

SU APLICACIÓN HA PERMITIDO ESTUDIAR ASPECTOS DE SU CALIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Nuevas metodologías aplicadas a la investigación de quelatos de hierro sintéticos

España es el mayor consumidor de Europa de quelatos de hierro, llegando a consumir las dos terceras partes del mercado. En el año 2007, el número de fertilizantes de hierro a base de quelatos sintéticos comercializados en España representaba un 83% del mercado. En este ar-

tículo se resumen los distintos métodos analíticos para evaluar la calidad de las formulaciones comerciales y las nuevas técnicas aplicadas que se pueden emplear igualmente para los quelatos sintéticos de otros micronutrientes y a los complejos con agentes quelantes.

Irene Orera, Javier Abadía, Anunciación Abadía, Ana Álvarez-Fernández.

Departamento de Nutrición Vegetal,
Estación Experimental de Aula Dei,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

La deficiencia de hierro o clorosis férrica es una de las alteraciones nutricionales más importantes que se pueden encontrar en las plantas. El síntoma visual de esta deficiencia es el amarilleamiento de las zonas intervenales de las hojas debido a la falta de clorofila y, en los casos más avanzados, puede llegar a producir defoliación prematura de los brotes, necrosis foliar y, en casos extremos, la muerte de la planta. En la **foto 1** se muestra una plantación de melocotoneros afectados por clorosis y un detalle del amarilleamiento de las hojas.

La frecuencia y gravedad de la clorosis férrica depende tanto del material vegetal (especie y variedad) como del medio de cultivo. Así, los suelos calizos son los mayores responsables de esta deficiencia ya que el hierro, a los valores de pH habituales en este tipo de suelos (7,5-8,5), se encuentra precipitado como óxidos y/o hidróxidos poco solubles y no utilizables por las plantas. Se estima que aproximada-



Foto 1. Plantación de melocotoneros afectada por clorosis férrica en el Valle del Ebro. Detalle de una hoja con amarilleamiento intervenal típico en este tipo de estrés.

mente el 30% del suelo cultivado en el mundo es suelo calizo y, por tanto, susceptible de provocar clorosis férrica. En el área mediterránea, prácticamente todos los frutales (manzano, albaricoquero, peral, melocotonero, ciruelo, cerezo, viña, almendro, olivo y cítricos) se cultivan sobre suelos calizos y,

por ello, son frecuentemente afectados por este estrés. Por ejemplo, en el valle del Ebro, se estimó hace ya unos años que el 90% de las plantaciones de melocotonero y el 67% de las de peral eran fertilizadas cada año para corregir la clorosis férrica (Sanz *et al.*, 1992).

El impacto económico de este desorden nutricional en la agricultura es muy importante, debido no sólo al descenso en la producción y calidad de los frutos, sino también al elevado precio de algunos fertilizantes férricos empleados habitualmente por los agricultores para corregir la deficiencia (Rombolà y Tagliavini, 2006). La práctica agrícola más común y eficaz para controlar la clorosis férrica es la aplicación de quelatos sintéticos de hierro, aplicación que se realiza en general al suelo. Los quelatos sintéticos de hierro se forman por la unión de un átomo de hierro a un anión orgánico llamado agente quelante. Los agentes quelantes de los quelatos sintéticos de hierro se consideran compuestos xenobióticos ya que se tratan de compuestos que han sido sintetizados por el hombre en el laboratorio y cuya estructura química en la naturaleza es inexistente. España es el mayor consumidor de Europa en este tipo de fertilizantes, llegando a consumir las dos terceras partes del mercado. En el año 2007, el número de fertilizantes de hierro a base de quelatos sintéticos comercializados en España representaba un 83% del mercado (Orera *et al.*, 2009a; **figura 1**). Entre ellos, los más comercializados son aquellos conteniendo la sal férrica del ácido etilendiamino-di(hidroxiifenilacético), conocido por sus siglas Fe(III)-EDDHA, que representaba el 72% del total de quelatos sintéticos de hierro (**figura 2**).

