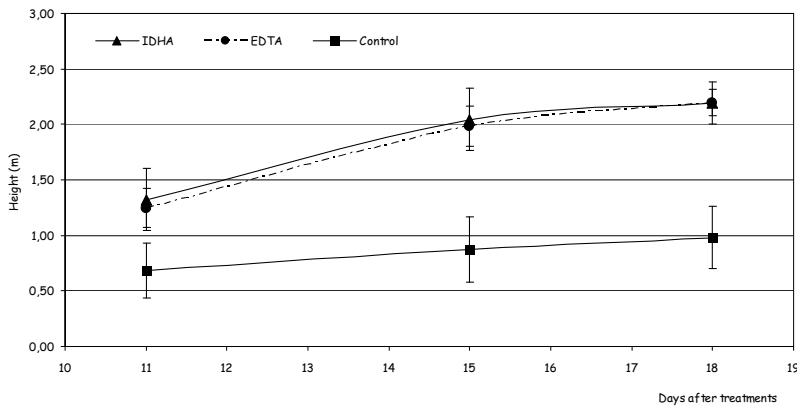


Figure 6.2. Height evolution for green bean plant grown in hydroponics

days after the beginning the treatments are presented. IDHA presents significant higher values than EDTA and Control very low values. Similar results are found for the number of pods collected in each sampling time (figure 6.4), the yield of the plants (figure 6.5) and the average pod weight, caliber and length (data not shown).

presented similar development although there clear differences respect to Control.

In figure 6.3 the fresh weight of the green bean plants sampled 29 and 49

Figure 6.3. Fresh weight of the green bean plants grow in hydroponics and sampled 29 and 49 days after the beginning of the experiment.

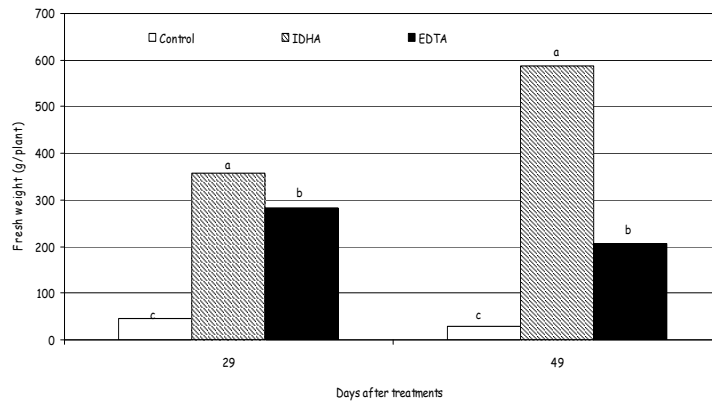


Figure 6.4. Number of green beans pods collected 29, 39 and 49 days after treatments.

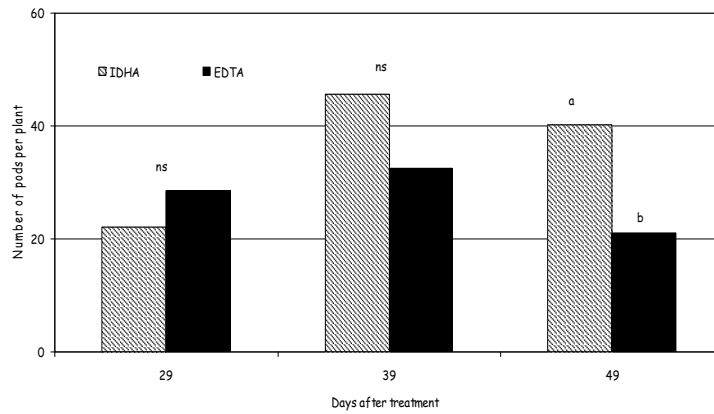
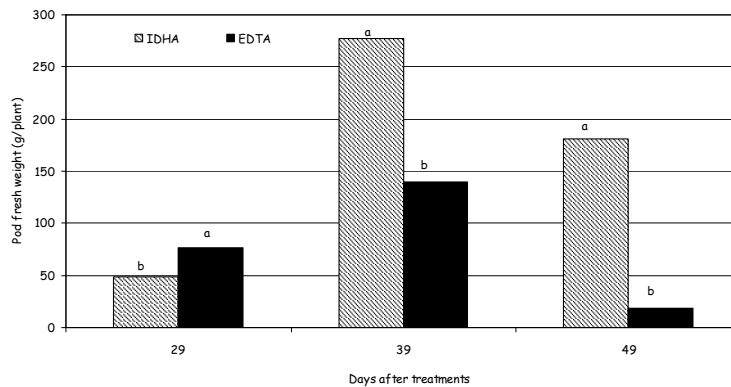


Figure 6.5. Weight of green bean pods (g/plant) sampled 29, 39 and 49 days after the beginning of the treatments.



6. Efficiency of chelate IDHA

6.4.2. Tomato on rockwool

Respect to the SPAD index (see supporting information, table S1, annex 3), EDTA treatment maintains the initial level during the 80 days of the experiment while IDHA shows a SPAD increment of 6.4 units higher than the EDTA at the end of the experiment.

Table 6.3. Effect of the different chelate treatments on leaf Fe, Mn, Zn and Cu concentration and ratios in tomato plants grown in rockwool hydroponics, 21 and 70 days after the beginning of the treatments. Different letters in the same column denotes significant differences between treatments according to analysis of variance ($\alpha = 0.05$).

	Concentration in leaves ($\mu\text{g/g d.w.}$)				Ratios		
	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe/Mn	Fe/Cu	Fe/micros
21 days after treatments							
IDHA	111 ns	143 ns	23.6 ns	20.2 a	0.78 ns	5.52 ns	0.38 ns
EDTA	99.8	138	24.0	18.4 b	0.73	5.47	0.36
70 days after treatments							
IDHA	97.6 ns	217 ns	14.9 ns	12.2 a	0.45 b	8.2 b	0.29 b
EDTA	113	201	18.2	10.4 b	0.57 a	10.9 a	0.33 a

Micronutrient concentrations and ratios in leaves are presented in table 6.3. Concentrations are in the sufficient range (Jones et al., 1991), except for Zn in the second sampling time in EDTA and IDHA treatments. At both sampling times, there were not significant differences between treatments except for Cu. For IDHA treatment Fe/Mn, Fe/Cu and Fe/micros ratios, are significantly lower than for EDTA in the second sampling time. This indicated that IDHA treatment presents a higher selectivity for Mn and Cu respect Fe than EDTA.

6.4.3. Tomato on soil mulch (*enarenado*)

SPAD indexes for the tomato on soil mulch experiment (see supporting information table S2, annex 3) reveals that IDHA presented significant (Duncan test $P > 95\%$) higher values than EDTA. Differences are only of 1.06 units in the average of 25 sampling times and surely of little agronomic relevance. However, no differences were found with

respect to the Control which raises a doubt about the low frequency addition of these chelates on tomato grown in *enarenado*.

Table 6.4. Effect of the different chelate treatments on leaf Fe, Mn, Zn and Cu concentration and ratios in tomato plants grown on soil mulch 13, 62 and 146 days after the beginning of the treatments. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$).

	Concentration in leaves ($\mu\text{g}/\text{g d.w.}$)				Ratios		
	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe/Mn	Fe/Cu	Fe/micros
13 days after treatments							
Control	80.8 a	141 ns	21.5 ns	-	0.59 a	0.52 ab	0.21 a
IDHA	55.8 b	145	22.3	-	0.39 b	0.32 b	0.15 b
EDTA	82.8 a	137	27.7	-	0.61 a	0.64 a	0.23 a
62 days after treatments							
Control	65.0 ns	137 ns	18.2 ns	-	0.48 ns	1.62 ns	0.25 ns
IDHA	69.7	148	24.9	-	0.48	1.47	0.24
EDTA	65.6	138	20.1	-	0.49	1.83	0.26
146 days after treatments							
Control	64.2 ns	111 ns	15.2 b	14.5 ns	0.58 ns	5.47 ns	0.32 ns
IDHA	76.8	121	32.5 ab	12.9	0.65	6.42	0.32
EDTA	72.1	120	43.7 a	13.3	0.57	5.51	0.28

In the first sampling time, Fe concentration (table 6.4) in the IDHA treatment is significantly lower than in the other ones but, for the second and third sampling time, there were no significant differences among treatments. For the rest of the elements, there were no differences except for Zn in the third sampling time, being higher for EDTA and IDHA treatments than Control. In fact Zn levels were deficient in the control according to (Jones et al., 1991), indicating the, despite there were no differences on the SPAD index; the preventive use of the chelates has been effective to overcome such nutrient alteration. Micronutrient ratios (table 6.4) yield similar observations than nutrient concentrations respect the iron nutrition. High amounts of Cu in first and

second sampling times (data not shown) were due to the fungicides application in the greenhouse.

Fruit yield and stem diameter were recorded at different times along the experiment and there were not statistical differences among treatments (data not shown).

6.5. DISCUSSION

In a previous paper, the authors demonstrated that, despite the fast action of IDHA, its iron chelate presents lower stability than EDTA/Fe³⁺ and high reactivity in agronomic conditions (Villén et al., 2007). These results are in agreement with the results obtained for the tomato on soil mulch experiment, where, the low frequency of application and the high interaction with the substrate reduces the effectiveness of the iron application. Consequently no differences among treatments were observed respect the Fe. However there was an improvement in Zn nutrition in EDTA and IDHA treatments. This may be the reason that results of Fe concentration in leaves did not agreed with the SPAD indexes. At the beginning of the experiment, IDHA presents higher SPAD values but lower Fe concentration than the other treatments. Tomato plants are not highly sensitive to iron chlorosis and iron application is more a preventive treatment that a curative one. Moreover, IDHA/Fe³⁺ and EDTA/Fe³⁺ show a great retention in soils and soil materials and IDHA/Fe³⁺ remains in solution until pH 7. IDHA/Fe³⁺ should not be present in solution in calcareous soils (pH around 8.5) where iron chlorosis is more severe, but it can remain in nutrient solutions of pH 7.5 or lower, such as those used in fertirrigation or hydroponics (Villén et al., 2007).

In hydroponics on rockwool there are a high frequency of application (continuously as in the irrigation solution), so there is less interaction between solution and substrate and the efficiency of the IDHA treatment to provide micronutrients to green bean and tomato plants has been clearly demonstrated. In green bean experiment, IDHA produces healthy and good feed plants, with equilibrated foliar content of micronutrients, adequate SPAD indexes and pod yield and quality parameters. EDTA can

provide micronutrients in larger amounts than IDHA. However plants treated with EDTA were more susceptible to suffer cryptogamic infections than those treated with IDHA. There is an extensive literature on the competence for Fe between pathogens and host plants (e. g. Neema et al., 1993; Rahman and Punja, 2003). Bienfait et al. (2004) have determined Fe chelates uptake by different plant species. They observed that cucumber grown on EDDHA/Fe³⁺ presented a mildew infection, while plants grown in nutrient solution without EDDHA/Fe³⁺ were not infected. The authors explain their results by two mechanisms: 1) when plants grown on Fe-chelate, a passive influx of iron which is not under control of the plant's sensing system occurs. In this case an infecting microorganism can obtain sufficient iron for its growth and 2) EDDHA or one of its breakdown products can be interfering with the plant natural resistance against microbial infection. Thus, the infection observed in our green bean experiment can be explained by a larger availability of soluble (chelated) Fe via the transpiration stream that can proportionate Fe for the microbial growth and/or by the presence of the Fe-EDTA chelate which interfered on the natural resistance to the mildew infection. The infection is however very low in plants treated with IDHA chelates and this can be explained by the faster degradation of IDHA inside the plant than EDTA chelates.

In tomato on rockwool experiment, IDHA treatment presents higher increments of SPAD indexes than EDTA and better effect on Zn nutrition than Control.

In order to prevent possible mineral deficiencies IDHA chelates can be used instead of EDTA chelates in hydroponics and fertirrigation cultures due to similar nutritional parameters and fruit yield and IDHA is a biodegradable chelate.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

La gran demanda de soluciones para aliviar las deficiencias de micronutrientes y Ca, que además atiendan a una agricultura respetuosa con el medio ambiente han hecho que aparezcan en el mercado español gran variedad de complejos. Los agentes complejantes son, por lo general, subproductos de otras industrias. Aunque algunas de estas sustancias son naturales, de composición variable y con una estructura química compleja (sustancias húmicas, lignosulfonatos, etc.), también las hay de estructura química bien definida (ácido cítrico, ácido glucónico, etc). Dentro de esta línea de productos biodegradables, pero perteneciente al grupo de los quelatos de síntesis, ha sido propuesto para su uso en agricultura (Mitschker y col., 2004) el nuevo agente quelante IDHA (ácido n-(1,2-dicarboxietil)-D,L-aspartico), comúnmente conocido como ácido imidodisuccínico.

Los estudios realizados sobre el comportamiento agronómico de los complejos, ya sean los realizados por otros autores o los descritos en esta memoria, hacen prever que son productos de baja estabilidad y alta reactividad en condiciones adversas, como aplicaciones a suelos calizos. Para los quelatos de IDHA, aunque existen algunos estudios sobre la capacidad fertilizante del quelato férrico en aplicaciones foliares (Fernández y col., 2006, Schlegel y col., 2006) no han realizado estudios ni sobre su capacidad quelante con Fe, Mn, Cu o Zn, ni de su comportamiento en otras condiciones agronómicas.

En el presente trabajo nos hemos centrado en la de investigación de productos biodegradables. Nos propusimos desarrollar una metodología analítica para los agentes complejantes y estudiar el comportamiento agronómico en distintas condiciones, tanto de los agentes complejantes como del IDHA.

En capítulos anteriores, los resultados fueron discutidos individualmente y en éste se presentan y discuten los resultados más relevantes en función de los objetivos planteados al inicio de esta memoria. Además, se incluye la aplicación del método AOAC modificado al estudio de muestras comerciales para conocer si cumplen con los requisitos incluidos en la legislación y se incluye la especiación química del agente quelante IDHA.

7.1. **Legislación y métodos analíticos**

El conocimiento limitado que tenemos sobre estas sustancias, ya sea sobre metodologías analíticas, características químicas y/o reactividad en diferentes condiciones hace que, aunque su uso está extendido, no se encuentre totalmente legislado. El Reglamento europeo 2003/2003 (D.O.C.E. 21 de noviembre de 2003) deja pendiente de elaboración la lista de agentes complejantes permitidos para su uso en agricultura. Sin embargo, la legislación española hace público el R.D. 824/2005 donde se encuentra la lista de los agentes complejantes permitidos en España y además se hace una revisión de los métodos analíticos existentes para, entre otras, la determinación del contenido de nutrientes totales (Método 10.1 Reglamento 2003/03) y solubles en agua (Método 9.2 Reglamento 2003/03), pero los métodos analíticos necesarios para la determinación de la fracción de nutrientes complejados por los distintos agentes complejantes están pendientes de elaboración.

Con la idea de obtener un único y sencillo método analítico válido para la determinación del elemento complejado, se procedió a comparar dos métodos elaborados para quelatos. El método CEN basado en la retención de los cationes en una resina sulfonada y una modificación de un método de la AOAC consistente en la precipitación de los óxidos e hidróxidos a pH 8.5. Las modificaciones introducidas fueron: elevar el pH a 9 de manera que todos los metales se encontraran precipitados, incluir un tiempo de reposo para favorecer la precipitación y realizar la mineralización de la muestra para asegurarnos la completa destrucción de la materia orgánica. La comparación de ambos métodos se realiza con muestras de lignosulfonatos y aminoácidos.

Aunque los dos métodos propuestos deberían ofrecer resultados equivalentes, ya que en ambos se retira del medio las formas positivas y se determina en disolución las formas neutras y negativas, los resultados obtenidos muestran gran diferencia entre ellos siendo el método propuesto por el CEN con el que se obtienen valores inferiores de elemento complejado. En ambos métodos se dan reacciones que pueden desplazarse en mayor o menor medida en función de las condiciones del medio. En el método CEN, los

grupos funcionales, principalmente los sulfónicos presentes en la resina en elevada concentración pueden actuar como agentes complejantes, desplazando al metal y destruyendo el complejo. Además, no todos los complejos formados son negativos o neutros, de manera que estos complejos positivos quedan retenidos en la resina y no son cuantificados como elemento complejado.

El método AOAC modificado produce un ligero desplazamiento de los metales desde el complejo debido a que la precipitación se encuentra favorecida a pH 9. Sin embargo, el empleo de este método parece interesante porque el elemento complejado es determinado en las condiciones de pH en las que realmente van a ser empleados (aplicación a suelos calizos) y no a los pH a los que estos productos se han formulado.

Aún así, hay que decir que el valor del metal complejado es un índice ya que las reacciones que pueden sufrir el metal y el ligando durante el análisis (incluyendo otros ligandos y metales presentes en el fertilizante) pueden hacer que la determinación del elemento complejado difiera de la original. De manera que lo que obtenemos es un criterio de selección que nos permite relacionarlo con la mayor o menor complejación de los productos.

Con el fin de ajustar los parámetros del método AOAC modificado se realizó un ensayo interlaboratorio en el que participaron cuatro laboratorios. Los resultados obtenidos muestran que la determinación del elemento complejado por el método AOAC modificado puede ser un índice adecuado para la determinación de micronutrientes complejados, pero la elevada reproducibilidad y repetitividad hacen que el método necesite estandarización. De manera que nos propusimos diseñar un segundo ensayo interlaboratorio, esta vez con una participación de siete laboratorios y dirigido por el Grupo de Trabajo Sectorial de Fertilizantes (M.A.P.A.) En este ensayo global, los resultados de la Desviación Estándar Relativa en condiciones de repetitividad (RSDr) y Desviación Estándar Relativa en condiciones de reproducibilidad (RSDR) fueron buenos para la determinación del Zn complejado, sin embargo, estos resultados fueron cuestionables para el Fe y Mn.

En resumen, el método AOAC modificado se presenta como un método para la determinación de micronutrientes complejados más reproducible que el método propuesto por el CEN, aunque es mejorable para el Fe y Mn debido a los elevados valores de reproducibilidad y repetitividad.

En cuanto a los productos analizados se puede ver que los lignosulfonatos y gluconatos poseen elevado contenido de elemento complejado, al igual que el humato aunque su concentración de elemento soluble es muy baja. Sin embargo, el porcentaje de complejación por los aminoácidos es muy bajo.

Una vez optimizado el método de complejación se aplicó, junto con uno de adiciones, a la determinación de la capacidad complejante en productos basados en lignosulfonatos y aminoácidos. Para ello, volúmenes crecientes de disoluciones del metal (Fe, Zn y Cu) fueron añadidas sobre disoluciones de los agentes complejantes y luego se procedió a la realización del método AOAC modificado.

Representando el elemento medido frente al añadido, se obtienen dos tipos de gráficas con dos criterios para la determinación de la capacidad de complejación: criterio del corte y criterio del máximo (figura 3.6). En general, se puede observar que el grado de complejación de los lignosulfonatos con Fe, Zn y Mn es elevado, en cambio para los aminoácidos este parámetro es bajo para los micronutrientes estudiados.

Como ya se ha comentado anteriormente, la legislación española recoge los agentes complejantes permitidos para complejar macro y micronutrientes en agricultura. En este mismo reglamento, se establecen los contenidos de elemento soluble y complejado para estos productos. Si los fertilizantes son sólidos, el porcentaje del elemento soluble mínimo debe ser del 5% y si son líquidos, el elemento soluble ha de ser al menos del 2%. En ambos casos la concentración del elemento complejado tiene que ser la mitad del soluble.

Con la idea de comprobar si los productos presentes en el mercado cumplen con los requisitos legales, se ha determinado el contenido de elemento soluble (método 9.2

Reglamento 2003/2003) y complejo (Villén et al., 2007) en correctores de carencias de micronutrientes con agentes complejantes en su formulación.

