

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. LA CLOROSIS FÉRRICA.

Para que un cultivo se desarrolle de manera óptima es necesario que la concentración de nutrientes en la disolución del suelo sea suficiente para satisfacer las necesidades del vegetal. Sin embargo, las condiciones ambientales que envuelven a estos cultivos (características de los suelos y sustratos, estrés hídrico, ataque de insectos, hongos, bacterias y virus, etc...), pueden causar deficiencias nutricionales sobre todo en lo que se refiere a los micronutrientes, dando lugar a lo que se conoce como clorosis.

La clorosis férrica es producida por una deficiencia de hierro en la planta, que se manifiesta como un amarilleamiento de las zonas intervenales de las hojas jóvenes, y que se corrige con la aplicación de FeSO_4 o FeEDDHA , pero que no lo hace cuando se trata con cualquier otro nutriente (N, S, Zn, Mn, Cu, Co...) (Chaney, 1984). Un aspecto importante de la clorosis férrica es que provoca una disminución o inactivación de todos los procesos fisiológicos en los que interviene el Fe y en particular, de la síntesis de clorofilas (Miller et al., 1984), lo que se traduce en una reducción de la producción y de la calidad de los cultivos (Tagliavini et al., 2000) e incluso en la muerte prematura del vegetal (Sanz et al., 1992).

Esta alteración nutricional está fundamentalmente asociada al empleo de suelos de cultivo y aguas de riego calizos (Sánchez-Andréu et al., 1991), situación muy común en la cuenca mediterránea. De esta forma, en España presenta una destacada incidencia en gran número de cultivos de alto interés comercial tales como: cítricos, frutales de hoja caduca, arroz, tomates, etc...(Sanz et al., 1992).

A pesar que la clorosis férrica es un problema que ya fue descrito rigurosamente a principios del siglo XX por Molz (1907) (tesis doctoral citada por Mengel, 1995), su extrema complejidad ha provocado que casi

100 años de estudio no hayan permitido encontrar una metodología que consiga erradicarla de una forma totalmente satisfactoria.

I.1.1. Causas de la clorosis férrica.

Las causas que originan la clorosis son múltiples y de distinta naturaleza. A continuación se describen los factores más importantes que provocan este desorden nutricional:

Bajas concentraciones de Fe disponible en el suelo.

A pesar de que en suelos calizos es frecuente la aparición de clorosis férrica (Sánchez-Andréu et al., 1991), este hecho no se produce porque existan bajas concentraciones de Fe, ya que es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre después del oxígeno, silicio y aluminio (el valor medio de Fe estimado en los suelos es de 3'8%). Sin embargo, existen varios factores tales como el pH, el potencial rédox, el tipo de mineral al que está asociado el hierro,..., que hacen que la cantidad que permanece en disolución sea muy baja, produciendo carencias de este elemento en la planta que inhiben tanto su absorción como su incorporación en los procesos metabólicos del vegetal (Marschner et al., 1986; Römheld, 1987a; Lindsay, 1995; Marschner, 1995).

Uren (1984) realizó una clasificación de las distintas formas en las que el Fe se encuentra en los suelos (Fig.I.1). Este autor consideró que las formas móviles son las que constituyen el hierro soluble y por tanto, las que están disponibles para la planta. Por este motivo, todos los factores que influyan en la solubilidad del hierro, afectarán de forma directa a la absorción de este nutriente por el vegetal.