Análisis de calidad de fertilizantes

Métodos analíticos oficiales en la UE

La necesidad de armonización de la legislación Europea en materia de fertilizantes entre sus países miembros, ha llevado a la realización de sucesivas normativas que regulan las características técnicas que los fertilizantes deben reunir especialmente en lo que se refiere a la composición (ej.: agentes quelantes sintéticos permitidos), definición, denominación, identificación y envasado de los abonos de la Comunidad Europea (CE) (DOUE 2003, DOUE 2004 y DOUE 2007). Con la entrada de España en la Comunidad Europea, el mercado español de fertilizantes férricos ha experimentado diversos avances en cuanto a calidad de los productos comerciales. Estos avances se reflejan principalmente en un aumento en el contenido de hierro quelado por el agente quelante decla-

FIGURA 1.

Análisis de la evolución del mercado español de fertilizantes férricos con respecto al número y tipo de fertilizantes comercializados durante 17 años (Orera *et al.*, 2009a).

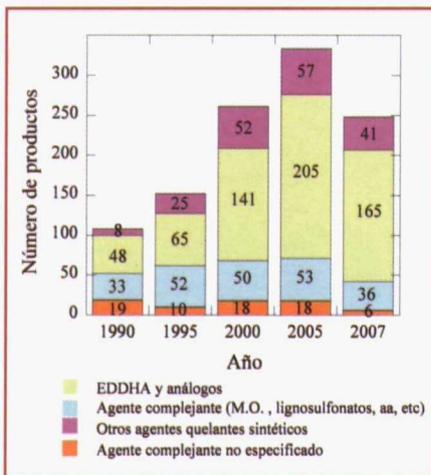
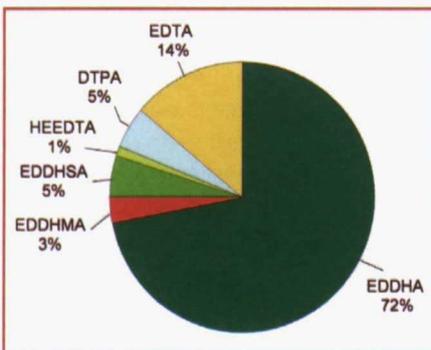


FIGURA 2.

Distribución de los fertilizantes a base de quelatos sintéticos de hierro comercializados en España en 2007 en función del agente quelante declarado en el envase (De Liñán, 2007).



rado en la etiqueta (García-Marco, 2005). Para evaluar la calidad de las formulaciones comerciales ha sido necesario el desarrollo de métodos de análisis que permitan determinar de una manera fiable el contenido de hierro quelado en los productos comerciales. Para llevar a cabo esta evaluación de la calidad han sido aprobado por la legislación Europea cuatro métodos oficiales basados en la utilización de la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a espectrofotometría del ultravioleta-visible (UV-vis) (DOUE, 2001a, 2001b, 2006a, 2006b). Sin embargo, no existe has-

ta este momento un método oficial que permita determinar en un único análisis el hierro quelado por todos los agentes quelantes autorizados por la Unión Europea.

Nuevas tecnologías analíticas aplicadas al análisis de fertilizantes sintéticos

Para poder resolver este problema analítico ha sido necesario utilizar tecnologías de última generación. Así, se están aplicando técnicas de detección como la espectrometría de masas con fuente de electrospray (ESI-MS; **foto 2**) al análisis de estos fertilizantes comerciales. La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la ionización de la muestra seguida por la separación e identificación, según la relación masa/carga (m/z) de los iones producidos. Esta técnica es altamente selectiva, ya que la probabilidad de que dos moléculas tengan la misma masa es muy baja. Además, para aumentar su selectividad, muchas veces la espectrometría de masas se acopla en línea a un cromatógrafo de líquidos (HPLC), de manera que las muestras son separadas según su comportamiento físico-químico (p. ej.: polaridad) e inmediatamente analizadas según su relación masa/carga en el espectrómetro de masas.

Otra ventaja que tiene la técnica combinada de HPLC-ESI-MS es su alta sensibilidad, es decir, la capacidad para medir concentraciones muy bajas del compuesto de interés. La combinación de alta selectividad y sensibilidad hacen que esta técnica sea por el momento la más idónea para el análisis de muestras medioambientales, ya que la complejidad de estas matrices requiere el uso de técnicas muy potentes.