En la tabla 7.1 se muestran los resultados obtenidos para los complejos de Fe. Se puede observar que la mayor parte de los productos cumplen con las exigencias mínimas de elemento soluble, es decir, al ser formulaciones líquidas deben tener al menos un 2% de Fe soluble.

Tabla 7.1. Concentración del Fe soluble y complejo presente en productos comerciales. Datos en rojo no cumplen con la legislación.

	Complejos de Fe				
	Soluble ¹	% Complejado ²		Soluble ¹	% Complejado ²
LS1	5.35 ± 0.01	68	AA1	5.75 ± 0.05	0.43
LS2	5.44 ± 0.04	17	AA2	0.40 ± 0.02	12
LS3	4.45 ± 0.03	0.6	AG1 ³	8.17 ± 0.11	98
LS4 ³	12.55 ± 0.12	91	AG2	7.08 ± 0.07	6
LS5	5.62 ± 0.01	87	H1	7.04 ± 0.14	98
LS6	1.11 ± 0.02	1.3	H2	0.76 ± 0.01	94

¹Elemento soluble. Método 9.2. Extracción de los micronutrientes solubles en agua. (Reglamento 2003/2003)

²Elemento complejo (Villén et al., 2007).

³Producto sólido

Sin embargo para el lignosulfonato LS6, el aminoácido AA2 y el humato H2 el Fe soluble no alcanza el 2% necesario y para el lignosulfonato LS3 y el aminoácido AA1 el porcentaje de elemento complejo no llega al 50% requerido por la legislación.

En la tabla 7.2 se exponen los resultados para los complejos de Zn analizados y se puede afirmar que todos los productos contienen el elemento soluble mínimo requerido. Sin embargo, el porcentaje de elemento complejo no se cumple para LS1, LS2, LS5, AA1, AA2, AG2, H1 y H2.

7. Discusión general

Tabla 7.2. Concentración del Zn soluble y complejoado presente en productos comerciales. Datos en rojo no cumplen con la legislación.

Complejos de Zn					
	Soluble ¹	% Complejado ²		Soluble ¹	% Complejado ²
LS1	8.6 ± 0.20	1.3	AA2	2.99 ± 0.08	5
LS2	11.0 ± 0.4	1	AG1	2.08 ± 0.05	85
LS3	13.2 ± 0.3	98	AG2	9.29 ± 0.03	5
LS4	8.25 ± 0.15	97	AO1	4.92 ± 0.10	62
LS5	10.4 ± 0.6	1.1	H1	10.9 ± 0.3	1.5
LS6	3.11 ± 0.03	91	H2	5.48 ± 0.08	8
AA1	7.29 ± 0.20	28	H3	0.60 ± 0.02	98

¹Elemento soluble. Método 9.2. Extracción de los micronutrientes solubles en agua. (Reglamento 2003/2003)

²Elemento complejoado (Villén et al., 2007).

Tabla 7.3. Concentración del Mn y Cu soluble y complejoado presente en productos comerciales. Datos en rojo no cumplen con la legislación.

Complejos de Mn			Complejos de Cu		
	Soluble ¹	% Complejado ²		Soluble ¹	% Complejado ²
LS1	8.37 ± 0.01	0.7	LS1	17.9 ± 0.3	21
LS2	8.45 ± 0.24	0.1	LS2	11.8 ± 0.5	0.3
AA1	6.05 ± 0.34	0.3	AA1	0.56 ± 0.01	24
AA2	2.97 ± 0.05	0.6	AA2	9.84 ± 0.17	24
AG1	5.19 ± 0.16	92			
H1	0.68 ± 0.01	88			

¹Elemento soluble. Método 9.2. Extracción de los micronutrientes solubles en agua (Reglamento 2003/2003)

²Elemento complejoado (Villén et al., 2007).

Para los complejos de Mn y Cu, los resultados se muestran en la tabla 7.3. Todos los productos excepto el H1 y AA1 contienen el elemento mínimo soluble, sin embargo sólo

los productos de Mn AG1 y H1, cumplen con la legislación en cuanto al porcentaje de elemento complejado se refiere.

Como conclusión, se puede decir que el contenido de micronutrientes soluble y complejado presentes en los productos comerciales es el requerido por la legislación en 61% de los casos estudiados para el caso del Fe, Zn, Mn y Cu.

En cuanto al IDHA, las legislaciones tanto europea (Reglamento 2003/2003) como española (R.D. 824/2005) publican una relación de los agentes quelantes permitidos para su uso en agricultura, pero este producto aún no ha sido incluido en ninguna de ellas, debido al desconocimiento que sobre él se tiene. Como consecuencia, el método analítico tampoco ha sido implantado.

Álvarez-Fernández (2000), realizó la evaluación de la calidad de los quelatos férricos en el mercado español antes del año 1999 y posteriormente García-Marco (2005) la completó con el mismo estudio para el período 2003-2004. Se demostró que la calidad de los productos comerciales a base de quelatos férricos mejoraron a partir de la implantación del nuevo reglamento (D.O.U.E., 2003 y 2004) y de la publicación de métodos normalizados sobre la calidad de estos productos. Durante los años 2003 y 2004 se analizaron 121 muestras comerciales de las que sólo dos (1.6%) no contenían el agente quelante declarado, mientras que para las muestras analizadas antes de 1999, éstas muestran suponían el 25%

Aunque existe un método cromatográfico que permite determinar la concentración del Na_4IDS en muestras comerciales (Analytical Method, 2015-0005301-99E, CH-F/FC Analytical Dept.), sería de gran interés poder contar con una metodología que determinara el elemento quelado que además puede servirnos para mejorar la calidad de estos productos. Igual que se ha visto reflejado en los estudios sobre la calidad de los quelatos férricos realizada por Álvarez-Fernández (2000) y García-Marco (2005), cabe esperar que la implantación de un método analítico para los agentes complejantes supondría una mejora en la calidad de los mismos.

- × Se ha desarrollado una metodología válida para la determinación del elemento complejado, que junto con un método de adiciones sirve para determinar la capacidad complejante en productos comerciales.
- × Aproximadamente el 60% de los complejos presentes en el mercado de correctores de carencias de micronutrientes cumplen los requisitos mínimos de elemento soluble y complejado impuestos por la legislación española.

7.2. **Caracterización química y estabilidad en disolución**

7.2.1. Complejos.

Por lo general, el comportamiento de los quelatos y/o complejos se puede predecir usando los modelos de especiación química (MINTEQA2, Allison y col., 1990), siendo necesario conocer los datos termodinámicos correspondientes a la formación de complejos/quelatos y especies ácidas e hidroxiladas que se puedan formar. El empleo de estos modelos sirve para predecir la estabilidad y reactividad de estos compuestos en situaciones reales, de tal forma que se obtiene de herramienta que permite seleccionar, previamente a su comercialización y a su aplicación, el tipo de quelato/complejo que más se ajuste a las situaciones concretas. Sin embargo, los agentes complejantes poseen una gran variabilidad en su composición química, debida en parte a su procedencia natural y a los distintos procesos a los que son sometidos a lo largo de su transformación, de manera que no se han podido determinar las constantes de estabilidad, salvo para los aminoácidos. Es por ello que se ha estudiado su estabilidad relativa de forma experimental.

Los resultados experimentales de la estabilidad de los complejos de Fe y Zn en disolución con el pH (figura 4.1) muestran que, la mayor parte de ellos, permanecen en disolución hasta pH 7-7.5 a excepción de los de aminoácidos, gluconatos y el humato de Fe. Existe además una relación entre el porcentaje de elemento complejado (Villén y col.,

2007) y la estabilidad en disolución. Los complejos que presentan un elevado elemento complejado, por regla general, son más estables en disolución.

La estabilidad de los complejos de Fe y Zn en disolución con el tiempo muestran que todos los complejos de Fe, excepto el humato mantienen el elemento en disolución alrededor del 100% durante todo el experimento. La estabilidad del lignosulfonato de Zn es similar a la de los complejos de Fe, sin embargo, el gluconato y el aminoácido de Zn no son capaces de mantener el elemento en disolución desde los primeros momentos ensayados.

También se hizo un estudio experimental de la estabilidad de los complejos en disolución nutritiva que ha resultado ser muy elevada para las disoluciones preparadas cien veces concentradas.

7.2.2. IDHA

El IDHA es una molécula discreta por lo que si se puede realizar una especiación teórica. Para ello es necesario el conocimiento de las constantes de protonación primero, de manera que podamos conocer la acidez y basicidad de la molécula, y luego las constantes de estabilidad con los metales que, o bien formen los quelatos más estables capaces de competir con el Fe^{3+} , o bien no formen quelatos muy estables, estos metales pueden estar presentes en concentraciones elevadas en el medio donde se van a aplicar los quelatos férricos (Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos calizos, Lucena y col., 1987).

Constantes de protonación

Las constantes de protonación para el Na_4IDHA fueron determinadas por un método potenciométrico similar al desarrollado por Martell, (1989). Las cinco constantes de protonación (tabla 7.4) fueron calculadas empleando el programa BEST (Motekaitis y Martell, 1989).

Las primeras constantes corresponden con la protonación de las aminas terciarias (ver figura 7.1.) y pueden ser comparadas con las dos primeras constantes del EDTA ya que en este quelato también se refieren a aminas secundarias. Las segundas y terceras

7. Discusión general

constantes, corresponden con la protonación de los carboxilatos y las dos últimas y más bajas constantes son las de la protonación de los otros grupos carboxilatos (ver figura 7.1).

Table 7.4. Log protonation constants^a of IDS and EDTA^b.

	IDS	EDTA
$[LH^{3-}]/[H^+]\cdot[L^{4-}] \Rightarrow K_1^H$	10.18 ± 0.02	9.60
$[LH_2^{2-}]/[H^+]\cdot[LH^{3-}] \Rightarrow K_2^H$	4.51 ± 0.09	6.22
$[LH_3^-]/[H^+]\cdot[LH_2^{2-}] \Rightarrow K_3^H$	3.49 ± 0.08	2.67
$[LH_4]/[H^+]\cdot[LH_3^-] \Rightarrow K_4^H$	2.29 ± 0.30	1.99
$[LH_5^+]/[H^+]\cdot[LH_4] \Rightarrow K_5^H$	1.43 ± 0.37	

^a $\mu = 0.1$ M (NaCl); T = 25 °C

^bBramberger y Laguna, 1966

Constantes de estabilidad de los quelatos con Fe³⁺ y Cu²⁺.

Moteikaitis y col. (1990) proponen el cálculo de pM (-log[Mⁿ⁺]) como método para predecir el comportamiento de los agentes quelantes a los pH fisiológicos ya que las constantes de estabilidad por sí solas no proporcionan un dato objetivo de la estabilidad de ese compuesto. El método consiste en medir los diferentes grados de competición entre los H⁺ con el metal a un pH dado. Se basan en que los grupos donadores básicos presentan muy altas afinidades por los metales mientras que poseen bajas afinidades por los H⁺. Así los valores de pH sirven para definir el "potencial químico" del metal acuoso. Para dicha metodología lo que se usa son las constantes de protonación y las constantes de estabilidad del metal para el cual se determina el pH. Las constantes se introducen como K^c a una temperatura dada y a una fuerza iónica fija. Así, a cada valor de pH le corresponde su valor de pM. Cuanto mayor es el valor de pM, menor es la concentración que queda del ión libre, y mayor es la afinidad del agente quelante por el metal. La determinación de pFe y pCu se ha hecho empleando dos modelos diferentes.

En el primer modelo, la concentración de $[M^{n+}]$ y de las especies acuosas del metal se determinan teniendo en cuenta sólo la afinidad de los protones por el ligando (Bannochie y col., 1991). Para ello, las bases termodinámicas del programa MinteqA2, fueron modificadas para incluir las constantes de formación del IDHA (Allison, et al., 1990). Estos valores fueron determinados en el intervalo de pH de 4.0 a 12.0, fijando la fuerza iónica a 0.10 M y empleando un 10% de exceso de ligando.

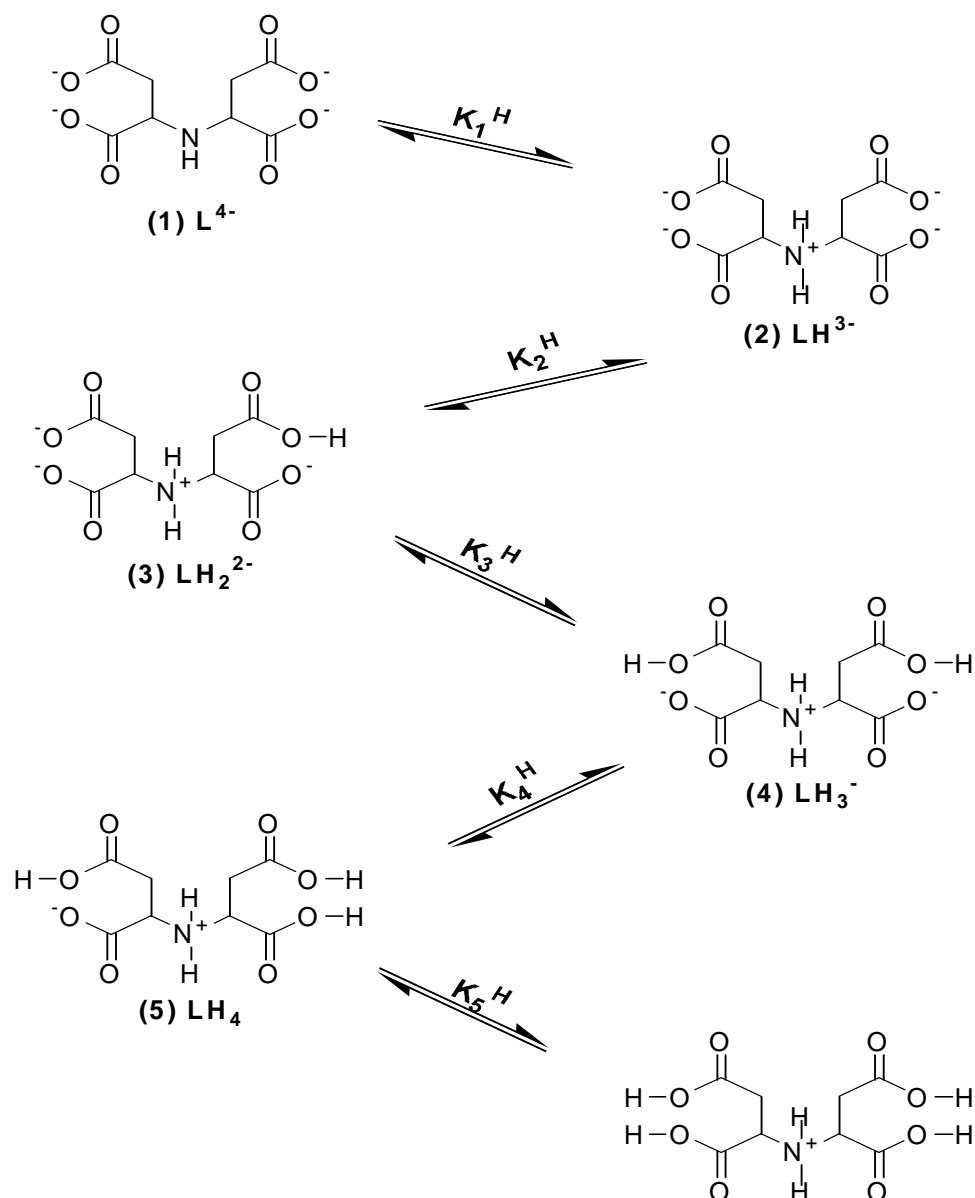


Figura 7.1. Especies formadas para el proceso de protonación del ligando IDS

7. Discusión general

En la figura 7.2. se muestra los valores de pFe y pCu para el IDHA y EDTA. El EDTA muestra valores superiores para el pFe y el pCu, indicando que forma quelatos más estables con el Fe^{3+} y Cu^{2+} que el IDHA. Esta diferencia en la afinidad de los ligandos ya ha sido explicada (capítulo 5) debido a la distinta coordinación de los quelatos. El EDTA posee seis grupos funcionales para quelar metales, mientras que el IDHA sólo tiene cinco, de manera que los quelatos que se forman son más estables para el EDTA.

En el segundo modelo, los valores de pM son calculados en disolución nutritiva, de manera que comprobamos su comportamiento en condiciones agronómicas. IDHA/ Fe^{3+} fue introducido en la disolución nutritiva de Hoagland.

En la figura 7.3 se muestran los valores de pFe y pCu para el IDHA y EDTA. Para el pFe, el EDTA presenta valores mayores a pH inferior a 9.0, como ocurre en el primer modelo. Sin embargo, el pCu muestra valores superiores para el IDHA a valores de pH inferiores a 8.5.

Figura 7.2. A) pFe-3pH and B) pCu-2pH empleando el primer modelo.

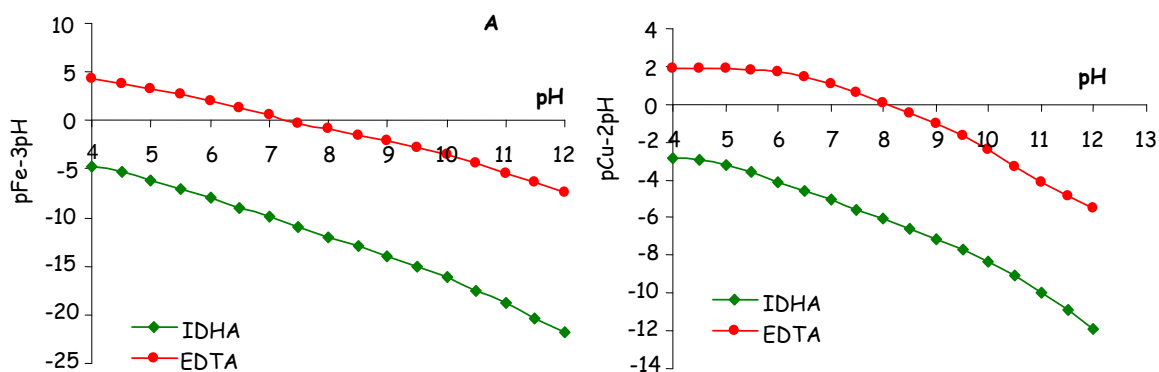
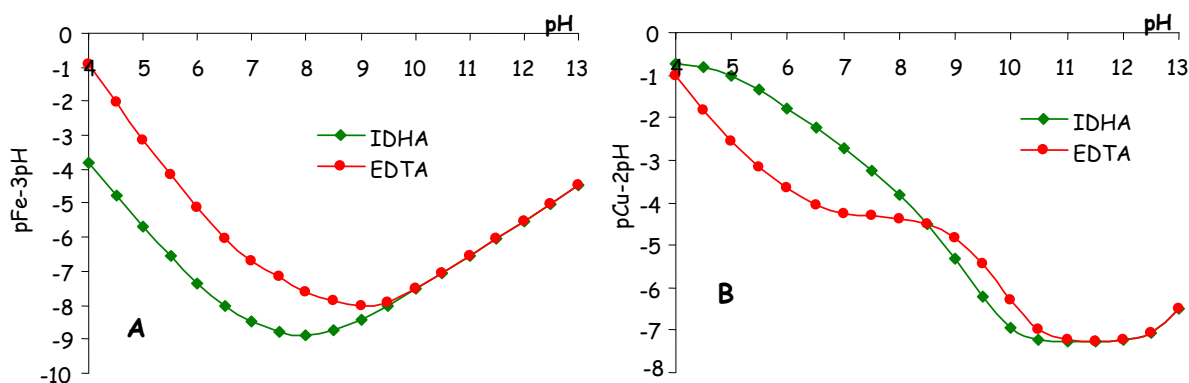


Figura 7.3. A) pFe-3pH y B) pCu-2pH obtenidos empleando el segundo modelo



Modelización teórica de los quelatos en condiciones agronómicas

Se ha realizado la distribución de las especies de IDHA en el intervalo de pH 4.0-13.0 para tres modelos teóricos, considerando su uso agronómico: en disolución, en hidroponía y en suelos.