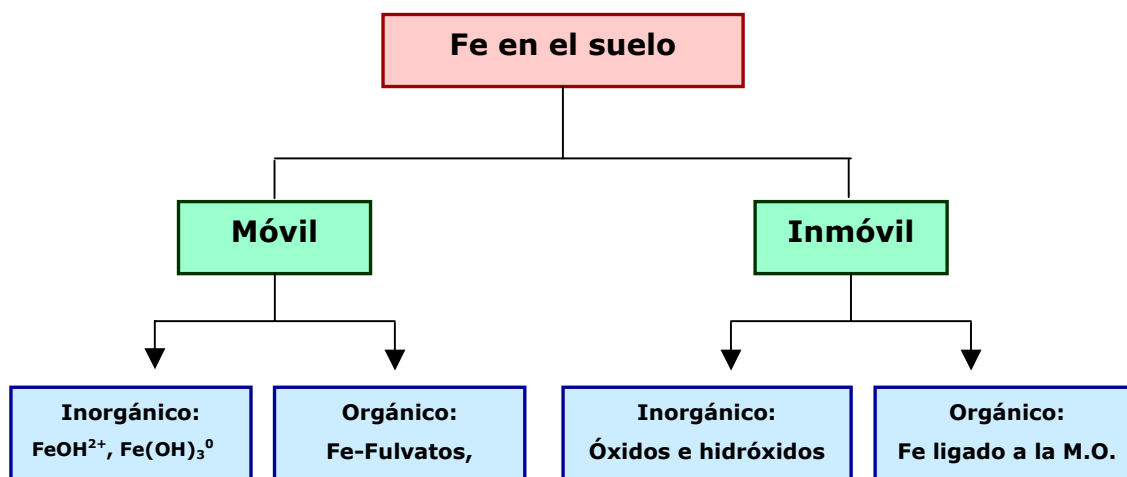
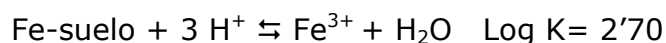


Fig.I.1. Formas del Fe en el suelo (Uren, 1984).

En la mayoría de los minerales primarios del suelo el hierro se encuentra como Fe(II), que durante la meteorización en medios aeróbicos precipita como óxidos e hidróxidos de Fe(III) muy insolubles. Este hecho provoca que en los suelos puedan coexistir óxidos e hidróxidos de hierro con distintas composiciones y grados de cristalización y por tanto, con distinta solubilidad. Así, el óxido de Fe amorfo sería el más soluble mientras que la goethita sería el de menor solubilidad (Fig.I.2).

La precipitación de Fe(III) en el suelo dará en primer lugar, hidróxidos férricos amorfos (Fe(OH)₃-amorfo) que tras un período de varias semanas, se van transformando en estructuras más ordenadas y menos solubles que se identifican como Fe-suelo, que controlan la solubilidad del Fe(III) en suelos bien aireados mediante la reacción (Lindsay, 1991):



El Fe-suelo, es un óxido de Fe(III) amorfo que se ha estabilizado, menos soluble que el material recién precipitado, y que podría corresponder con la ferrihidrita (Fig.I.2) (Lindsay, 1979).

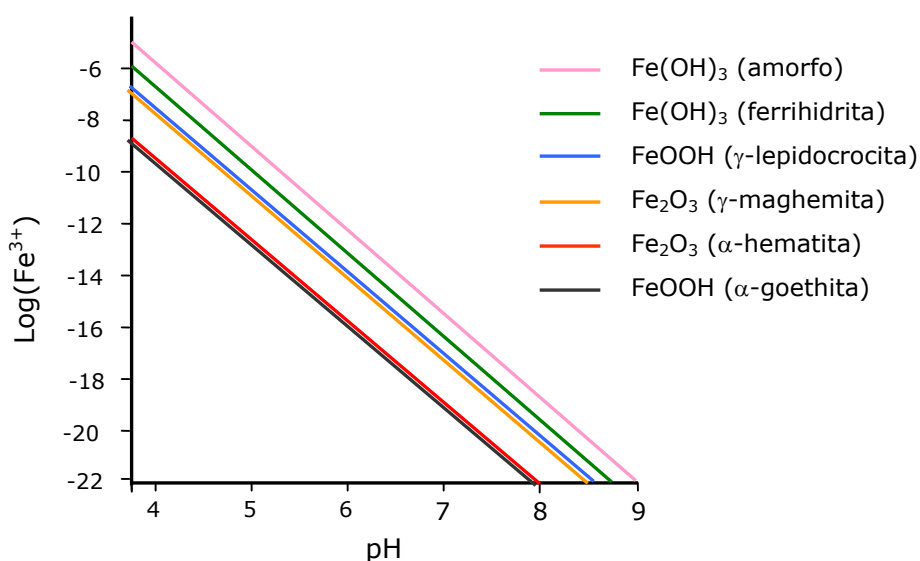


Fig.I.2. Actividad del Fe³⁺ en varios óxidos e hidróxidos férricos presentes en suelos en función del pH (Lindsay, 1979).