En 2007, aplicando esta técnica se desarrolló un método analítico que permitió la determinación de todos los quelatos férricos sintéticos de los fertilizantes comerciales más utilizados en agricultura (Álvarez-Fernández *et al.*, 2007). Este método de análisis presenta ventajas con respecto a los anteriores ya que permite, por una parte, determinar siete quelatos férricos de manera muy fiable en un solo análisis, y por otra, determinar concentraciones más bajas que los anteriores métodos desarrollados en UV-vis (concentraciones entre 10 y 100 veces menores). La principal desventaja de estos equipos de espectrometría de masas es su precio que, aunque en los últimos años ha des-

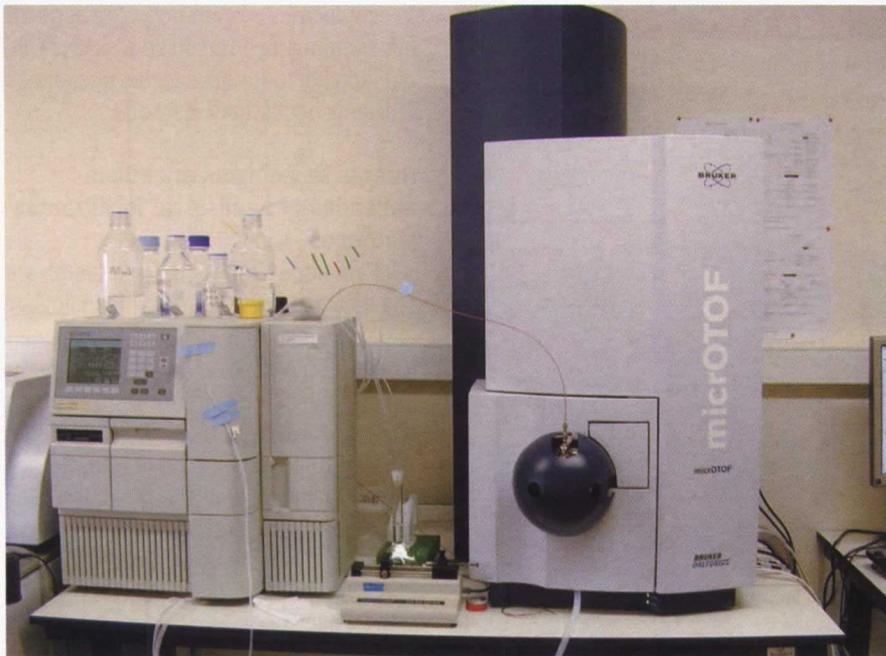


Foto 2. Cromatógrafo de líquidos (izquierda) acoplado a espectrómetro de masas con fuente de electrospray (derecha).

cendido, aún sigue siendo elevado (entre 100.000-400.000 € dependiendo del equipo).

Análisis de impurezas de los fertilizantes comerciales

La calidad de muchos de los fertilizantes férricos sintéticos está afectada por la presencia de otros compuestos no especificados en la formulación comercial y que, probablemente, se producen durante la síntesis de la parte orgánica de la molécula (agente quelante). Algunas de las estructuras de estos subproductos se han podido identificar por resonancia magnética nuclear (RMN), encontrándose estructuras similares a las del componente activo (Álvarez-Fernández *et al.*, 2002; Cremonini *et al.*, 2001). La principal desventaja del análisis de impurezas en las formulaciones comer-

ciales por RMN es que no se pueden analizar compuestos que contengan hierro, por lo que hay que eliminar este elemento de las muestras como paso previo al análisis. Este proceso conlleva generalmente pérdidas del agente quelante y de los subproductos minoritarios, así como la pérdida de información estructural del posible quelato de hierro.

Sin embargo, tanto la espectrometría de masas como la espectrometría de masas en tándem (MS-MS) permiten el análisis directo de estas impurezas sin necesidad de purificar y eliminar previamente el hierro de la muestra. Dentro de las técnicas de MS, la espectrometría de MS-MS es la que mayor información estructural proporciona debido al acoplamiento de dos etapas de análisis de masas entre las que se incorpora un proceso de ruptura de una molécula en sus correspondientes fragmentos.