El primer modelo, el comportamiento del IDHA se evalúa usando la disolución nutritiva de Hoagland y sin permitir la precipitación de Fe. En el segundo modelo, (en hidroponía), se introduce el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ amorfo para controlar la solubilidad. En el tercero, se evalúa la estabilidad en suelos, de manera que éstos se incluyen en el modelo teórico. También se realizó la especiación química para el EDTA

De las gráficas obtenidas (figura 7.4-7.6), se puede concluir que el IDHA/ Fe^{3+} no es muy estable ni a pH bajos y ni en ausencia de metales y protones competidores, de manera que parece que no es quelato eficaz para proporcionar Fe a las plantas en estas condiciones agronómicas.

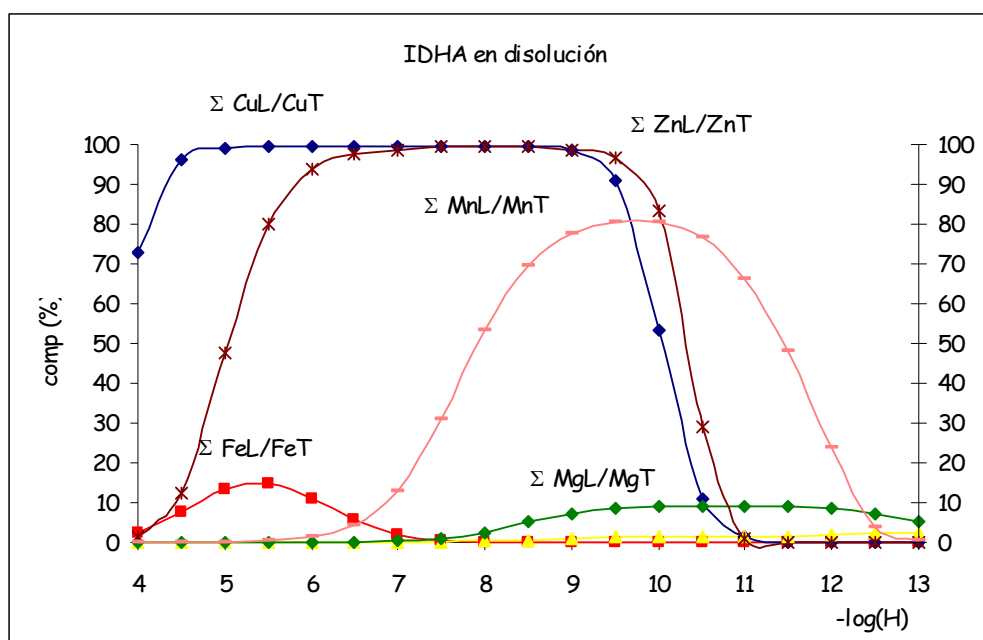


Figura 7.4. Distribución de las especies (% especie respecto del agente quelante total). Disolución nutritiva y sin precipitación de Fe.

La baja estabilidad que se pone de manifiesto en estos estudios no concuerda con los resultados experimentales que muestran una adecuada estabilidad hasta pH 8, aunque

7. Discusión general

inferior a la mostrada por el EDTA/ Fe^{3+} , de manera que podemos decir que la validez de las constantes publicadas es cuestionable.

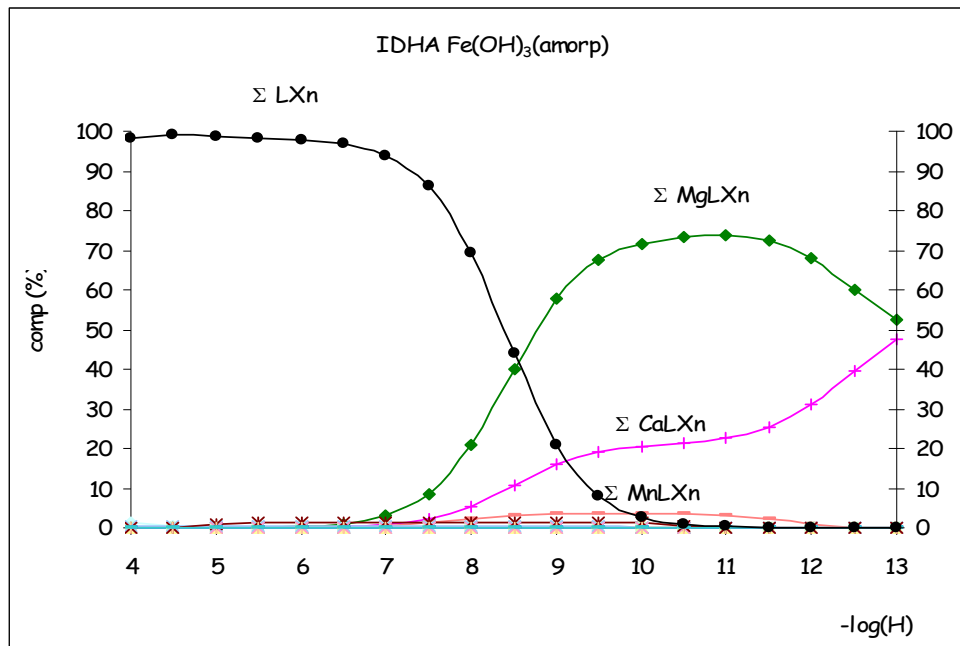


Figura 7.5. Distribución de las especies (% especie respecto del agente quelante total). Disolución nutritiva con precipitación de $Fe(OH)_3$ amorfo

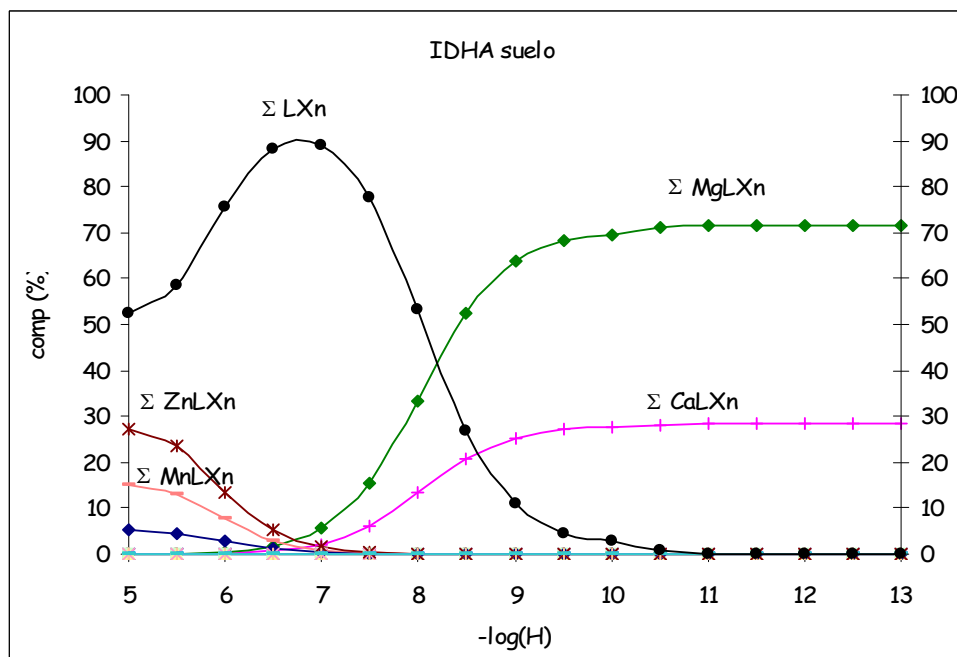


Figura 7.6. Distribución de las especies (% especie respecto del agente quelante total). Ferrihidrita del suelo (Lindsay, 1979)

- × La estabilidad observada de los productos en disolución es, en general elevada hasta pH 7-7.5 para los complejos y a pHs algo superiores para el IDHA/Fe³⁺.
- × Las constantes publicadas para el IDHA no corresponden con los resultados experimentales, por lo que se recomienda su revisión.

7.3. Evaluación de la reactividad con distintos suelos y materiales edáficos.

La eficacia de un quelato/complejo depende de la estabilidad del ligando y del compuesto, de la reactividad del quelato/complejo con el suelo, de la habilidad de las raíces de las plantas para tomar el elemento aportado por el quelato/complejo y de la capacidad del ligando para solubilizar elemento nativo del suelo y formar de nuevo el quelato/complejo (Lucena, 2005).

Las pérdidas del elemento soluble en la disolución del suelo reducen la efectividad de los fertilizantes aplicados y pueden deberse a baja estabilidad del quelato/complejo en disolución y/o a los fenómenos de adsorción en las superficies del suelo.

Con respecto a la adsorción de los ligandos en los suelos, la efectividad de éstos está limitada por la adsorción de los quelatos/complejos de Fe o de los ligandos en las fases sólidas (Sánchez-Andréu y col., 1991). Los factores que afectan la adsorción incluyen el tipo de ligando, el ión metálico, tiempo, pH, concentración de sales y la textura del suelo (Norvel, 1991). A pesar del gran número de estudios realizados sobre la estabilidad de los quelato/complejo en suelos, ni los mecanismos ni los lugares de adsorción son conocidos, algo que no es de extrañar debido a la gran variedad de productos y de materiales edáficos implicados. Como es de esperar, la carga negativa presente en los minerales de la arcilla, no es efectiva adsorbiendo los quelatos que son formas predominantemente aniónicas (Hemwall, 1958 y Stewart y Leonard, 1954) sin embargo, las cargas positivas presentes en los óxidos de hierro y en otros coloides

7. Discusión general

parecen ser más importantes. La adsorción de los quelatos por las superficies con carga dependiente del pH, como los óxidos o la turba, decrece con el aumento del pH.

En cuanto a los experimentos de interacción con los suelos y materiales edáficos, todos los complejos sufren una gran retención en estos materiales, sobre todo en los suelos calizos y las arcillas. Entre los complejos comerciales estudiados, los que sufren más retención son los aminoácidos y los humatos, tanto de Fe como de Zn. Las mayores interacciones se dan con los suelos calizos y para estas interacciones el pH final se sitúa alrededor de 8. A este pH, el elemento que permanece en disolución sufre una gran disminución como puede verse en los ensayos de estabilidad en disolución con el pH. Para las interacciones con la turba y la ferrihidrita, los pH son 4 y 5 respectivamente y está relacionado con la menor interacción observada para estos materiales.

En los ensayos que hemos descrito en esta memoria, vemos que la concentración de Fe que permanece en disolución cuando el IDHA/Fe³⁺ interacciona con diferentes suelos y materiales edáficos es muy baja, mientras que tanto el o,o-EDDHA/Fe³⁺ y el EDTA/Fe³⁺ mantienen en disolución elevadas concentraciones de Fe. Este comportamiento está relacionado con la estabilidad con el pH. Consideramos que aparte de los fenómenos de degradación y de adsorción en los suelo, el bajo contenido de Fe en disolución es debido al desplazamiento del Fe del quelato ya que en este ensayo, el pH fue ajustado a 8.

- × Aunque la reactividad de los complejos y del IDHA/Fe³⁺ en suelos y materiales edáficos es muy elevada, la concentración del elemento en disolución es superior para el IDHA para todos los materiales estudiados.

7.4. Eficacia para proporcionar nutrientes a las plantas

7.4.1. Aplicaciones en hidroponía

Los estudios sobre la aplicación de distintos complejos en hidroponía muestran que, por ejemplo los lignosulfonatos son tan efectivos como el EDTA manteniendo el Fe en disolución, aunque para nutrientes como el Mn y Zn la estabilidad para el EDTA es mayor que para el lignosulfonato. Las plantas tratadas con EDTA y lignosulfonatos muestran un aporte de Fe similar y en el rango de suficiencia para ambos tratamientos (Demeyer y col., 2001). En el caso de los humatos (Lua y Bohme, 2001), su aplicación en hidroponía con sustratos como la perlita o fibra de coco a plantas de tomate, favorecen la elongación de las raíces y tallos en dependiendo de la concentración del humato, del sustrato empleado y de la frecuencia de los tratamientos.

Los ensayos de aplicación del IDHA/Fe³⁺ en hidroponía se describen a continuación, haciendo mención a los resultados más relevantes.

En el primer ensayo biológico realizado con plantas de pepino desarrolladas en hidroponía, el IDHA/Fe³⁺ junto con el *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ presentan mejores resultados que el EDTA/Fe³⁺ para el índice SPAD y los datos biométricos. En la concentración de Fe en hoja, existen diferencias significativas entre el IDHA/Fe³⁺ y el *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ a partir del segundo muestreo, siendo superior para éste último. El EDTA/Fe³⁺ es el tratamiento que menor concentración de Fe hoja presenta.

En el segundo ensayo biológico con plantas de soja en desarrolladas en hidroponía, los resultados para el índice SPAD son similares para IDHA/Fe³⁺ y el *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ aunque superiores para el IDHA/Fe³⁺. Los datos biométricos muestran que el IDHA/Fe³⁺ y *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ son los mejores tratamientos de Fe. La concentración de Fe en hoja es superior para el IDHA/Fe³⁺, para el Mn el tratamiento que aporta mayores concentraciones es el EDTA/Fe³⁺ y para el Zn, los mejores tratamientos son IDHA/Fe³⁺ y *o,o*-EDDHA/Fe³⁺.

Lucena (2006) y Lucena y col, (2007) observaron que el *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ era un quelato mejor que el EDTA/Fe³⁺ proporcionado Fe a la planta cuando eran aplicados en

hidroponía y que esto estaba relacionado con la mayor estabilidad del o,o -EDDHA/ Fe^{3+} que hace que disminuya el desplazamiento del metal desde el quelato. Sin embargo no sólo la estabilidad es importante. Lucena y col. (2006) mostraron que los quelatos menos estables son los mejores sustratos de la Fe-quelato reductasa, permitiendo una mayor nutrición férrica y García-Marco y col. (2006) mostraron que el o,p -EDDHA/ Fe^{3+} era más rápido que el quelato estable o,o -EDDHA/ Fe^{3+} proporcionando Fe a las plantas de pepino. En este experimento, la mejor respuesta del o,p -EDDHA/ Fe^{3+} frente al o,o -EDDHA/ Fe^{3+} no se explica debido a las constantes de formación que son para el primero $\log K_{FeL} = 28.72$ (Yunta y col., 2003a) y $\log K_{FeL} = 35.09$ (Yunta y col., 2003b) para el segundo sino debido a la distinta coordinación de los quelatos. El hecho de que en el o,p -EDDHA/ Fe^{3+} , el Fe(III) se encuentre unido a la molécula de agente quelante por medio de cinco grupos funcionales en lugar de seis, hace que sea una molécula más abierta y por tanto más accesible para la enzima Fe-quelato reductasa. Algo similar puede considerarse que ocurre entre el EDTA/ Fe^{3+} y el IDHA/ Fe^{3+} . Las constantes de estabilidad para ambos quelatos son $\log K_{FeL} = 25.0$ (Martell y Smith, 1974) y $\log K_{FeL} = 15.2$ (Martell, 1989) respectivamente. Cabría por tanto esperar que debido a la mayor estabilidad del EDTA/ Fe^{3+} , este quelato fuera mejor proporcionando Fe a la planta. Los resultados sugieren sin embargo, que debido a que el IDHA/ Fe^{3+} posee cinco grupos funcionales y no seis como el EDTA/ Fe^{3+} , para enlazar al Fe, es mejor sustrato para la enzima.

Con los experimentos biológicos realizados en invernaderos comerciales nos propusimos evaluar y comparar la eficacia del IDHA y del EDTA como fertilizante de micronutrientes en aplicaciones donde se minimizara la interacción con sustratos que pudieran disminuir la eficacia del IDHA.

En el experimento realizado en el invernadero de la UAM con plantas de judía verde sobre lana de roca, se puede ver que el IDHA y el EDTA presentan valores del índice SPAD similares aunque significativamente superiores para el IDHA a partir del día 31. Estos valores son superiores a los encontrados para el tratamiento control (deficiente en Fe). El contenido de micronutrientes en hoja está en el rango de suficiencia (Jones y col., 1991) para el IDHA y el EDTA, excepto para el Mn en el tratamiento con el IDHA. La

nutrición de Fe es mejor para el EDTA y la de Mn y Zn mejor para el IDHA. Los índices de micronutrientes demuestran que existe un buen equilibrio nutricional para los dos tratamientos. En cuanto al tamaño y rendimiento de las plantas, no existen diferencias entre IDHA y EDTA, aunque son superiores que para el tratamiento control.

En ensayo de tomate sobre lana de roca los índices de SPAD muestran una mejor recuperación para el IDHA y la concentración de micronutrientes en hoja es similar para los dos tratamientos, manteniéndose en rangos de suficiencia excepto para el Zn.

El tercer y último ensayo fue realizado con plantas de tomate en enarenado. Los índices de SPAD son significativamente superiores para el IDHA. El contenido de Fe del IDHA en el primer muestreo es inferior al del EDTA, sin embargo estas diferencias desaparecen para el segundo y tercer muestreo y para el resto de los micronutrientes analizados. En este experimento todos los micronutrientes permanecen en los rangos de deficiencia. En cuanto al rendimiento del cultivo y el diámetro del tallo, no existen diferencias entre los tratamientos.

Los resultados que han sido expuestos en el apartado anterior, muestran que el IDHA es un quelato de baja estabilidad y elevada reactividad frente a materiales edáficos (Villén y col., 2007). Estos resultados corroboran los obtenidos en los experimentos de tomate en enarenado donde la baja frecuencia de aplicación y la elevada interacción con el sustrato reduce la efectividad en la nutrición de Fe, mostrándose diferencias. Sin embargo, si que existe una mejora en la nutrición del Zn para los tratamientos con IDHA y EDTA.

El IDHA/ Fe^{3+} no se encuentra presente en disolución en lo suelos calizos donde el pH se sitúa alrededor de 8.5, pero en los ensayos de estabilidad en disolución muestran que sí es capaz de mantener el Fe en disolución a pH 7.5 o inferiores, de manera que puede ser aplicado en fertirrigación e hidroponía (Villén y col., 2007). Todo esto queda demostrado con los resultados obtenidos en los experimentos de hidroponía, donde la elevada frecuencia de aplicación hace que exista menos interacción entre la disolución y

el sustrato y por tanto, la eficacia del IDHA para proporcionar micronutrientes a plantas de judía verde y tomate queda demostrada.

En el experimento con plantas de judía verde, las plantas tratadas con IDHA son saludables y tienen una buena nutrición, su contenido de micronutrientes se encuentra equilibrado y su rendimiento es adecuado. En cuanto a las plantas tratadas con EDTA, el contenido de micronutrientes en hoja es superior al de las plantas tratadas con IDHA. Sin embargo, las plantas tratadas con el EDTA son más susceptibles a la aparición de infecciones por criptogámicas que las tratadas con IDHA. Esto puede deberse a que cuando las plantas son tratadas con quelatos, los microorganismos pueden obtener suficiente Fe para su crecimiento y por tanto pueden infectar la planta u otra explicación sería que los quelatos o sus productos de degradación puedan interferir en la resistencia natural de la planta contra las infecciones microbianas (Bienfait y col. 2004). Ya que la infección era bastante menor en las plantas tratadas con IDHA suponemos que es debido a la más rápida degradación de este quelato dentro de la planta.