La solubilidad de los óxidos e hidróxidos de Fe(III) presentes en el medio está muy relacionada con el **pH del suelo**, de este modo la solubilidad desciende 1000 veces por cada unidad que aumenta el pH, reduciendo la concentración de Fe soluble a niveles por debajo de 10^{-20} M para un valor de pH en torno a 7'5 (Fig.I.2 y I.3).

Estudios realizados por Lindsay (1979 y 1991) muestran que la región de mínima solubilidad del hierro corresponde al rango de pH entre 7'5 y 8'5 (Fig.I.3), que coincide con el de los suelos calizos. La concentración de Fe para este intervalo de pH es de 10^{-10^4} M aproximadamente (Fig.I.3), cantidad insuficiente para el óptimo crecimiento de las plantas que requieren un intervalo de Fe soluble de 10^{-9} a 10^{-4} M en el medio (Guerinot y Yi, 1994). Estudios realizados por Römheld y Marschner (1986) muestran que en suelos bien aireados, la cantidad de hierro en disolución a valores de pH superiores a 4, es inferior al requerido por la mayoría de los vegetales, provocando que en las plantas cultivadas sobre estos suelos se den deficiencias de hierro.

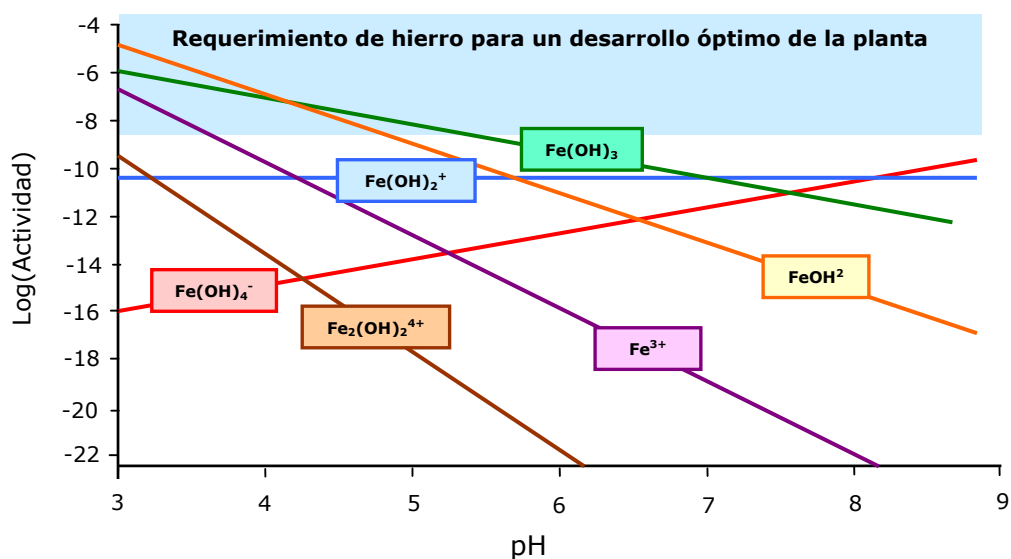
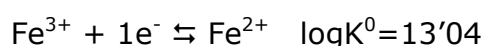


Fig.I.3. Especies hidrolizadas de Fe(III) en equilibrio con el Fe-suelo (Lindsay, 1979).

Cabe señalar que la solubilidad del Fe en un suelo también depende del **contenido de materia orgánica** del mismo. Así, la asociación del Fe con los agentes quelantes de la materia orgánica da lugar a la formación de complejos que incrementan considerablemente la concentración y la movilidad de este nutriente en la disolución del suelo (Lobartini y Orioli, 1988; Cesco et al., 2000). Estos agentes quelantes tienen distinta procedencia tales como la degradación de la materia orgánica (ácidos fúlvicos, aminoácidos, ...), los compuestos exudados por las raíces del vegetal (fitosideróforos), y los segregados por los microorganismos (sideróforos).