Los fragmentos generados después de la ruptura de la molécula proporcionan una firma característica de la que se deduce información sobre su estructura, ya que se sabe que algunos enlaces químicos se rompen más fácilmente que otros. Por lo tanto, un espectro de MS-MS sería como tener las piezas de un puzzle que, combinadas de manera adecuada, pueden llevar a conocer la estructura final de la molécula. La técnica de MS-MS ha sido recientemente utilizada para la identificación estructural de algunos subproductos obtenidos en la síntesis del agente quelante EDDHA (Hernández-Apaolaza *et al.*, 2006) y para la elucidación estructural de impurezas en fertilizantes comerciales de Fe(III)-EDDHA (Orera *et al.*, 2009b). Los subproductos identificados hasta el momento en formulaciones comerciales tienen una estructura similar a la del agente quelante reflejado en la etiqueta, por lo que hay estudios dirigidos a conocer sus propiedades como fertilizantes de hierro. Por ejemplo, algunos subproductos de la síntesis del Fe(III)-o,oEDDHA, como el isómero Fe(III)-o,pEDDHA (recientemente incorporado a la lista de quelante permitidos en la UE), han demostrado tener buenas propiedades como fertilizantes de hierro en cultivos hidropónicos (García-Marco *et al.*, 2006) aunque en suelos calizos los resultados fueron menos satisfactorios (Rojas *et al.*, 2008). Sin embargo, otros subproductos de esta síntesis no mostraron tener buenas propiedades como fertilizantes de hierro (Hernández-Apaolaza *et al.*, 2006).

Por otra parte, además de conocer la eficacia para suministrar hierro a las plantas de las impurezas encontradas en fertilizantes comerciales, es importante conocer también su efecto en el medio ambiente, ya que se trata de compuestos sintéticos que se están aplicando al campo de igual manera, aunque en menor concentración, que los productos legalizados.

Seguimiento de la parte xenobiótica del quelato de hierro en el sistema suelo/planta

Importancia del análisis de quelato en matrices medioambientales

Como ya se ha dicho, los quelatos sintéticos se forman por la unión de un átomo de hierro a un agente quelante. Este quelante se considera compuesto xenobiótico ya que es

CUADRO I.

Concentraciones de o,oEDDHA (en nmol/g peso fresco) encontradas en tejidos vegetales de plantas de remolacha y tomate cultivadas hidropónicamente*.

| | | o,oEDDHA (nmol / g peso fresco) |
|-----------|--------|------------------------------------|
| Remolacha | Hojas | 23,6 ± 1,8 |
| | Raíces | 12,1 ± 1,6 |
| Tomate | Hojas | 63,0 ± 5,8 |
| | Raíces | 18,0 ± 2,9 |

*Tratadas durante 1 día con un fertilizante comercial de Fe(III)-EDDHA a una concentración de 90 µM.

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la ionización de la muestra seguida por la separación e identificación, según la relación masa/carga (m/z) de los iones producidos. Esta técnica es altamente selectiva, ya que la probabilidad de que dos moléculas tengan la misma masa es muy baja

un compuesto de síntesis que no se encuentra en la naturaleza. En la actualidad, se están investigando los efectos medioambientales que los agentes quelantes sintéticos pueden ocasionar debido, sobre todo, a la posible quelación de otros metales presentes en el suelo (Nowack, 2002), su lenta degradación y su posible entrada en la planta (Bienfait *et al.*, 2004).

Análisis de quelatos en suelo y planta

El análisis de los agentes quelantes en el sistema suelo/planta presenta dificultades debido a varias causas:

- Las bajas concentraciones en las que se encuentran.
- La variedad de especies en las que pueden estar presentes (p. ej.: quelados a otros metales).
- La complejidad de las matrices donde se analizan.

Por ello, la técnica analítica de espectrometría de masas resulta, una vez más, una buena opción para afrontar este tipo de análisis. Con el método analítico de HPLC-ESI-MS citado y desarrollado en 2007 se pudieron analizar hasta siete agentes quelantes sintéticos de hierro en solución del suelo, agua de riego, solución nutritiva y savia de xilema de melocotonero (Álvarez-Fernández *et al.*, 2007). Sin embargo, no ha sido hasta este mismo año 2009, cuando se ha desarrollado un método de HPLC-ESI-MS que permite el análisis de agentes quelantes de hierro en tejido vegetal (Orera *et al.*, 2009c).

Los criterios que se utilizan para identificar este tipo de xenobióticos por HPLC-ESI-MS en matrices medioambientales son los siguientes:

- El tiempo de retención cromatográfico.
- La relación masa/carga con una alta precisión ($\pm 0,02$).
- La huella isotópica de la molécula.