Para el experimento con plantas de tomate en lana de roca, el IDHA presenta mayores incrementos en el índice SPAD que el EDTA y mejor nutrición de Zn que el control.

Debido a que se han obtenido parámetros nutricionales y rendimiento de los cultivos similares entre ambos quelatos estudiados, el agente quelante biodegradable IDHA se presenta como una alternativa al uso EDTA en la prevención de posibles deficiencias nutricionales cuando es aplicado cultivos hidropónicos o en fertirrigación donde se minimiza la interacción con sustratos que puedan producir una elevada retención del quelato.

7.4.2. Aplicaciones foliares

La fertilización foliar se ha convertido en una práctica común e importante para los productores, porque corrige las deficiencias de nutrientes de las plantas, favorece el buen desarrollo de los cultivos y mejora el rendimiento y la calidad del producto. Aunque las aplicaciones foliares no suelen sustituir a la fertilización tradicional de los cultivos, sí

es una práctica que sirve de respaldo o apoyo para suplementar o completar los requerimientos nutricionales de un cultivo que no se pueden abastecer mediante la fertilización común al suelo. Como ya hemos descrito anteriormente la interacción de los fertilizantes con el suelo depende de muchos factores y puede hacer que la efectividad del producto se vea disminuida. De aquí, que las aplicaciones foliares para ciertos nutrientes y cultivos, bajo ciertas etapas del desarrollo de la planta, sea ventajosa y a veces más eficiente en la corrección de deficiencias que la fertilización edáfica.

Para los complejos, los experimentos biológicos muestran que los complejos de Zn mejoran el aspecto visual de plantas tratadas vía foliar. El contenido total de Zn en la raíz para todos los complejos, el control y el cloruro es significativamente superior al tratamiento -Zn. Los tratamientos con mejores resultados son el gluconato, seguido por el lignosulfonato, aminoácido y control y que tienen menor contenido de Zn raíz son el humato y el cloruro seguido por el -Zn.

Para las plantas tratadas con complejos de Ca y con las dosis ensayadas, no se observan diferencias significativas entre tratamientos a excepción del -Ca

Los resultados del índice Ca/K obtenidos por Microcopia Electrónica de Barrio para el segundo muestreo, muestran los tratamientos con aminoácido, lignosulfonato y el control son significativamente superiores seguidos por el gluconato y cloruro. Los tratamientos con menor índice Ca/K son el humato y el -Ca. Para el tercer muestreo, los tratamientos con el índice Ca/K superior son el lignosulfonato, aminoácido y gluconato seguidos del humato y cloruro.

Para ambos muestreos, se puede observar que el índice Ca/K es superior en los puntos que corresponden con el haz y el envés de la hoja, de manera que podemos decir que se ha producido la penetración del elemento aplicado a través de los complejos.

Una revisión bibliográfica muestra que estos complejos son efectivos en las aplicaciones foliares. Stanchev y col. (1982), demostraron que la aplicación de un humato de Zn vía foliar aumenta el contenido de clorofilas y carotenos y la actividad de la ATPasa en plantas de maíz. También la aplicación de lignosulfonatos de Zn (Boaretoo, y

col., 2002) a plantas de naranja desarrolladas en invernadero aumenta el contenido de Zn en hoja hasta rangos de suficiencia, al igual que los otros tratamientos aplicados (EDTA/Zn²⁺, ZnCl₂ y ZnSO₄). Sin embargo, no fueron apreciadas mejoras en el rendimiento y calidad del cultivo. En plantas de café, los lignosulfonatos de Zn, al igual que el EDTA/Zn²⁺, ZnSO₄ aplicados vía foliar son efectivos para mantener el Zn en niveles de suficiencia aunque tampoco se producen aumentos en el rendimiento del cultivo (Rosolem y Sacramento, 2001).

Para el IDHA, autores como Fernández y col. (2006) demostraron que aplicaciones foliares de IDHA/Fe³⁺ producen un mayor aumento en el contenido en clorofila en hoja que el DTPA/Fe³⁺, pero inferiores al EDTA/Fe³⁺. Schlegel y col. (2006) testaron la aplicación foliar en discos de hojas de haba de diferentes compuestos de Fe al 100% de humedad. La penetración seguía una cinética de primer orden y era mayor con luz que sin ella. Se demuestra que el IDHA/Fe³⁺ es más efectivo que el citrato pero menos que el CaCl₂ y el lignosulfonato.

- × La aplicación de complejos tanto en hidroponía como por vía foliar proporcionan una correcta nutrición de las plantas, que se mantiene dentro de los rangos de suficiencia, aunque no se observan mejoras en el rendimiento de los cultivos.
- × El IDHA es un buen quelato para proporcionar Fe a plantas de pepino y soja en hidroponía pH 7.5 y para aportar micronutrientes en aplicaciones a cultivos hidropónicos o en fertirrigación, obteniéndose parámetros nutricionales y rendimiento de los cultivos similares al EDTA.

7.5. Uso potencial de complejos e IDHA en Agricultura.

A continuación, se van a exponer muy brevemente los resultados obtenidos, ya sea a través de la bibliografía o experimentalmente, para los complejos y el IDHA.

En general, el comportamiento de los complejos en las distintas condiciones en las que se han estudiado es peor al de los quelatos de síntesis. Comparándolos con el IDHA, la estabilidad en disolución es ligeramente inferior y sufren más interacciones con suelos y materiales edáficos, aunque hay que decir que tanto los complejos como el IDHA quedan fuertemente retenidos en todos los materiales estudiados y sobre todo a los suelos calizos testados.

Se puede decir que, los complejos y el IDHA son capaces de mantener una adecuada nutrición de micronutrientes, manteniéndose dentro de los rangos de suficiencia, tanto en hidroponía como para aplicaciones foliares. Los resultados que se obtienen son, en ambos casos similares a los obtenidos para el EDTA.

Sin embargo, existen otras características de estos productos que pueden hacer que se favorezca la aplicación de uno u otro producto. El precio de los productos presentes en el mercado de correctores de carencias y basados en agentes complejantes tienen un precio inferior (2-4 € Kg⁻¹) que el de los quelatos (6-12€ Kg⁻¹).

También hay que hacer notar que el IDHA es una molécula biodegradable según la directiva europea (D.O.U.E. 301-E y 302B), que establece que un producto degradable ha de descomponerse dentro de un período de tiempo de 28 días. Aunque este estudio no ha sido realizado con los complejos, los resultados del ensayo de estabilidad con el tiempo muestran que estos productos no se degradan en este período de tiempo. Sin embargo, mientras que el IDHA es una molécula de síntesis, los agentes complejantes son productos naturales que se generan como subproductos de otras industrias, de manera que con su uso se está les dando salida y se está aliviando el problema de la gestión de residuos de industrias tan importantes como la papelera, ganadera o alimentaria.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo y su discusión se pueden extraer las siguientes conclusiones.

- 1. Se presenta como metodología analítica más adecuada para la determinación del elemento complejado en productos comerciales el método AOAC modificado.**

La determinación del elemento complejado por el método AOAC modificado consiste en la precipitación de las formas no complejadas como óxidos e hidróxidos a pH 9.0. En la disolución es determinada la fracción del elemento que se encuentra complejado. Este método, combinado con la adición de volúmenes crecientes de disoluciones del metal a estudiar, es válido para determinación de la capacidad complejante de los productos mediante valoraciones.

Además, este único y sencillo método es válido para la gran cantidad de agentes complejantes presentes en el mercado.

- 2. En general, los complejos poseen una baja estabilidad en disolución con el pH y elevada reactividad frente a suelos y materiales edáficos que hacen que aplicación a estos suelos no sea una práctica eficaz. Sin embargo la estabilidad frente al tiempo y en disoluciones nutritivas concentradas es elevada.**

Los complejos de Zn son capaces de proporcionar una buena nutrición a plantas de pepino desarrolladas en hidroponía cuando éstos son usados en aplicaciones foliares. Sin embargo, las aplicaciones foliares de complejos de Ca no muestran diferencias significativas entre tratamientos excepto para el control (con nutrición completa en hidroponía).

La Microscopía Electrónica de Barrido se presenta como una herramienta útil que permite evaluar la eficacia relativa de los complejos. Los resultados muestran contenidos de Ca ligeramente superiores en el haz y envés de la hoja, sugiriendo la penetración del elemento aplicado en ella.

3. Se ha evaluado la estabilidad química y el comportamiento del IDHA/ Fe^{3+} en distintas condiciones agronómicas.
 - 3.1. El IDHA presenta baja estabilidad en disolución con el pH y una elevada reactividad frente a suelos y materiales edáficos. Sin embargo es un buen quelato para proporcionar Fe a plantas de pepino y soja en hidroponía pH 7.5. Los resultados obtenidos están relacionados con posesión de sólo cinco grupos funcionales para quelar al Fe, que hacen que sea una molécula menos estable pero más accesible a la enzima Fe-quelato reductasa.
 - 3.2. Debido a los similares parámetros nutricionales y rendimiento de los cultivos, el agente quelante biodegradable IDHA se presenta como una alternativa al uso EDTA en la prevención de posibles deficiencias nutricionales cuando es aplicado cultivos hidropónicos o en fertirrigación donde se minimiza la interacción con sustratos que puedan producir una elevada retención del quelato.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

- Airen, G. R.; McKnight, D. M.; Wershaw, R. L.; MacCarthy, P. (1985).** Introductory remarks. En: Humic substances in soil, sediment and water. Airen, G. R.; McKnight, D. M.; Wershaw, R. L.; MacCarthy, P (Eds.), Wiley, New York, pp 1-12.
- Allen, B. L. y Hajek, B.F. (1989).** Mineral occurrence in soil environments. En: Minerals in soil Environments. 2nd. Edition-SSSA Book Series, nº 1. pp. 199-278.
- Allison, J. D.; Brown D. S. y Novo-Gradak K. J. (1990).** *MINTEQA2/PRODEFA2. A Geochemical Assesment Model for Environmental Systems. Version 3.0. User's Manual.* Washington D. C., Environmental Research Laboratory. United States Environmental Protection Agency.
- Álvarez, J. M.; Rico, M.; Obrador, A. 1996.** Lixiviation and extraction of zinc in a calcareous soil treated with zinc chelates fertilizar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44(10): 3383-3387.
- Álvarez-Fernández, A. (1995).** Interacción de quelatos férricos con componentes del suelo. Aplicación en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Memoria de licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.
- Álvarez-Fernández, A.; Gárate, A.; Juárez, M. y Lucena, J.J. (1996).** Tomato acquisition of iron chelates in a calcareous sandy substrate. *J. Plant Nutr.* 19(8&9), 1279-1293.
- Álvarez-Fernández, A.; Gárate, A. y Lucena, J.J. (1997).** Interaction of iron chelates with several soil materials and with a soil standard. *J. Plant Nutr.* 20(4&5), 559-572.
- Álvarez-Fernández, A., Pérez-Sanz, A and Lucena J.J. 2001.** Evaluation of washing procedures on mineral analysis for orange and peach leaves sprayed with seaweed extracts enriched with iron. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32(1-2): 157-170.
- Álvarez-Fernández, A.; M.A. Sierra y J.J. 2002.** Lucena. Reactivity of synthetic Fe chelates with soils and soil components. *Plant and Soil.* 241, 129-137.

- Álvarez-Fernández, A.; García-Marco, S. y Lucena, J. J.** (2005). Evaluation of synthetic Iron(III)-chelates (EDDHA/ Fe^{3+} , EDDHMA/ Fe^{3+} and EDDHSA/ Fe^{3+}) to correct iron chlorosis. *Eur. J. Agro.*, 22, 119-130.
- Alison, J. D.; Brown, D. S.; Novo-Gradak, K. J.** 1990. MINTEQA2/PRODEFA2. In *A Geochemical Assessment Model for Environmental Systems. Version 3.0. User's Manual*; Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC.
- AOAC Official Method 983.03.** 1983. Iron (Chelated) in iron chelates concentrates. Atomic Absorption spectrophotometric method.
- Appelblad, PK.; Baxter, D. C.; Thunberg, J. O.** (1999). Determination of metal-humic complexes, free metal ions and total concentrations in natural waters. *J Environ. Monit.* 1, 211-217.
- Ashmead, H.D.** (1986). The absorption mechanism of amino acids chelates by plant cells. Noyes Publications 219-235.
- Baver, L. D.** (1963). The effect of organic matter on soil structure. *Pontif. Acad. Sci. Scr. Varia* 32: 383-413.
- Bienfait, H. F., García-Mina, J., Zamareño, A. M.** 2004. Distribution and secondary effects of EDDHA in some vegetable species. *Soil Sci Plant Nutr*, 50(7) 1103-1110.
- Binghan, F. T.; Sims, J. R. y Page, A. L.** (1965). Retention of acetate by montmorillonite. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29:670-672.
- Brandt, B.** (1991). Chelating power of natural substances in aqueous solutions. *GIT Fachzeitschrift fuer das Laboratorium*, 35, 193-196.
- Breteler, H.; Arnozis, P.A.** (1985). Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Phytochemistry* 24(4): 653-7.
- Cadahía, C.; Gárate, A. y Lucena J.J.** (1987). Oligoelementos en fertirrigación. *Actas I Simposio Nacional de Fertilización en Riego Localizado. Almería.* pp. 221-230.

- Calvet, R.; Tercé, M. y Arvieu, J. C.** (1980). Mise au point bibliographique adsorption des pesticides par les solos et leurs constituants. I. Description du phénomène d'adsorption. *Ann. Agron.* 31(1):33-62.
- Carpena, O.** Contribución al conocimiento de la clorosis férrica en Citrus. 1966. pp.: 36. Ed. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC): Murcia, Spain.
- CEN. EN 13368-2001:2 E.** (2001b). Determination of chelating agents in fertilizers by Ion Chromatography Part 2: EDDHA and EDDHMA
- CEN. EN 13368-2001:2 E.** (2001a). Determination of chelating agents in fertilizers by Ion Chromatography Part 1: EDTA, HEDTA and DTPA.
- CEN. EN 13368-2001:2 E.** (2001b). Determination of chelating agents in fertilizers by Ion Chromatography Part 2: EDDHA and EDDHMA.
- CEN. EN 13368-2:2006.** Fertilizers - Determination of chelating agents in fertilizers by chromatography - Part 2: Determination of Fe chelated by o,o-EDDHA and o,o-EDDHMA by ion pair chromatography
- Cerdán, M.; Alcañiz, S.; Juárez, M.; Jordá, J. D.; Bermúdez, D.** 2007. Kinetic behaviour of Fe(o,o-EDDHA)-humic substance mixture in several soil components and in calcareous soil.
- Chen, Y. y Aviad, T.** (1990). Effects of humic substances on plant growth. En: *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings.* (Ed) P. McCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcom y p.R. Bloom. American Society of Agronomy, Inc. Soil Science of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Chen, Y., Barak, P.** Iron nutrition of plants in calcareous soils. 1982. *Adv. Agron.* 5, 217.
- Chen, Y., Schnitzer, M.** (1978). The surface tension of aqueous solutions of soil humic substances. *Soil Sci.* 125:7-15.

- Chen, Y.; Stevenson, F. J.** 1986., Soil organic matter interactions with trace elements. En: The role of organic matter in modern agriculture. pp 73-116. (Eds) y. Chen y Y, Avnimelech. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht.
- Cihacek, L. K.** 1984. Economical Soil Treatment of Iron Chlorosis in Grain Sorghum Grown on a Gypsum Affected Soil. *Journal of Plant Nutrition*, 7: 329-340.
- Cox, F. R., Shuman, L. M. and Welch, R. M.** pp. 187-227. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Dixit, V. K. y Kishore, N.** (1967). Effect of humic acid and fulvic acid fraction of soil organic matter of seed germination. *Indian J. Sci. Ind. Sec. A* 1:202-206.
- Dogan, A.; Köseoglu, F. y Kilic, E.** (2001). The Stability constants of copper(II) complexes with some α -amino acids in dioxin-water mixtures. *Anal. biochem.*, 295, 237-239.
- Fernández, V., Río, V., Abadía, J., Abadía, A.** (2006). Foliar Iron Fertilization of Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): Effects of Iron Compounds, Surfactants and Other Adjuvants. *Plant Soil*. 289 (1-2), 239-252.
- Gamble, D. S.; Schnitzer, M.; Hoffman, I.** 1970. Cu^{2+} -fulvic acid chelation equilibrium in 0.1M potassium chloride at 25.0deg. *Canadian Journal of Chemistry*, 48(20), 3197-204.
- Gangloff, W. J., Westfall D. G. Peterson, G. A., Mortvedt, J. J.** (2002). Relative availability coefficients of organic and inorganic Zn fertilizers. *J. Plant Nutr.* 25(2), 259-273.
- García-Marco, S.** (2005). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- García-Marco, S., Martínez, N., Yunta, F., Hernández-Apaolaza, L., Lucena, J. J.** (2006). Effectiveness of Ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N' (p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) to supply iron to plants. *Plant Soil*. 279, 31-40.

- García-Marco, S.; Torreblanca, A.; Lucena, J.J.** 2006. Chromatographic determination of Fe chelated by ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid in commercial EDDHA/Fe³⁺ fertilizers. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1380-1386. **G**
- García-Mina, J. M.** 2006. Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal-humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Organic Geochemistry*. 37, 1960-1972.
- Geelhoed, J. S.; Hiemstra, T.; Van Riemsdijk, W. H.** 1998. Competitive interaction between phosphate and citrate on goethite. *Environmental Science Technology*, 32: 2119-2123.
- Grafe, M.; Eick, M. J.; Grossl, P. R.; Sanders, A. M.** 2002. Adsorption of arsenate and arsenite on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. *Journal of Environmental Quality*, 31: 325-330.
- Greenland, D. J.; Lindstrom, G. R. Quirk, J. P.** (1961). Role of polysaccharids in stabilisation of natural soil aggregates. *Nature* 191: 1283-1284.
- Greenland, D. J.; Lindstrom, G. R. Quirk, J. P.** (1962). Organic materials which stabilize natural soil aggregates. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 26: 366-371.
- Gómez-Gallego, M., Sierra, M. A., Alcázar, R., Ramírez, P., Piñar, C., Mancheño, M. J., García-Marco, S., Yunta, F., Lucena, J. J.** (2002). Synthesis of o,p-EDDHA and its detection as the main impurity in o,o-EDDHA commercial iron chelates. *J. Agric. Food Chem.* 50(22), 6395-6399.
- González, C.** (1986). Producción de un fertilizante orgánico por oxidación de lejías negras de una aplata celulosa. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oviedo.
- Goos, R.J.; Germain, S.** (2001). Solubility of twelve iron fertilizer products in alkaline soils. *Communications of Soil Science and Plant Analysis*, 32(13 & 14): 2317-2323.
- Hemwall, J. B.** 1958. Reactions of ferric ethylenediaminetetracetate with soil clay minerals. *Soil Sci.*, 86, 126-132.