Puesto que el Fe puede presentar dos estados de oxidación, el **potencial rédox del suelo** es otro de los factores que influye en el contenido de este nutriente en disolución (Fig.I.4). La reacción de equilibrio de los dos estados de oxidación del hierro viene dada por:



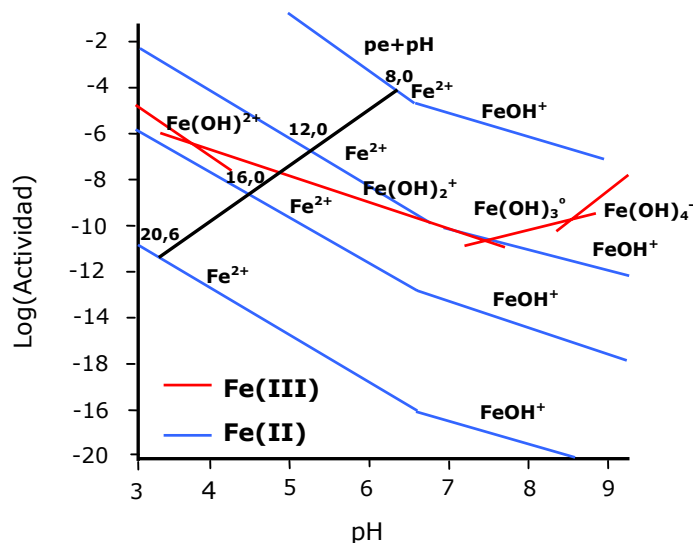


Fig.I.4. Efecto del potencial rédox sobre las especies Fe^{2+} y $Fe(OH)^+$ en comparación con las especies hidrolizadas de $Fe(III)$ en equilibrio con el Fe -suelo (Lindsay y Schwab, 1982).

En suelos bien aireados, condiciones en las que se encuentran normalmente los suelos de cultivo, el $Fe(III)$ no se ve alterado por el potencial rédox, siendo las especies hidrolizadas y la fase sólida las que controlan la solubilidad (Fig.I.4).

Con respecto al $Fe(II)$, presenta distintas especies dependiendo del pH del suelo. Así, a valores inferiores a 6,7, la especie predominante es el Fe^{2+} mientras que a valores de pH superiores, la especie principal es $FeOH^+$ (Fig.I.4). En condiciones aeróbicas estas especies son inestables, sin embargo, cuando se dan condiciones reductoras, estas dos especies son las más abundantes y las que controlan el hierro disponible para las plantas (Lindsay, 1991).

Lindsay (1995) señaló la hipótesis de la existencia de microlugares en el suelo, cerca de las zonas de respiración de las raíces y los microorganismos, en los que existirían temporalmente condiciones de anaerobiosis, y en las que la solubilidad del Fe estaría controlada por la

especie $\text{Fe}_3(\text{OH})_8$, la cual combina ambas formas iónicas del Fe (ión ferroso y férrico). Este compuesto es más soluble que el Fe-suelo. Si las raíces de las plantas pueden acceder hasta estos microlugares se podría llevar a cabo una nutrición férrica óptima.

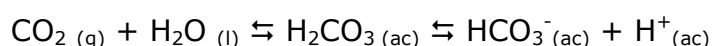
En suelos que estén altamente reducidos, la solubilidad del hierro estará aparentemente controlada por la siderita (FeCO_3). Incrementos en la concentración de CO_2 del suelo producirán un descenso de la solubilidad del Fe^{2+} , pero la presencia de siderita asegurará una adecuada disponibilidad de hierro para las plantas (Lindsay y Schawb, 1982).

Presencia del ión bicarbonato.

El bicarbonato es uno de los factores que induce la aparición de clorosis férrica en las plantas cultivadas sobre suelos calizos (Mengel y Malissiovas, 1981; Coulombe et al., 1984; Bloom e Inskeep, 1986).

La presencia de altas concentraciones de este ión en los suelos de cultivo influye en la biodisponibilidad del hierro provocando grandes alteraciones metabólicas en el vegetal (Sanz et al., 1992). Este ión inhibe el crecimiento y el metabolismo de las raíces (Yang et al., 1994), la absorción del Fe y su translocación al resto de órganos vegetales (Rutland y Bukovac, 1971; Dockendorf y Höfner, 1990; Mengel, 1995) y los mecanismos de respuesta de las plantas ante situaciones de deficiencia de Fe (Susín et al., 1996).