Este último criterio no siempre se puede corroborar en las concentraciones tan bajas en que aparecen estos xenobióticos debido a la baja intensidad de las masas isotópicas menos abundantes. Las principales ventajas que presenta este método de HPLC-ESI-MS son una muy buena sensibilidad (al menos un orden de magnitud mejor que los de UV-vis) y la necesidad de una pequeña cantidad de muestra de partida (0,3-1g peso fresco). Este método ha sido aplicado al análisis del agente quelante o, oEDDHA en plantas de remolacha y tomate tratadas durante 1 día en hidroponía con concentraciones moderadas de Fe(III)-EDDHA. Las concentraciones de xenobiótico encontradas para ambas especies se encuentran reflejadas en el **cuadro I** (Orera *et al.*, 2009c). Estos resultados muestran que

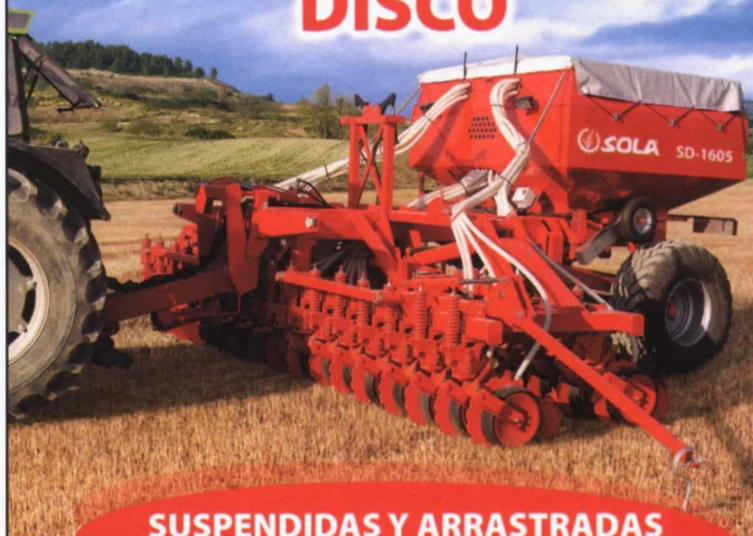
SOLA

LA MAYOR OFERTA
EN MÁQUINAS DE
SIEMBRA DIRECTA

32

MODELOS DIFERENTES

DISCO



SUSPENDIDAS Y ARRASTRADAS
desde 2'5 a 6 metros de labor



REJA

www.solagrupo.com

la parte xenobiótica del quelato sintético de hierro entra dentro de la planta en concentraciones del orden del nanomol después de sólo 1 día de tratamiento en hidroponía.

Conclusiones y perspectivas de futuro

La aplicación de nuevas técnicas analíticas más potentes, como la espectrometría de masas (MS) de alta resolución, acoplada a técnicas tradicionales de separación de compuestos (p. ej.: HPLC) a la investigación de quelatos sintéticos de hierro ha permitido estudiar aspectos de su calidad y mecanismos de acción hasta ahora poco conocidos. En el **cuadro II** se muestra un resumen de las técnicas utilizadas en este tipo de estudios y de sus principales aplicaciones. Estas técnicas han permitido, por ejemplo, determinar la cantidad de hierro quelado en formulaciones comerciales de fertilizantes de una manera rápida y fiable e identificar nuevas impurezas que contienen hierro en dichos productos. En cuanto al mecanismo de acción de los quelatos sintéticos de hierro, se ha desarrollado una metodología capaz de analizar la parte xenobiótica del quelato con alta sensibilidad en los sistemas suelo/planta, lo que abre una nueva puerta al estudio agrícola y medioambiental de los efectos causados por este tipo de fertilización.

El trabajo futuro en este campo de la agricultura debería dirigirse a estudios de eficacia de las nuevas impurezas encontradas en productos comerciales. Desde un punto de vista científico, se podría profundizar más en el conocimiento del mecanismo de acción de los quelatos sintéticos de hierro centrándose en trabajos de campo con árboles frutales tratados regu-

larmente con este tipo de fertilizantes. Además, se debería estudiar la movilidad y persistencia de estos quelatos tanto en aguas como en matrices agrícolas en condiciones de campo que difieren de las utilizadas en los experimentos realizados hasta el momento, ya que implican mayores tiempos de exposición al producto, aplicaciones puntuales de dosis superiores y especies frutales como el melocotonero.