- Hernández-Apaolaza, L.; Barak, P. y Lucena J.J.** (1997). Chromatographic determination of commercial Fe(III) chelates of ethylene diaminetetraacetic acid, ethylene diaminedi(o-hydroxyphenylacetic) acid and ethylenediaminedi(o-hydroxy-p-methylphenylacetic) acid. *J. Chromatogr. A.*, 789, 453-460.
- Hernández-Apaolaza, L.; Lucena, J. J.** 2001. Fe(III)-EDDHA and -EDDHMA sorption on Ca-Montmorillonite, Ferrihydrite, and Peat. *J. Agric. Food Chem.* 49(11): 5258-5264.
- Hjelte, V. y Aminke, S.** (1989). The relative stability of Fe-EDDHMA and Fe-EDDHA in a pH range of 4 to 9. *Comm. 5th Inter. Symp. Iron Nutr. Interac. Plants.* Ramat-Rachel. Israel.
- Hyvönen, H.; Orama, M., Saarinen, H. and Aksela, R.** 2003. Studies on biodegradable chelating agents: complexation of iminodisuccinic acid (ISA) with Cu(II), Zn(II), Mn(II) and Fe(III) ions in aqueous solution. *Green Chemistry.* 5, 410-414.
- Jones, J. B., Wolf, B., Mills, H.** 1991. Tables of interpretative values. Appendix 1. In: *Plant Analysis Handbook. A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide.* Micro-Macro Publishing, ICN. Athens, Georgia, pp 117-192.
- Joyce, C. S.; Kleinert, T. N.** 1957. Short wave-length ultraviolet absorption of various lignins and related substances. II. Lignin determination in sulfite pulping liquors. *Pulp Paper Mag. Can.* 6 (5), 131-134.
- Karklins, V.** (1981). IR spectra of wood and its main components. XVIII. IR spectra of lignosulfonic acids from coniferous and deciduous varieties of timber *Khimiya Prirodnikh Soedinenii.*, 6, 774-779.
- Kevers, C.; Soterias, G.; Baccou, J.C.; Gaspar, T.** (1990). Lignosulfonates: novel promoting additives for plant tissue cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant*, 35(5): 413-416.

- Khristeva, L.** (1949). Nature of effect of humic acids on the plant. Dokl. Vses. Akad. Skh. Nauk im. V. I. Lenina. Vol.7.
- Kringstand, K. P. Lundstrm, K.** (1984). Spent liquor from pulp bleaching. *Environ. Sci. Technol.* 18, 8, 236.
- La Malfa, G., Leonardi, C.** 2001. Crop practices and techniques: trends and needs. *Acta Hort.* 559, 31-42.
- Lahav, N. y Hochberg, M.** (1975). Kinetics of fixation of iron and zinc applied as FeEDTA, FeEDDHA and ZnEDTA in the Soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **39**, 55-58.
- Lantero, O. J. y Shetty, J. K.** (2005) Process for the preparation of gluconic acid and gluconic acid produced thereby. U. S. Patent 6942997.
- Lindsay, W. L.** (1991). Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. En: *Iron nutrition in soils and plants*, pp. 7-14. J. Abadía (ed.). Kluwer academia Publishers, The Netherlands.
- Lindsay, W.L.** Zinc in Soils and Plant Nutrition. 1972. *Adv. Agron.* 24, 147- 186.
- Lindsay, W. L.** 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley and sons Eds. New York.
- Lindsay W L y Schwab A P.** 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5(4-7):821-840.
- Linehan, D. J.** (1977). A comparison of the polycarboxylic acids extracted by water from an agricultural topsoil with those extracted by alkali. *J. Soil Sci.* 28: 369-378.
- Liñán, C.** (1990). Correctores de carencias. pp.:347-387. En: *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Agrotecnias, S.L., Madrid, España.
- Liñán, C.** (1995). Correctores de carencias. pp.:464-538. En: *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Agrotecnias, S.L., Madrid, España.
- Liñán, C.** (2000). Correctores de carencias. pp.:503-596 En: *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Agrotecnias, S.L., Madrid, España.

- Liñán, C.** (2003). Correctores de carencias. pp.:523-617. En: Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Agrotecnias, S.L., Madrid, España.
- Liñán, C.** (2007). Correctores de carencias. pp.:590-687. En: Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Agrotecnias, S.L., Madrid, España.
- López-Valdivia, L. M.; Fernández, M. D.; Obrador, A.; Álvarez, J. M.** 2002. Zn transformations in acidic soil and zinc efficiency on maize by adding six organic zinc complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6): 1455-1460.
- Lucena, J. J.; Gárate, A. y Carperna, O.** 1988. Theoretical and practical studies on chelate-Ca-pH system in solution. *J. Plant Nutr.* 11, 1051-1061.
- Lucena, J.J.; Manzanares, M. y Gárate, A.** (1992). A test to evaluate the efficacy of commercial Fe-Chelates. *J. Plant Nutr.* 15, 1553-1566.
- Lucena, J. J.; Barak, P.; Hernández-Apaolaza L.** (1996). Isocratic ion-pair high performance liquid chromatography method for the determination of various iron (III) chelates. *J. Chromatogr. A*, 727, 253-264.
- Lucena J J.** 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23(11-12): 1591-1606.
- Lucena, J.J.** 2003. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. *J. Plant Nutr.*, 26(10&11), 1969-1984.
- Lucena, J. J.** 2006. Iron fertilizers in correcting iron deficiencies in plants. In: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganism*. Chapter 5. L.L. Barton and J. Abadía (Eds.). Springer-Verlag Academic Publishers. The Netherlands. pp 103-127.
- Lucena, J.J.; Chaney, R. L.** 2006. Synthetic iron chelates as substrates of root ferric chelate reductase in green stressed cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 29: 423-439
- Lucena, J.J.; Chaney, R. L.** 2007. Response of cucumber plants to low doses of different synthetic iron chelates in hydroponics. *J. Plant Nutr.* 30: (In press)

- Lulakis, M. D. y Petsas, S. I.** (1995). Effect of Humic substances from vine-canes mature compost on tomato seedling growth. *Bioresour. Technol.* 54 (2):179-182.
- Marschner, H.** In *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Ed. Academic Press. New York. 1995.
- Martell, A. E.; Smith, R. M.** (1976-1989). *Critical stability constants*, 6 vol. Plenum Press, New York.
- Meier, J.; Fyles, J. W.; Mackenzie, A. F.; O'Halloran, I. P.** 1993. Effects of lignosulfonats-fertilizer applications on soil respiration and nitrogen dynamics. *Canadian Journal of Soil Science*, 73(2): 233-242.
- Mench, M; Martin, E.** (1991). Mobilization of cadmium and other metals from two soils by roots exudates of *Zea mays* L, *Nicotiana tabacum* L and *Nicotiana rustica* L. *Plant Soil* 132: 187-196.
- Mengel, K., Kirby, E. A., Kosegarten, H., Appel, T.** 2001. Iron. In: *Principles of Plant Nutrition*; Kluwer Academic, Dordrecht, pp 553-571.
- Mengel, K. y Kirkby, E.** 1982. *Pinciples of Plant Nutrition*. Internacional Poash Institute. Bern, Switzerland.
- Métodos Oficiales de Análisis.** 1994. *Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, Ed. Madrid, Spain,; Vol. 3. pp 39-84
- Miller, G.; Pushnik, J. y Welkei, G.** (1984). Iron chlorosis, a world wide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *J. Plant. Nutr.*, 7, 1-22.
- Mitschker, A.; Moritz, R. J.; Nawrocki, A.** (2004). Chelated plant micronutrients (Bayer Chemicals A.-G., Germany; Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Consultingowe Adob). *Eur. Pat. Appl.* 7. pp.CODEN: EPXXDW EP 1411037 A1 20040421.
- Millet, M; Wortham, H.; Sanusi, A; Mirabel, P.** (1997). Low molecular weight organic acids in fogwter in an urban area: Strasbourg (France). *Sci. Tot. Environ.* 206: 57-65.

- Neema, C., Lahlou, J. P., Expert, D.** 1993. Iron deficiency induced by chrysobactin in Saintpaulia leaves inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.*, 102(3), 967-973.
- Novack, B., Vanbriesen, J. M.** (2005). Biodegradation of chelating agents: EDTA, DTPA, PDTA, NTA, and EDDS. In: *Biogeochemistry of chelating agents*. ACS Symposium Series 910. American Chemical Society, Washington, DC, pp 150-170.
- Norvell W. A.** 1991. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. In: *Micronutrients in Agriculture*. Mortvedt, Cox, Shuman y Welch eds.: SSSA Book Series nº 4: Madison, WI, USA. pp.: 187-227.
- Papadopoulos, P., Rowell, D.L.** 1989. The reactions of copper and zinc with calcium carbonate surfaces. *J. Soil Sci.* 40, 39-48.
- Parker D. R.; Chaney, R. L. Norvell, W. A.** (1995). Chemical equilibria models: Applications to plant research. En: *Chemical equilibria and reaction models*, Special Publications 42. Eds. R. H. Loeppert, A. P. Schwab and S. Goldberg. Pp 163-200. SSSA-ASA, Madison, W.I.
- Pecsok, R L.; Sandera, J.** 1955. Gluconate complexes. II. The ferric-gluconate system. *J. Ame. Chem. Soc.* 77: 1489-94.
- Pérez-Sanz, A.; Lucena, J. J.; Graham, M. C.** (2006). Characterization of Fe-humic complexes in an Fe-enriched biosolid by-products of water treatment. *Chemosphere*. 65(11), 2045-2053.
- Pestana, M; Varennes, A; Faria, E. A.** 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Food, Agr. Environ.*, 1(1), 46-51.
- Petree, H. E.; Myatt, H. L.; Jelenevsky, A. M.** 1978. Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids.. US. Patent 4, 130, 582.
- Pfeifer, R.; Karol, R.; Korpi, J.; Burgoyne, R. y McCourt, D.** (1983). Practical application of HPLC to amino acid analysis. *American Laboratory.*, 15, 78-87.

- Posner, A. M.** (1964). Titration curves of humic acid, *Trans. Int. Congr. Soil Sci.*, Bucarest, Rumanía. Academia de la República socialista de Rumanía, Bucarest, 11: 161-164.
- Rahman, M., Punja, Z. K.** 2003 Growth of *Cylindrocarpon destructans* and interactions with ginseng roots to cause root rot. *Can. J. Plant Pathol.*, 25, 112.
- Raese, J. T.; Staiff, D. C.; Donald, D. C.** (1988). Chlorosis of "Anjou" pear trees reduce with foliar sprays of iron compounds. *Journal of Plant Nutrition*. 11 (6-11).
- Romheld, V. y Marschner, H.** 1986. Mobilization of Iron in the rizosphere of different plant species. En: *Advance in Plany Nutrition*. Vol 2. Tinker, B. y Lauchli, A. Eds.; Praeger Scientific, New York.
- Rosolem, C. A. Sacramento, L. V. S.** 2001. Efficiency of foliar Zn fertilizers in coffee and citrus, In W.J. Horst et al. (eds). *Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems*. pp704 - 705, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sadi, B. M.; Wrobel, K.; Kannamkumarath, S.; Castillo, J. R. y Caruso, J. A.** 2002. SEC-ICP-MS studies for elements binding to different molecular weight fractions of humic substances in compost extract obtained from urban solid waste. *J. Environ. Monit.*, 4, 1010-1016.
- Sánchez-Andréu, J.; Jordá, J; Juárez, M.** 1991. Reactions of FeEDTA and FeEDDHA applied to a calcareous soils. En: *Iron Nutrition and interactions in plants*; Chen, Y.; Hadar, Y.; Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrech, The Netherlands; pp 57-62.
- Sanz, M.; Caverro, J. y Abadía, J.** (1992). Iron clorosis in the Ebro river basin, Spain. *J. Plant Nutr.*, 15(10), 1971-1981.
- Schwertmann, U. y Taylor, R. M.** (1989). Iron oxides. *Minerals in soil environments*. Eds. J. B. Dixon and S.B. Weed. *Soil Sci. Soc. Am. Book Series:1*, 379-438.
- Schlegel, T. K., Schoenherr, J., Schreiber, L.** (2006). Rates of Foliar Penetration of Chelated Fe(III): Role of Light, Stomata, Species, and Leaf Age. *J. Agric. Food Chem.* 54(18), 6809-6813.

9. Bibliografía

- Schnitzer, M.** 1969. Reactions between fulvic acid a soil humic compound and inorganic soil constituents. *Soil Science of America. Proceedings* 33 (1): 75-&.
- Schnitzer, M., Kahn, S. U.** (1972). *Humic substance in the environment*, Marcel Dekker, New York, USA.
- Schnitzer, M. (1977).** Recent findings on the characterization of humic susbstances extracted from soils from widely differing climatic zones. En: *Proceedings of Symposium of soil organic mater studies, Braunschweig, Germany*, pp. 117-131.
- Sladky, Z.** (1959). The application of extracted humus substances to overground parts of plants. *Biol. Plant.* 1: 199-204.
- Srivastava, P.C.; Gupta U.C.** (1996) *Trace Elements in Crop Production*. Science Publishers, Lebanon, NH. pp 356.
- Stevenson, F. J.; Goh, K. M.** (1971). Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 35, 471-483.
- Stevenson, F. J.;** 1986. *Cycles of soil: carbon, Nitrogen, Phosphorou, Sulfur, Micronutrients*, Wiley, New York.
- Stevenson, F. J.;** 1991. Organic matter-micronutrient reaction in soil. En *Micronutrients in Agriculture* pp 145-186. J. J. Mortvedt, F. R. Fox, L. M. Shuman y R. M. Welch. (Eds). American Society of Agronomy Science. Madison.
- Stevenson, F. J.** 1994. *Humus chemistry: Genesis, composition, reaction*. John Wiley & Sons, New Yorj, USA.
- Stewart, I.; Leonard, C. D.** 1954. Chelated metals for growing plants. En: *Mineral Nutrition of Fruit Crops*; Childers, N. F., Ed.: Horticultural Publishing: New Brunswick, NJ; pp 775-809.
- Swift, R. S.; Posner, A. M.;** (1971). Gel chromatography of humic acid. *J. Soil Sci.* 22:237-249.

- Tan, K. H.** (1993). Colloidal chemistry of organic soil constituents. En: Principles in soil chemistry. Eds. M. Dekker. New York.
- Takagi, S.** 1976. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat-and rice-root washing. *Soil Sci. Plant Nutr.* 22: 423-433.
- Theng, B. K. G.** (1979). Formation and properties of clay-polymer complexes, Hilger, London, U. K.
- Thind, S. S.; Takkar, P. N.; Bansal, R. L.** 1990. Chemical pools of zinc and the critical deficiency level for the predicting response of corn to zinc application in alluvium derived alkaline soils. *Acta Agron. Hung.*, 39, 219-226.
- Tong, Y.A.; Fan, F.; Korcak, R.F.; Chaney, R.L. y Faust, M.** (1986). Effect of micronutrients, phosphorus and chelator to iron ratio on growth, chlorosis and nutrition of apple seedlings. *J. Plant Nutr.* 9(1):23-41.
- Uygur, V., Rimmer D.L.** 2000. Reactions of zinc with iron coated calcite surfaces at alkaline pH. *Eur. J. Soil Sci.* 51, 511-516.
- Van Dijk, H.** 1971. Cation binding of humic acids. *Geoderma*, 5(1), 53-67.
- Vaughan, D.** (1967). The stimulation of invertase development in aseptic storage tissues slices by humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 1:15-28.
- Villén, M., García-Arsuaga, A., Lucena, J. J.** 2007. Potential Use of Biodegradable Chelate N-(1,2-Dicarboxyethyl)-D,L-aspartic Acid/Fe³⁺ as an Fe Fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* 55(2), 402-407
- Xie, R. J.; Meier, J.; Fyles, J. W.; Mackenzie, A. F.; O'Halloran, I. P.; Ruseel, E.** 1993. Effects of calcium lignosulfonates on urea hydrolysis and nitrification in soil. *Canadian Soil Science.* 156(4): 278-285.
- Yao, H. L.; Yeh, H. H.** 1996. Fumarate, maleate, and succinate adsorption on hydrous δ -Al₂O₃. 1. Comparison of the adsorption maxima and their significance. *Langmuir* 12: 2981-2988.

- Yunta, F.; García-Marco, S. y Lucena, J. J.** 2003a. Theoretical speciation of ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid (o-p-EDDHA) in agronomic conditions. *J. Agric Food Chem.* 51(8): 5391-5399.
- Yunta, F.; García-Marco, S. y Lucena, J. J. Gómez-Gallego, M.; Alcázar, R. y Sierra, M. A.** 2003b. Chelating agents related to ethylenediamine bis(2-hydroxyphenyl) acetic acid: synthesis, characterization and equilibrium studies of the free ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} chalets. *Inorg. Chem.* 42(17): 5412-5421.
- Yunta, F.; García-Marco, S. and Lucena, J. J.** 2003c. Speciation of Ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) in Agronomic Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5391-5399.
- Yunta, F.; Sierra, M.A.; Gómez-Gallego, M.; Alcázar, R.; García-Marco, S. y Lucena, J.J.** 2003. Methodology to screen new iron chelates. Prediction of their behaviour in nutrient solution and soil conditions. *J. Plant Nutr.* 26(10&11): 1995-1968.
- Wallace, A.; Ashcroft, R.T.** 1956. Ammonium Lignin Sulfonate as a Chelating Agent for Supplying Soluble Iron to plants. *Soil Science.*82: 233-236.

ANEXO 1

Evaluation of micronutrient and Ca complexes as fertilizers in soil, fertirrigation and foliar applications

Table S1. Chemical and physical characteristics of the soils used in the interaction assays

	Sudanell	Carlet
Sand ¹	46	65
Silt	28	12
Clay	26	23
Texture	Sandy clay loam	Sandy loam
pH (H ₂ O)	7.82	7.69
pH (KCl)	7.23	7.15
E.C extract 1:5 (dS·m ⁻¹)	0.188	0.235
O.M. Oxidizable (g ·Kg ⁻¹)	24.0	8.0
N Kjeldahl (g ·Kg ⁻¹)	1.40	0.79
C/N	9.9	10.5
CaCO ₃ Total (g ·Kg ⁻¹)	179	150
Active lime (g ·Kg ⁻¹)	52	40
<i>Macronutrients (Soltampour, cmol_c·Kg⁻¹)</i>		
Ca	1.55	1.76
Mg	0.66	1.72
K	1.02	1.26
Na	0.047	0.150
<i>Micronutrient (Soltampour, mg·Kg⁻¹)</i>		
Fe	27.0	14.3
Mn	5.4	13.0
Cu	47.1	1.46
Zn	4.3	1.08

Anexo 1

Materials used in interaction experiments were:

- ✓ Ca-Montmorillonite standard (STx-1) from Gonzales County (Texas, USA), provided by "Clay Minerals Society Source", Clay Minerals Repository, Department of Geology, University of Missouri (USA).
- ✓ Illite standard (Imt-2) from Silver Hill, Montana (USA) provided by "Clay Minerals Society Source", Clay Minerals Repository, Department of Geology, University of Missouri (USA).
- ✓ Commercial black peat was provided by Tolsa S.A. (Buyos, Lugo, Spain). Chemical characteristics (MAPA, 1994): pH (H₂O) = 4.0, oxidizable organic matter (g·kg⁻¹) = 854; total organic matter (dry ashed) (g·kg⁻¹) = 995, carbon in humic acids (g·kg⁻¹) = 302, carbon in fulvic acids (g·kg⁻¹) = 183. Nitrogen (Kjeldahl) (g·kg⁻¹) = 14, C/N = 35.4, CEC (cmol_c·kg⁻¹) = 150. Fe and Mn extracted by the Lindsay and Norvell, 1978 method (1) were 295 mg·L⁻¹ and 8.2 mg·L⁻¹ respectively.
- ✓ Synthetic Ferric Hydroxide prepared in the laboratory following the procedure of Sims et al., 1968 (2). A solution of FeCl₃·6H₂O (Probus) is treated with NaOH (Fe³⁺/OH⁻ = 1/3) at room temperature. The precipitate is first washed with distilled water for 24 h and then with ethanol (80%) until the pH is 6.0. The brown precipitate is dried in oven at 65° C for 24 h and then ground in a mortar till a fine powder is obtained. Such material is X Ray identified as a 6 lines ferrhydrite with high specific surface (220 m²·g⁻¹) that allows a high interaction with the chelates.
- ✓ A standard of calcareous soil (SCS) composition was 50% standard Quartz sand, 15% Ca-Montmorillonite, 5% Illite, 2% organic matter, 19% CaCO₃, 1% dolomite and 8% oxides and phosphates (7.0% Fe(OH)₃, 0.5% Al(OH)₃, 0.1% MnO₂, 0.004% Cu(OH)₂, 0.006 % Zn(OH)₂ and 0.39% CaHPO₄. Standard Quartz sand (diameter 1-3 mm), was provided by the Instituto Eduardo Torroja, Madrid and acid washed. Ca-Montmorillonite and Illite was obtained from the Clay Mineral Society Source. The organic matter was the acid peal already described. Al, Cu and Zn hydroxides were prepared in the laboratory from AlK(SO₄)₂ (Probus), CuSO₄ and ZnSO₄ and