El bicarbonato se produce como consecuencia de la disolución del CO_2 de acuerdo con la reacción:



Cuando el bicarbonato y el ácido carbónico se encuentran en la disolución del suelo en concentraciones similares, se produce un acusado efecto amortiguador. Como el pH está fuertemente tamponado, el bicarbonato neutraliza tanto los protones que existen en el medio como los liberados por la bomba de protones de la membrana plasmática de las raíces, lo que se traduce en un aumento del pH del apoplasto y del citoplasma radicular (Romera et al., 1992; Mengel, 1995), y en una inhibición de la actividad de la reductasa férrica de la raíz. La alcalinización del apoplasto y citoplasma radicular puede causar la precipitación del Fe en dichos compartimentos, impidiendo el transporte al resto de los órganos vegetales mientras que la inhibición de la capacidad reductora, disminuye la toma de Fe por las raíces (Susín et al., 1996).

En estudios realizados con plantas de *Prunus Persica* cultivadas en hidroponía, se ha observado que cuando en la disolución nutritiva las concentraciones de bicarbonato y Fe son de 10 mM y 2'5 μ M respectivamente, se produce una disminución de la capacidad de las raíces para reducir el Fe(III) a Fe(II) y en consecuencia, la aparición de clorosis férrica. Sin embargo, cuando la disolución nutritiva se sustituye por otra similar a la anterior pero en la que la concentración de Fe es de 100 μ M, la capacidad de reducción de la planta aumenta significativamente aún en presencia del ión bicarbonato, produciéndose una recuperación total de los síntomas cloróticos (Alcántara et al., 2000). Estos resultados confirman los obtenidos por Bloom e Inskeep (1986), Romera et al. (1992) y Alcántara et al. (1988), de lo que se deduce que la inhibición de la capacidad reductora de las raíces no sólo depende de la concentración de bicarbonato, si no también de la cantidad de hierro presente en el medio.

Además de los efectos que el bicarbonato provoca en las raíces, la presencia de elevadas concentraciones de este ión en la disolución del suelo, también produce la inactivación del Fe en las hojas. Mengel et al. (1994) encontraron que esta inactivación estaba generada por un aumento del pH del apoplasto y por la inhibición del proceso de reducción del Fe(III)

en las hojas. Por el contrario, otros autores como Biino et al. (1997) y Nikolic y Römheld (1999) observaron que cuando se adicionaba bicarbonato en concentraciones de 20 mM a cultivos de viña, girasol y haba, no se producían aumentos significativos del pH del apoplasto ni disminuciones en la capacidad de reducción de Fe(III) en las hojas.

Nikolic y Kastori (2000) realizaron una experiencia con viña cultivada en hidroponía pura en la que la disolución nutritiva contenía carbonatos en una concentración de 10 mM. La presencia de este ión indujo la aparición de clorosis férrica, ya que inhibió la adquisición del Fe por las raíces, sin embargo, no se confirmó que produjese una inactivación del hierro en las hojas.

Presencia del ión nitrato.

La presencia de altas concentraciones de nitratos en el sustrato de cultivo, también puede ser otro de los factores que induzca la aparición de clorosis férrica (Wallace y Abou-zamzam, 1984; Mengel et al., 1994; Mengel, 1995; Kosegarten y Englisch, 1997; Smolders et al., 1997).

A pesar de que todavía no se sabe con exactitud cual es el mecanismo por el que el nitrato produce deficiencias de hierro en las plantas, se piensa que como en la rizosfera la reducción de nitrato a nitrito y amonio está favorecida termodinámicamente frente a la reducción del Fe(III) a Fe(II), el nitrato puede ser el aceptor final de los electrones liberados por las plantas, impidiendo la reducción del Fe(III). También puede ocurrir que una vez se haya producido la reducción del Fe(III), el Fe(II) sea reoxidado por el nitrato presente en el medio. En ambos casos, la concentración de Fe(II) en la rizosfera disminuye, lo que conlleva a la aparición de síntomas cloróticos. Además hay que tener en cuenta que la reducción de nitrato a nitrito consume dos protones del medio, dando lugar a un aumento del pH de la rizosfera y/o a la neutralización de los protones liberados por las raíces. Este aumento del pH provocará una disminución de

la actividad reductasa de la raíz y una menor solubilidad del Fe en el suelo, creando situaciones de déficit de Fe para el vegetal (Lucena, 2000).

Presencia del ión fosfato.