Por otra parte, en los próximos años, el esfuerzo analítico dirigido a los quelatos férricos sintéticos debería impulsar el desarrollo de metodologías de análisis de otros compuestos utilizados como fertilizantes de micronutrientes. Concretamente, todas las técnicas mencionadas son igualmente aplicables a los quelatos sintéticos de otros micronutrientes (p. ej.: manganeso y zinc) y los complejos con agentes quelantes naturales (p. ej.: aminoácidos y lignosulfonatos) debido a la similitud química entre estos compuestos y los quelatos férricos sintéticos. Este aspecto es particularmente interesante ya que, en la actualidad, no existen métodos oficiales de análisis que permitan la determinación individualizada de otros compuestos utilizados como fertilizantes de micronutrientes diferentes de los quelatos férricos sintéticos.

Según vayan aumentando las necesidades de investigación en fertilizantes férricos tanto en el sector investigador como en el sector empresarial habrá que seguir desarrollando nuevos métodos analíticos y de evaluación del efecto agronómico y medioambiental de estos productos, al mismo tiempo que se siguen mejorando los métodos ya existentes. Todas estas investigaciones van encaminadas a racionalizar la aplicación de los fertilizantes, minimizando los efectos contaminantes derivados de su aplicación. ●

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL2006-1416 y AGL2007-61948, cofinanciados con fondos FEDER), la Comunidad Europea (proyecto ISAFRUIT, Thematic Priority 5-Food Quality and Safety, 6th Framework Programme of RTD; N° de proyecto FP6-FOOD-CT-2006-016279), y el Gobierno de Aragón (Grupo A03). I Orera disfrutó de una beca-contrato predoctoral CONAID-DGA. La adquisición del HPLC-ESI-MS fue cofinanciada con fondos FEDER.

REFERENCIAS

- Álvarez-Fernández et al. (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 284-290
- Álvarez-Fernández et al. (2007) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18: 37-47
- Bienfait et al. (2004) *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 1103-1110
- Cremonini et al. (2001) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3527-3532
- De Liñán (2007) *En Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Agrotécnicas*, 616-626
- DOUE (2001a) *European Committee for Standardization EN 13368-1: 2001 E*
- DOUE (2001b) *European Committee for Standardization EN 13368-2: 2001 E*
- DOUE (2003) *Official Journal of the European Union L304: 1-194*
- DOUE (2004) *Official Journal of the European Union L359: 25-27*
- DOUE (2006a) *European Committee for Standardization CEN/TS 15451: 2006 E*
- DOUE (2006b) *European Committee for Standardization CEN/TS 15452: 2006 E*
- DOUE (2007) *Official Journal of the European Union L51: 7-15*
- García-Marco (2005) *Tesis Doctoral de la Universidad Autónoma de Madrid*
- García-Marco et al. (2006) *Plant and Soil* 279: 31-40
- Hernández-Apaolaza et al. (2006) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4355-4363
- Nowack (2002) *Environmental Science & Technology* 36: 4009-4016
- Orera et al. (2009a) *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 84: 7-12
- Orera et al. (2009b) *Rapid Communications In Mass Spectrometry* (en revisión)
- Orera et al. (2009c) *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 23: 1694-1702
- Rojas et al. (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10774-10778
- Rombolà A y Tagliavini M (2006) *En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms* LL Barton, J Abadía eds Springer, 61-83
- Sanz et al. (1992) *Journal of Plant Nutrition* 15: 1971-1981

CUADRO II.

Técnicas analíticas aplicadas a la investigación de quelatos férricos sintéticos.

| Técnica analítica | Aplicación |
|-------------------|---|
| HPLC-UV-vis | Determinación del hierro quelado en fertilizantes comerciales. |
| HPLC-ESI-MS | Determinación del hierro quelado en fertilizantes comerciales. Determinación de quelatos de hierro en soluciones de suelo, soluciones nutritivas y aguas de riego. Determinación de EDDHA en tejidos vegetales. |
| HPLC-ESI-MS-MS | Identificación de impurezas en fertilizantes comerciales. |
| RMN | Identificación de impurezas en fertilizantes comerciales. |