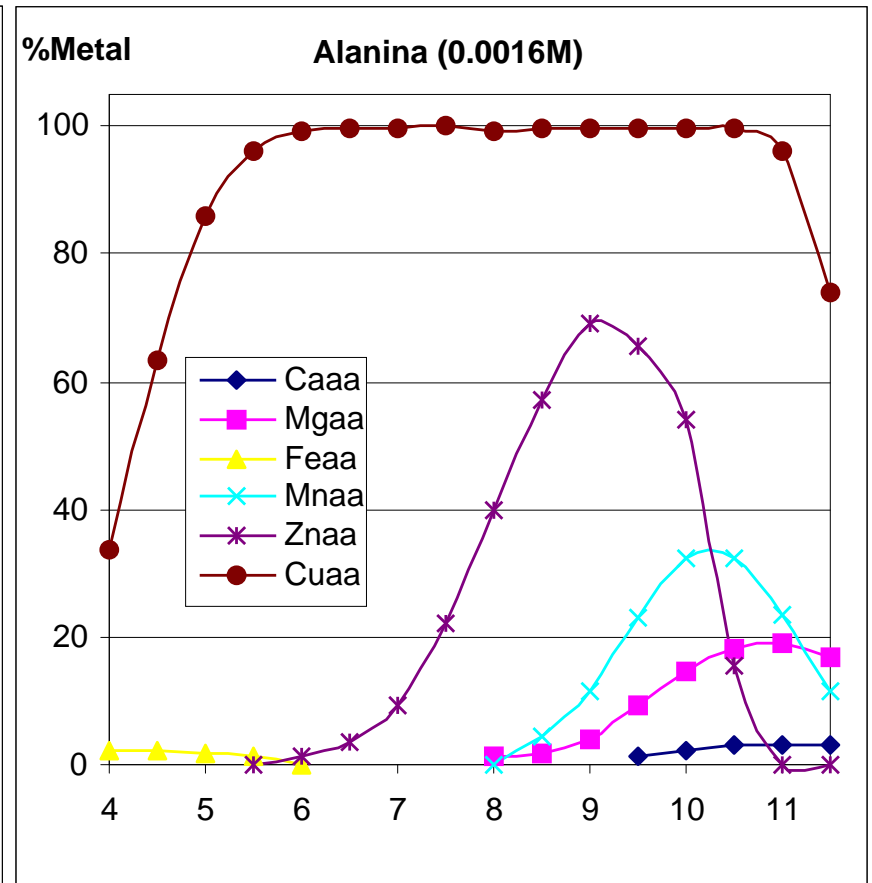
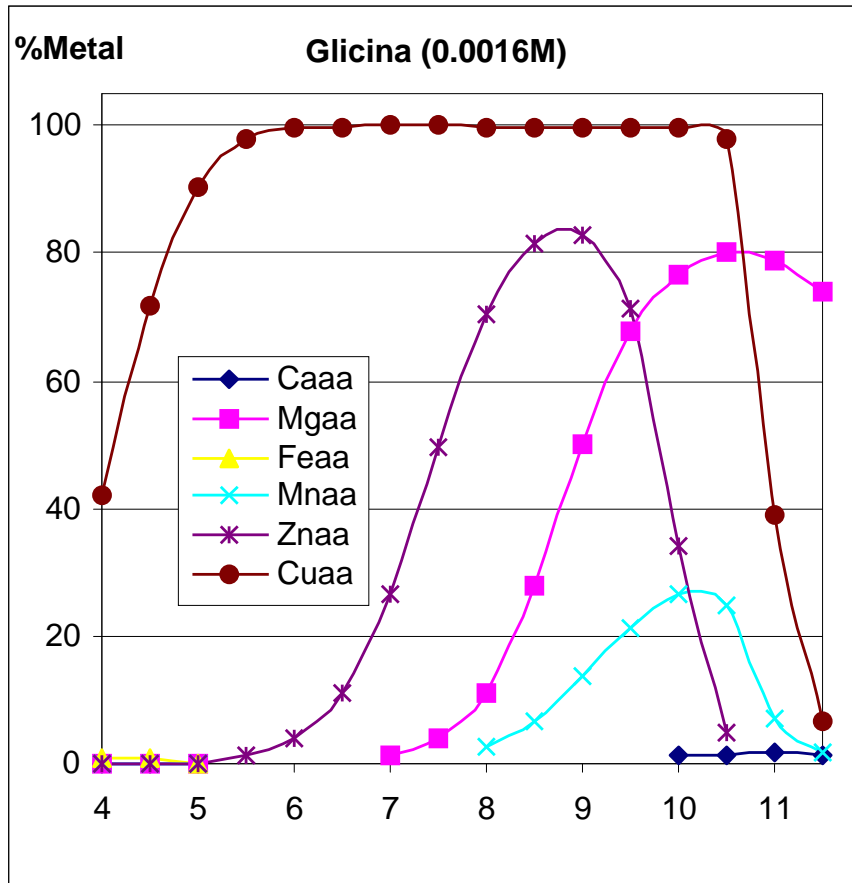
following the same methods as for the Fe(III) oxide. MnO₂ was prepared from reduction of KmnO₄ (Panreac) with ethanol.

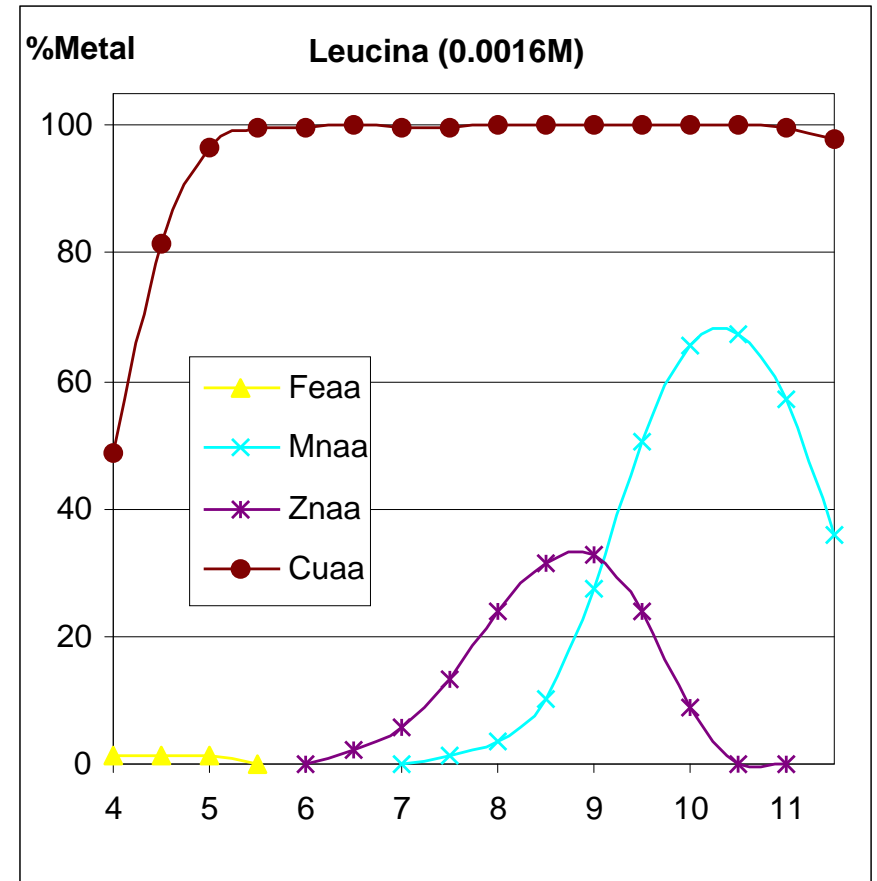
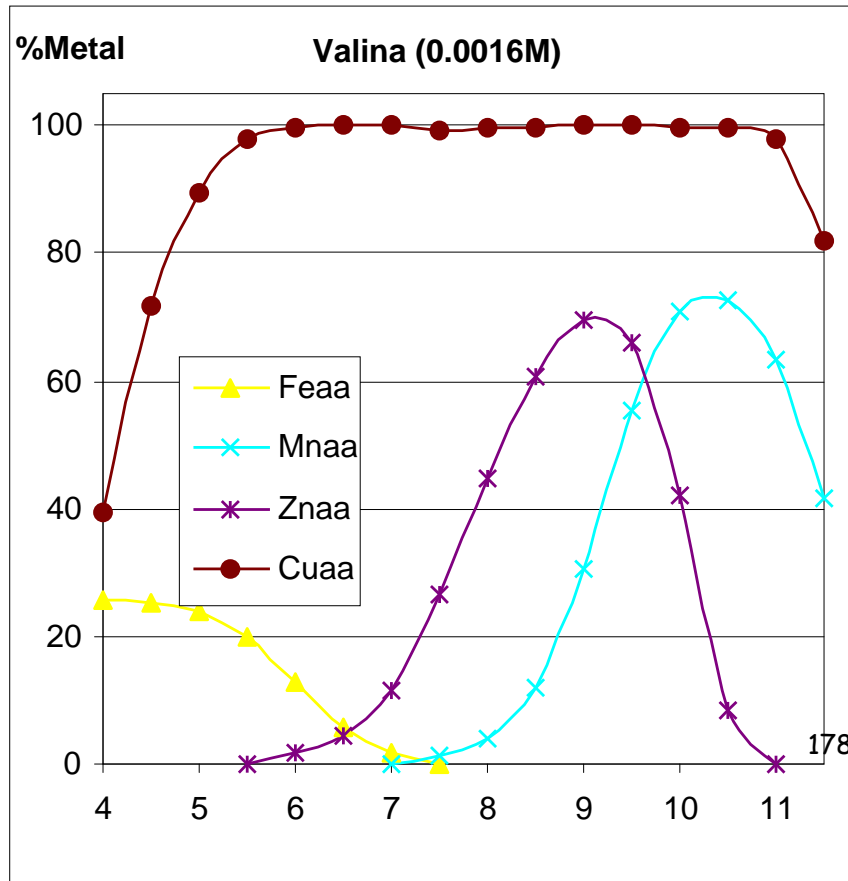
Modelization of complexes stability between aminoacids and metals

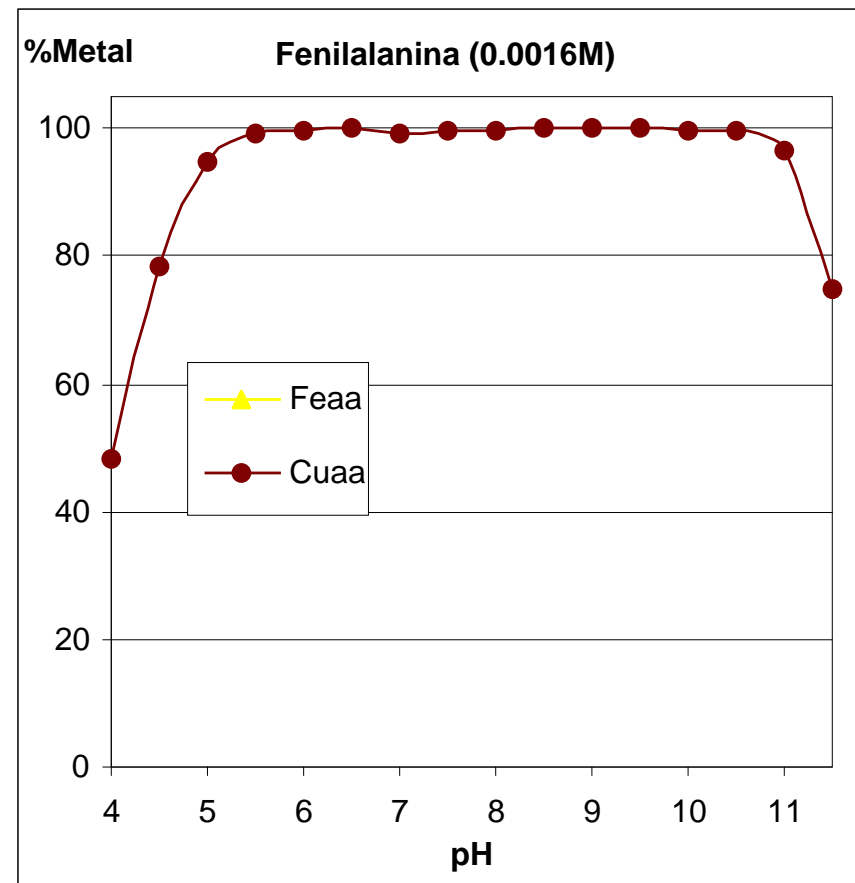
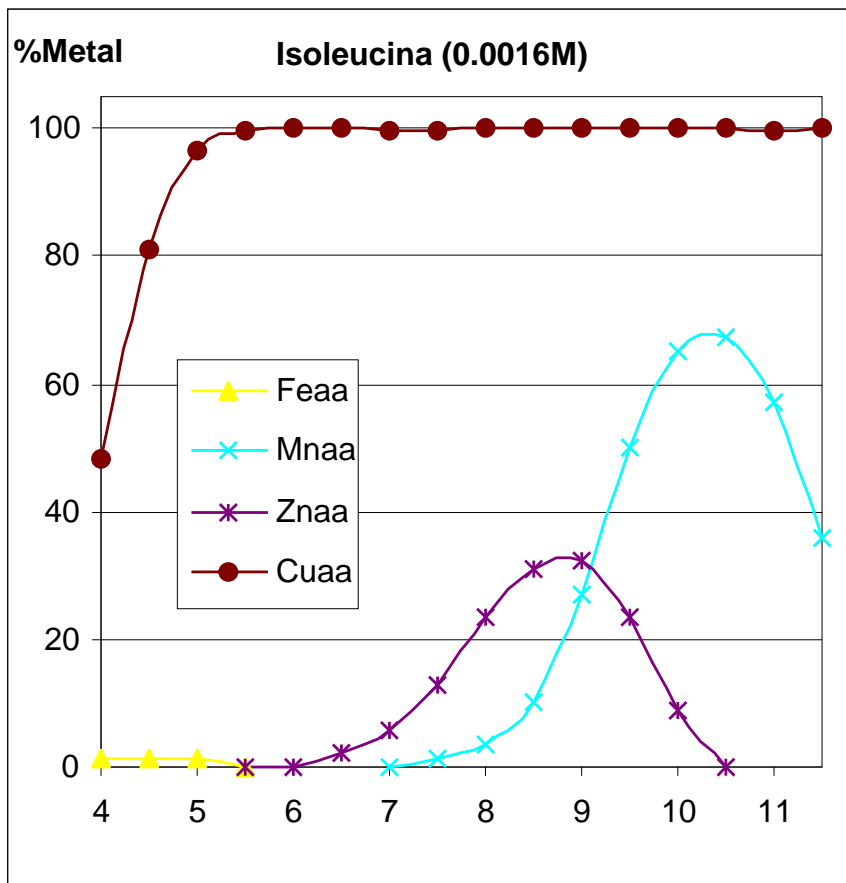
Different bibliographic sources (Kotrly, S. and Sucha, L., 1985) and data bases (MinteqA2 and Gchem) were used to the determination of the theoretical stability of complexes formed between aminoacids and metals.

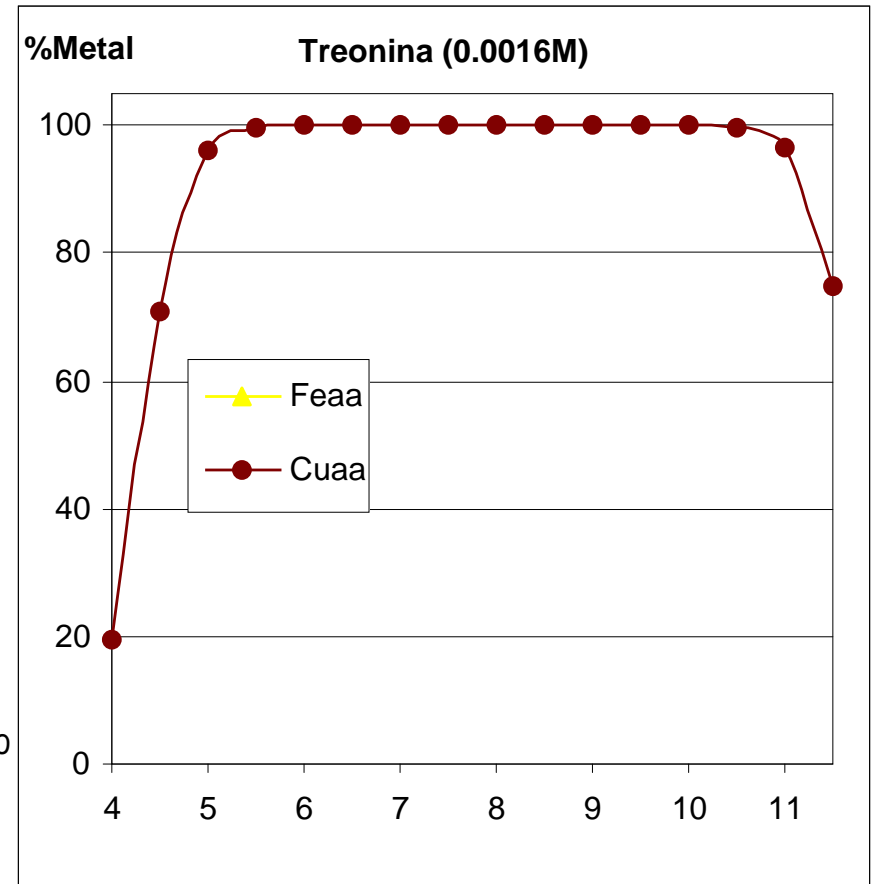
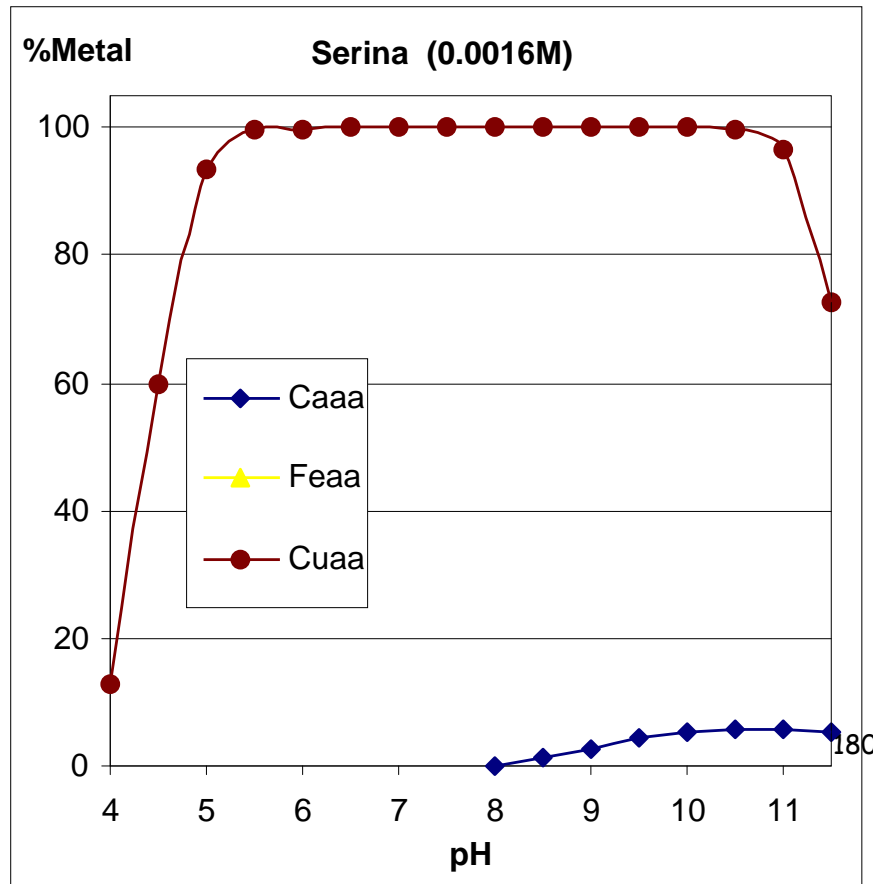
To create a new data base, constants found in the bibliography were included in the MinteqA2 data base. For constants determined at a fixed ionic strength, they are recalculated at $\mu = 0$.

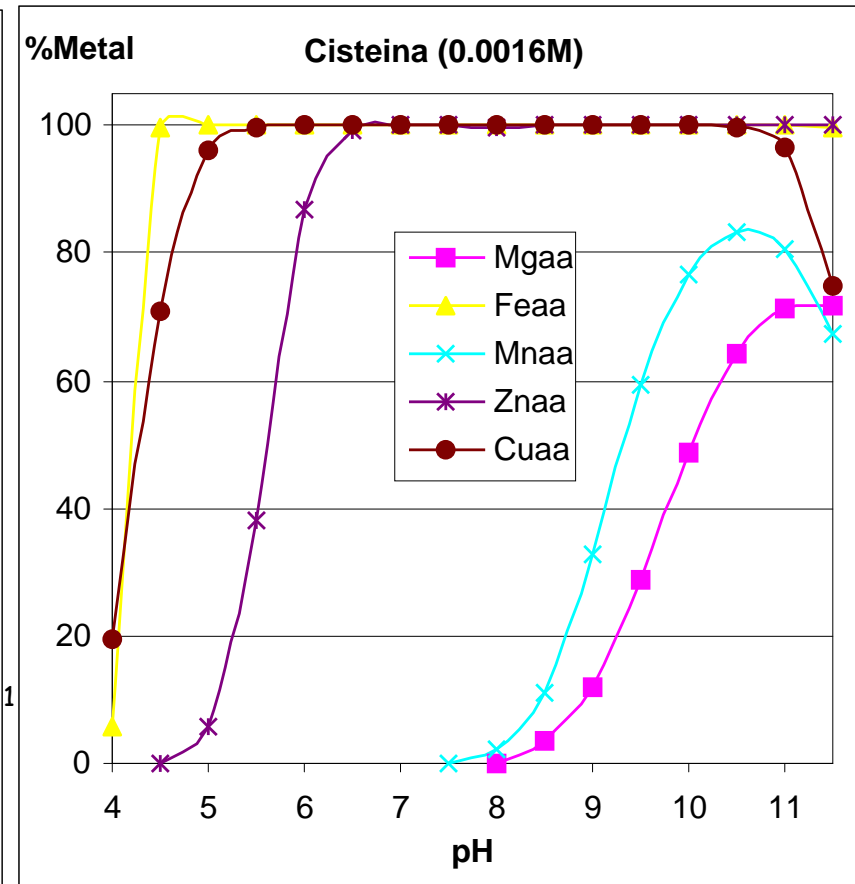
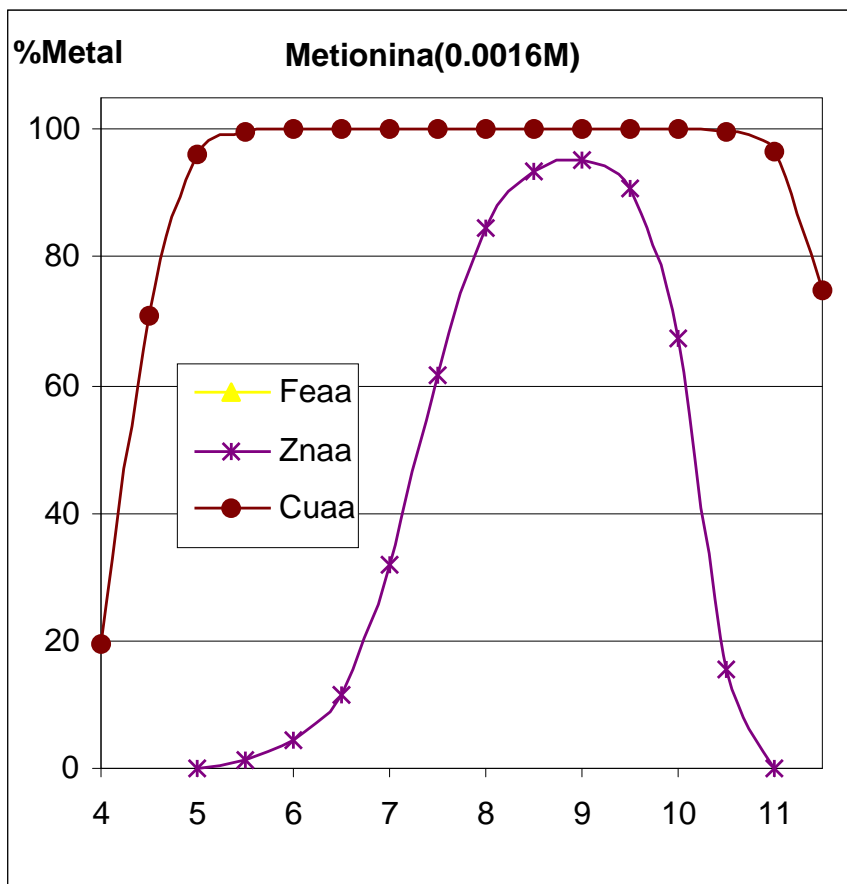
Aminoacid concentration is $1.6 \cdot 10^{-3}$ M (similar to Ca concentration) very high with respect micronutrient concentrations but permits evaluate the behaviour of micronutrients without interaction between them. pH are adjusted from 4 to 11.5. At high pH, oxides and hydroxides precipitation have not been allowed. The percentages of the distribution of each metal complexed only by the aminoacids at different pHs are represented in the following figures.

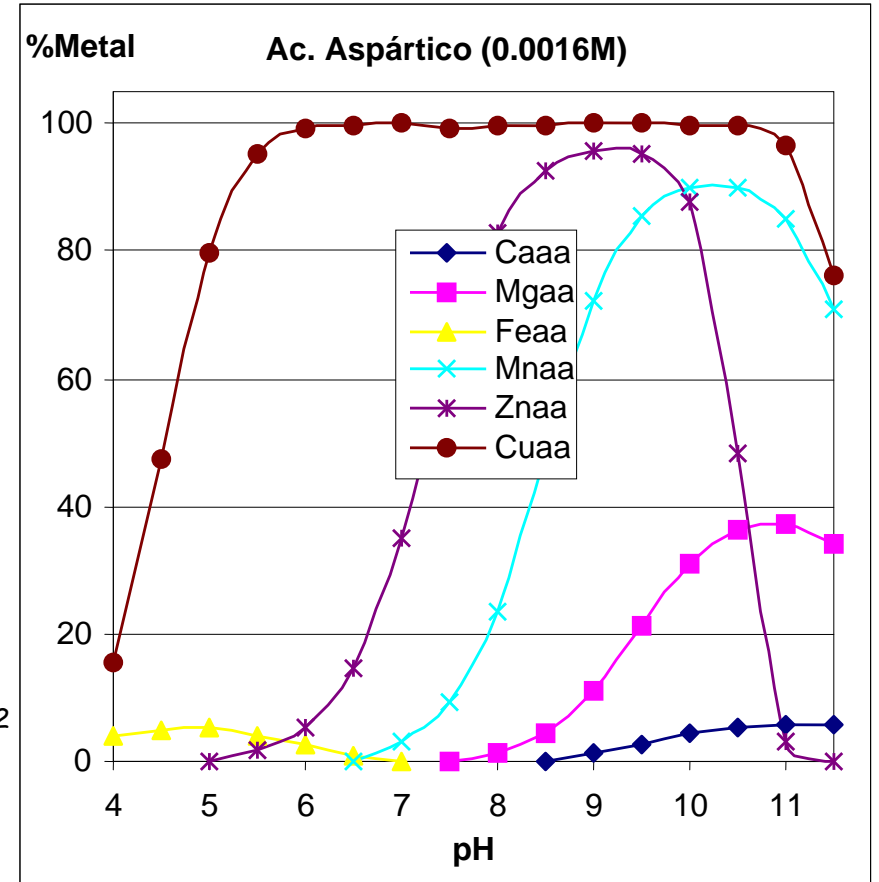
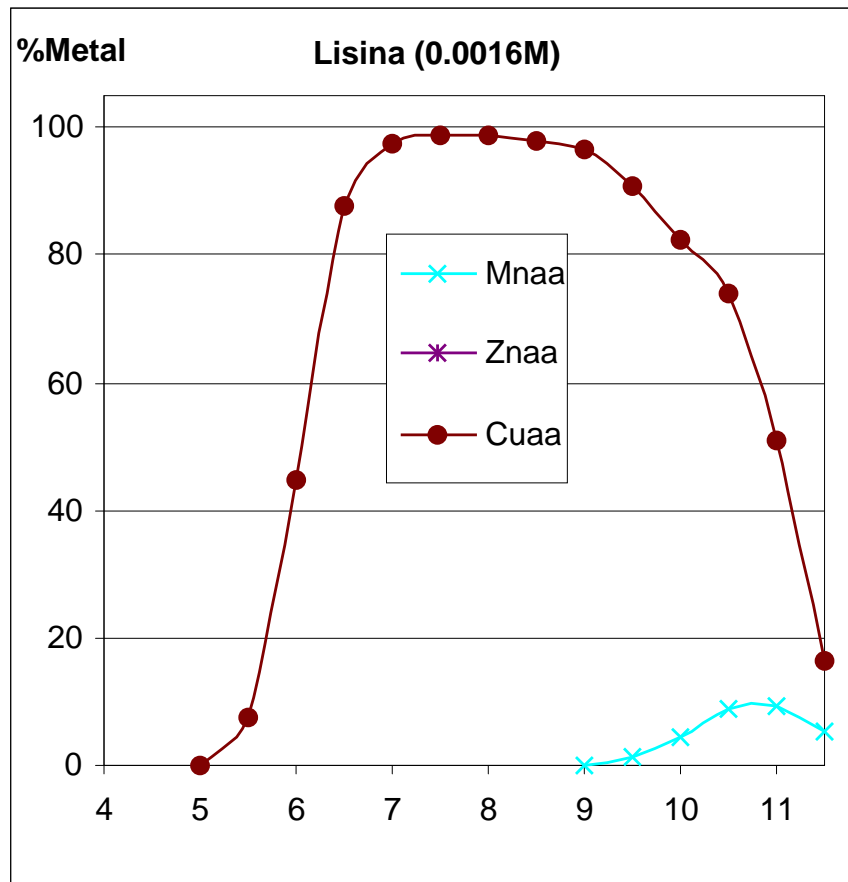


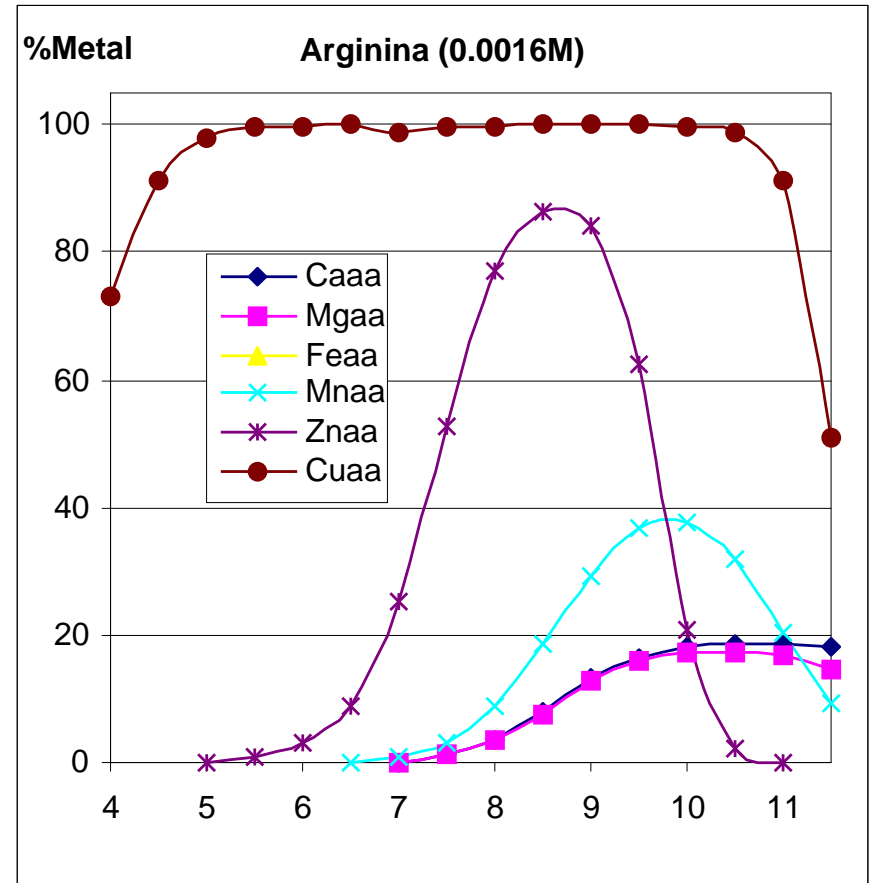
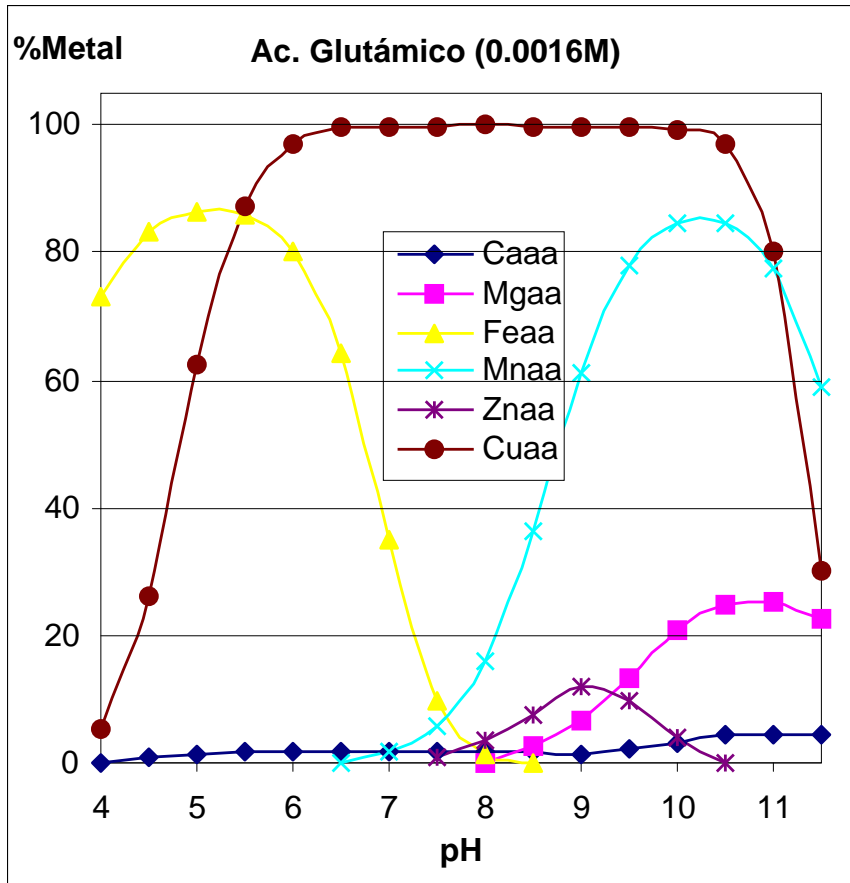


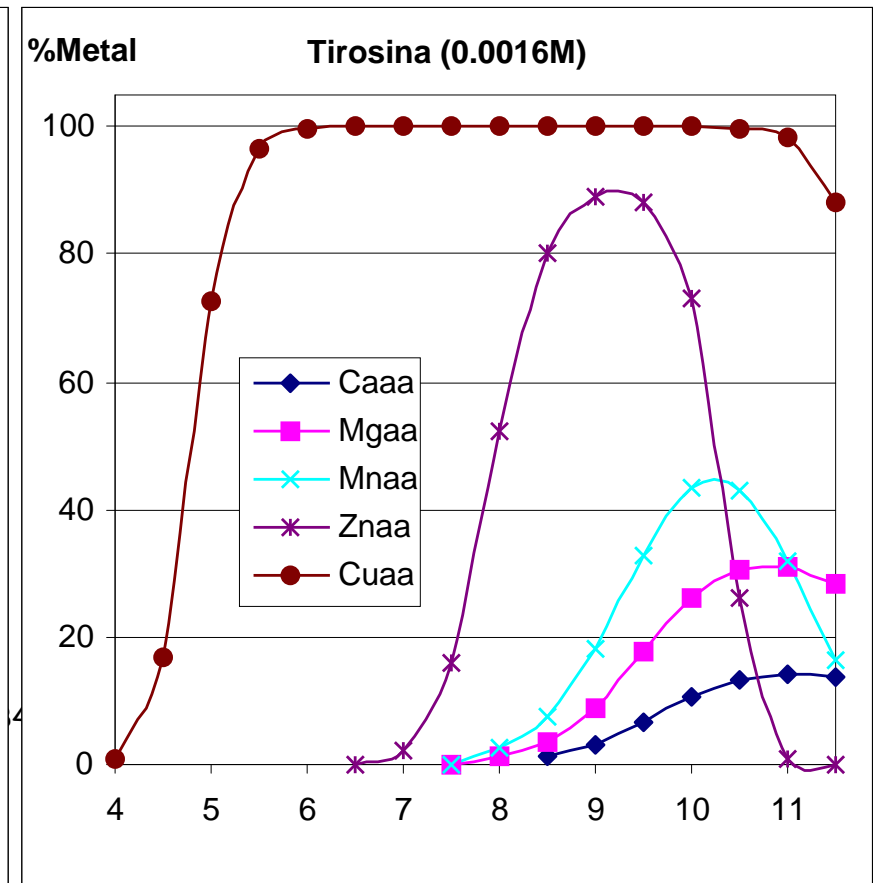
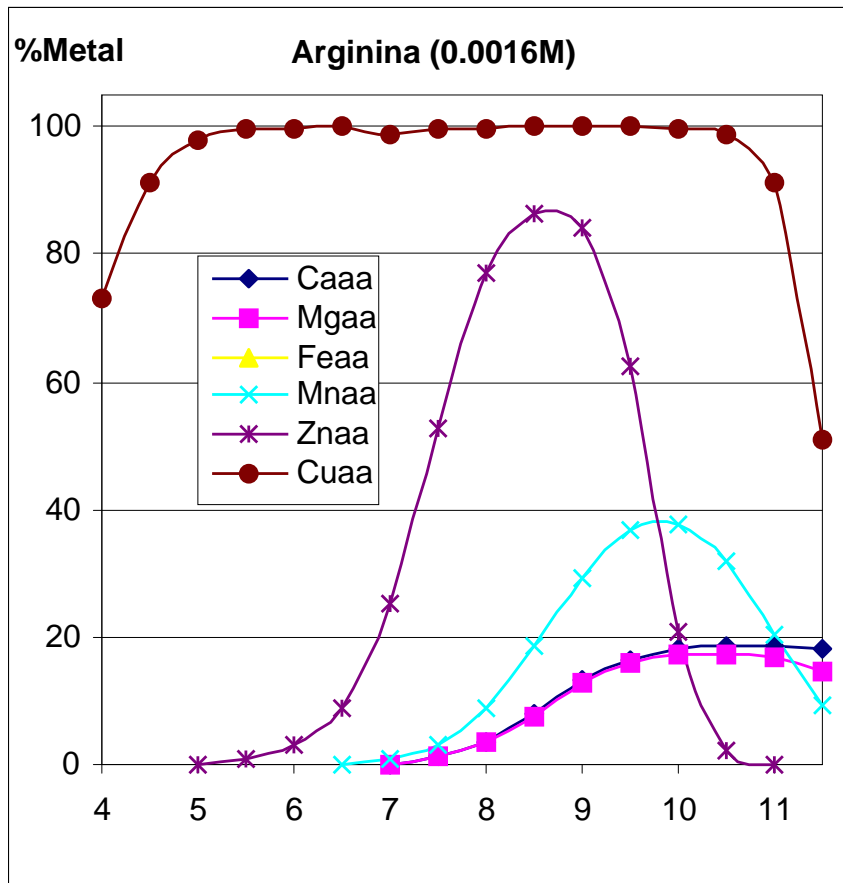


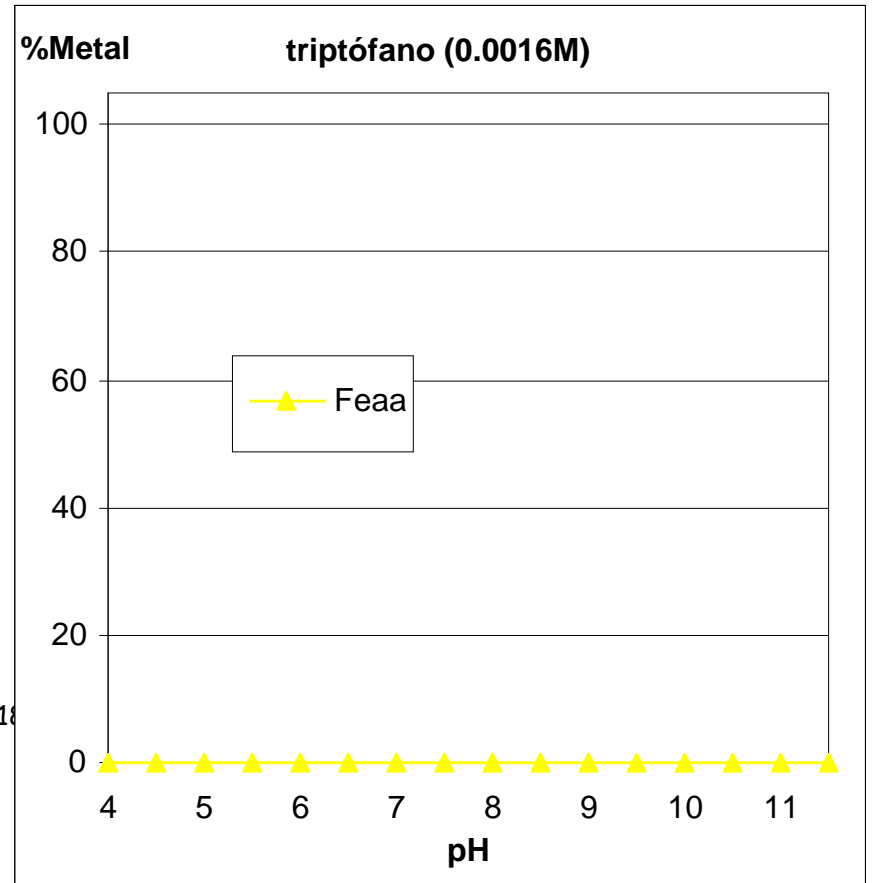
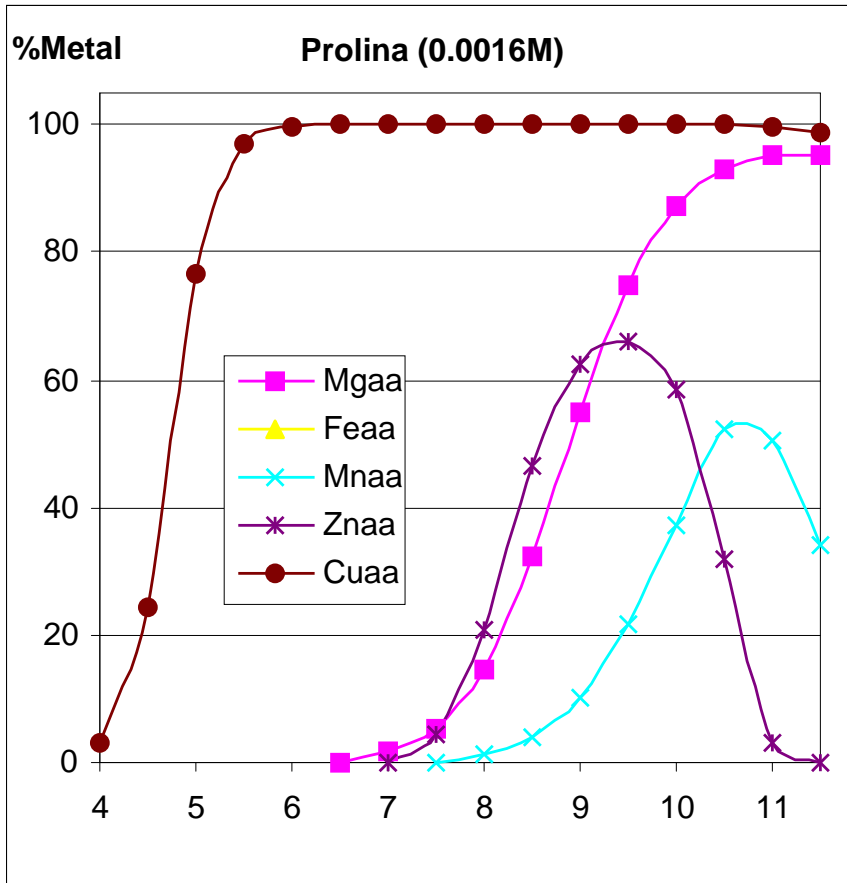


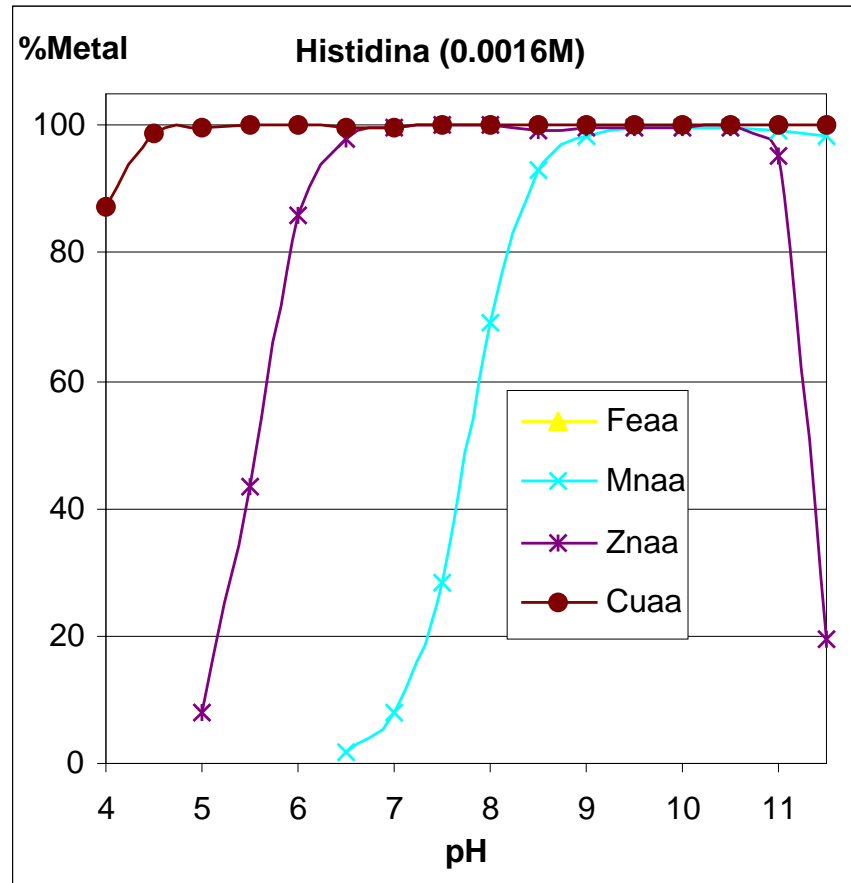






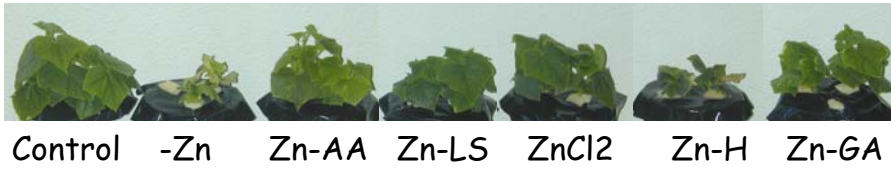






Anexo 1

Plate S1. Visual aspect of cucumber plants treated with Zn complexes 14 days after the beginning of the Zn treatments.



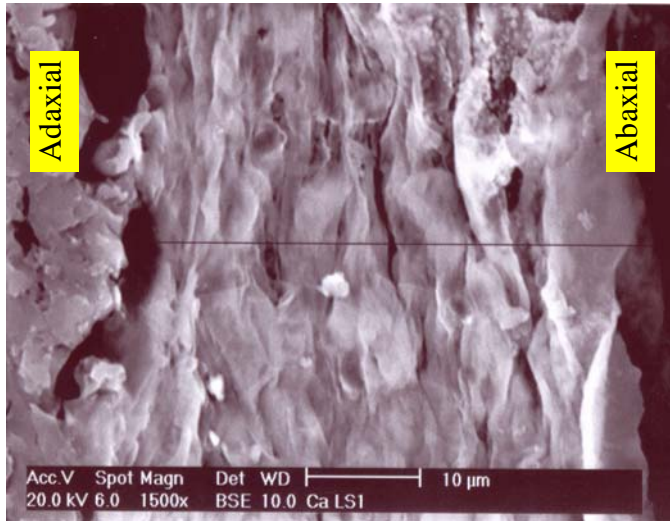


Plate S2. Cross section of the leaf treated with CaLS1. Scanning electron microscopy view.

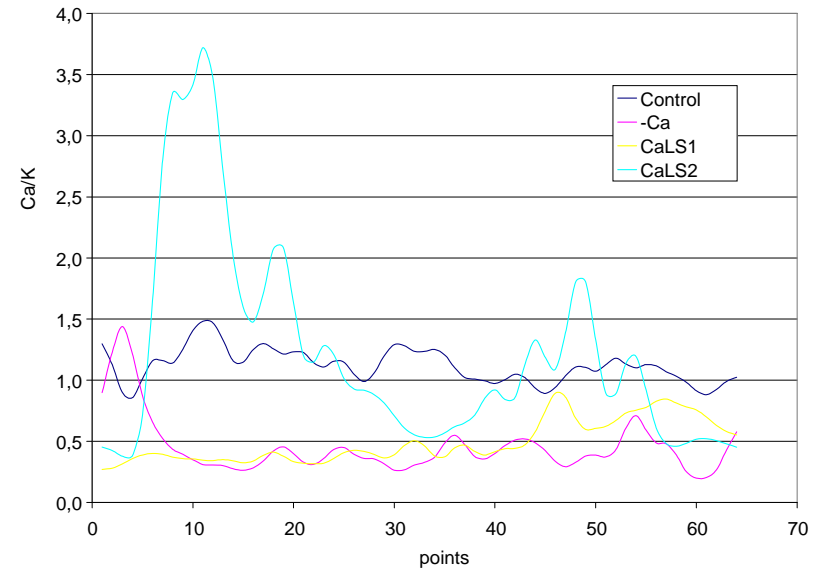


Figure S2. Ca/K ratio for the cross section of leaves treated with Ca-lignosulfonates, Control and without Ca.

Anexo 1

ANEXO 2

Potential use of biodegradable chelate n-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid (IDHA/Fe³⁺) as Fe fertiliser

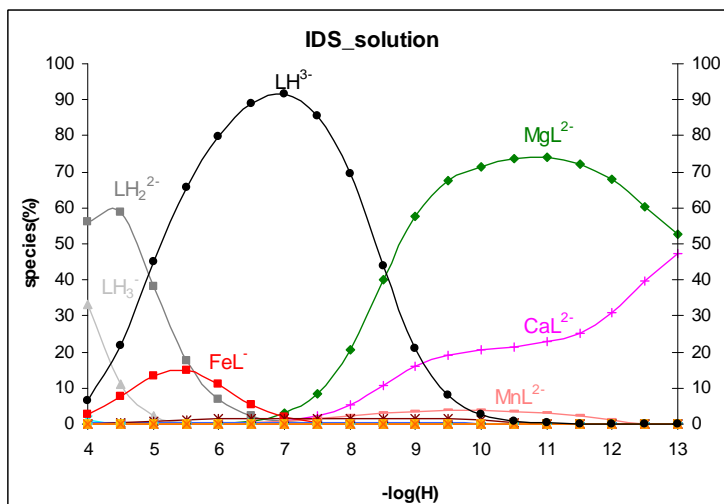


Figure 1. Species distribution for nutrient solution. No Fe precipitation

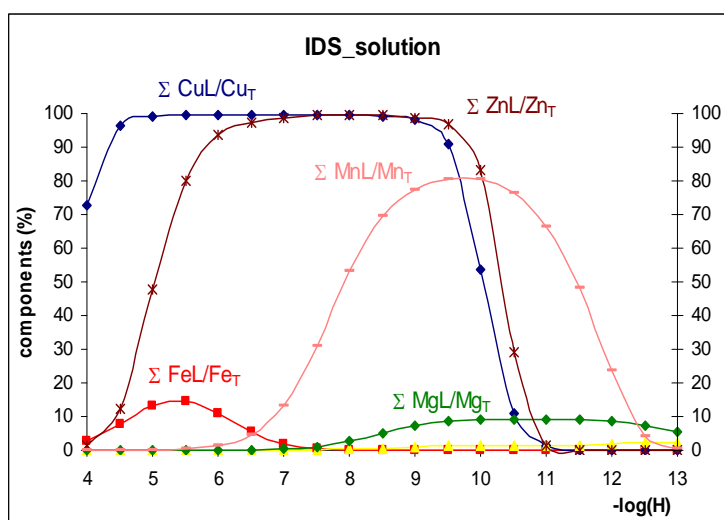


Figure 2. Element Species distribution (% respect the total element) for nutrient solution. No Fe precipitation.

ANEXO 3

IDHA chelates as micronutrient fertilizer in fertirrigation

6. Efficiency of chelate IDHA

Table S1. Effect of the chelate treatments in the SPAD index in the rockwool tomato experiment. Data are presented as increment of SPAD (Δ SPAD) respect the day of application of the treatments. Different letters in the same column denotes significant differences among the treatments according to analysis of variance ($\alpha = 0.05$).

Treat	Δ SPAD											
	Time after treatments (days)											
	0	8	15	22	29	35	43	50	57	64	70	76
IDHA	0 ns	-0.02 ns	1.94 ns	2.28 ns	2.61 ns	3.65 a	2.86 a	3.41 ns	3.62 a	4.43 a	2.88 a	5.25 a
EDTA	0	-1.76	1.25	0.78	1.23	0.11 b	-0.13 b	1.24	-0.15 b	-0.81 b	-0.25 b	-1.15 b

SPAD																									
Time after treatments (days)																									
	0	7	14	21	27	35	42	49	56	62	68	76	83	91	97	104	110	118	125	131	140	147	153	169	182
Cont	44.8	47.1	46.3	46.4	47.4	46.9	45.9	46.4	46.4	48.4	45.2	48.0	46.1	45.7	47.2	46.5	46.3	46.8	46.2	44.3	42.6	41.4	41.2	37.0	39.0
IDHA	45.1	47.5	47.5	48.0	48.1	47.0	46.9	45.9	46.0	47.2	45.5	47.2	46.4	46.2	47.4	46.5	46.7	48.0	45.7	44.9	43.8	42.2	41.5	35.8	37.8
EDTA	45.0	45.9	47.4	46.7	47.1	46.8	45.9	44.6	44.3	45.2	44.1	47.1	44.8	45.4	44.5	43.7	44.6	43.8	45.8	45.0	40.9	40.2	39.6	36.3	38.4

Table S2. Effect of the chelate treatments in the SPAD index in the tomato on soil mulch experiment.

Duncan's Multiple Range test ($\alpha = 0.05$)

Treatment	Average SPAD
Control	45.18 a
IDHA	45.39 a
EDTA	44.12 b

Plate S1. Green bean experiment: Seedling stage and transplanting



Plate S2. Layout of the tomato on rockwool experiment.



Plate S3. Tomato on soil mulch experiment: chelates application.



Plate S4. Green bean experiment: Visual aspect of the plants after 15 days of treatment.

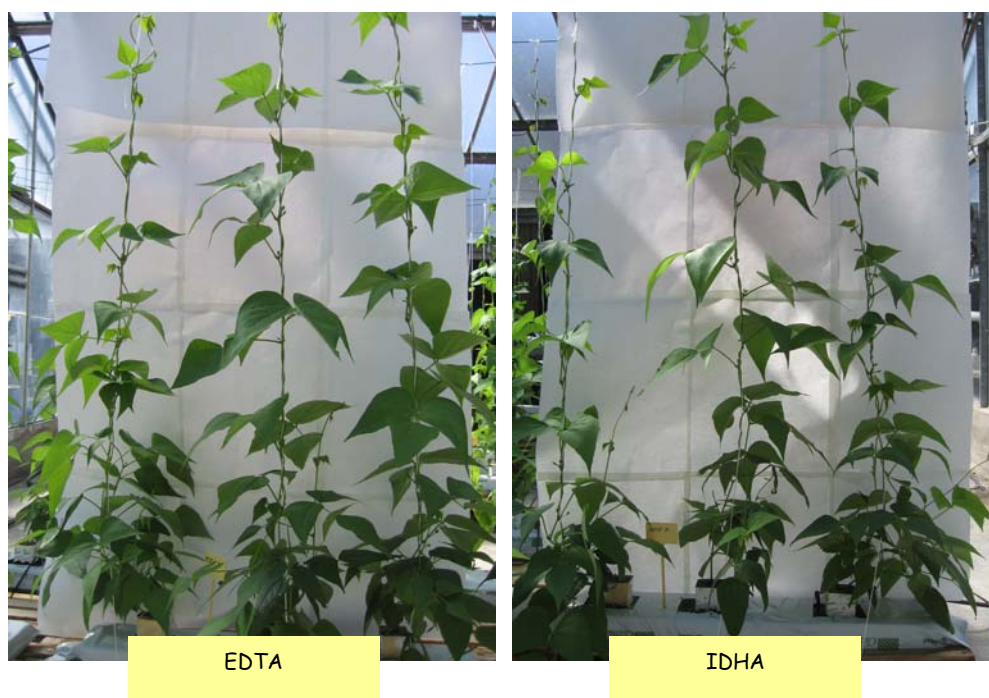


Plate S5. Visual aspect of the green bean plants 39 days after the beginning of the treatments.



Plate S6. Visual aspect of the green bean plants at the end of the experiment.