La presencia de iones fosfato también produce clorosis férrica en los cultivos, ya que estos aniones pueden competir con la planta por el hierro. Lindsay et al. (1963) observaron que la adición de P a un suelo con deficiencias de Fe acentuaba todavía más esta carencia. Parece ser que la clorosis férrica inducida por la presencia de fósforo se agrava cuando el pH, el potencial rédox, o la concentración de fosfato en el medio aumentan (Adams, 1980). El-Garabby y El-Razek (1982) encontraron que cuando se adicionaban altas concentraciones de fertilizantes fosforados a un suelo calizo-arenoso, se producía un efecto antagonista del P sobre el Fe. Del mismo modo, Juárez y Sánchez-Andréu (1996) indican que altas concentraciones de P disminuyen la absorción y movilización del Fe en el suelo, debido a la formación de fosfatos férricos insolubles o a la adsorción de los fosfatos sobre la superficie de los coloides férricos.

Otro de los efectos por el que el fósforo puede inducir a la aparición de la clorosis férrica, es que interfiere en el transporte interno de Fe en el vegetal debido a la formación de fosfatos de hierro insolubles (Biddulph, 1953; Rediski y Biddulph, 1953). Por el contrario, Tiffin (1970) afirmó que el hecho de que el transporte del Fe en la planta se produzca en forma de complejo Fe-citrato, debe proteger a este nutriente de la precipitación en forma de fosfato.

Interacciones entre el hierro y otros nutrientes.

La presencia de elevadas concentraciones de macronutrientes, micronutrientes y metales pesados pueden afectar el grado de clorosis desarrollado por los cultivos.

En relación a los macronutrientes, Loeppert et al. (1994) observaron que altos niveles de **Na** y **K** provocaban un incremento de la clorosis en el vegetal debido al deterioro que generan en la estructura del suelo, en las relaciones suelo-agua y en la aireación bajo condiciones de humedad. Del mismo modo, Belkhodja et al. (1998) encontraron elevadas concentraciones de K en hojas y flores de melocotoneros deficientes en Fe. Estos autores sugirieron que el aumento foliar de K podía ser consecuencia del incremento de la actividad de las ATPasas implicadas en la secreción de protones de la membrana plasmática radicular durante la época de crecimiento.

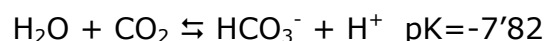
Por otro lado, la presencia de elevadas concentraciones de metales como **Cu, Zn, Cd, Ni...** en el medio, también pueden afectar a la respuesta de las plantas frente a situaciones de estrés férrico. Alcántara et al. (1994) encontraron que concentraciones superiores a 20 μM de Ni y a 5 μM de Cu y Cd, inhibían considerablemente el funcionamiento de la reductasa férrica de la raíz en plántulas cloróticas de pepino (*Cucumis sativus L.*), mientras que el Mn, Zn, Pb y Mo tenían un efecto limitado incluso a concentraciones superiores a los 20 μM . Cabe señalar que la inhibición que sufre esta enzima va a depender del cultivo y de las concentraciones en las que los metales se encuentren en la disolución del suelo. Así, Schmidt et al. (1997) observaron que con una concentración de 0,7 μM de Cu en el suelo, se producía una estimulación en la actividad de la Fe(III)-reductasa en la zona radicular en *Plantago lanceolat*. Sin embargo, cuando la concentración de este elemento superaba los 5 μM , la inhibición de la actividad de la enzima en plantas cloróticas llegaba a ser del 98%. Del mismo modo, O'nan et al. (1997) observaron que la presencia de Co disminuía la capacidad de reducción de la Fe(III) quelato-reductasa de la raíz de alfalfa.

Estos iones también compiten con el Fe(II) a nivel absorción. Así, cuando el Zn está presente en altas concentraciones puede competir con el Fe²⁺ por las zonas de transporte o bien, producir una menor afinidad de dicho ión por esos sistemas de transporte debido a que se producen alteraciones estructurales o bioquímicas (Zaharieva y Römheld, 2000).

Estos mismos autores indican que cuando en la disolución nutritiva existe un exceso de Cd, también se observan desórdenes fisiológicos que provocan que la toma de Fe sea menor.

Humedad.

En los suelos encharcados se produce una acumulación de CO₂ debido a la menor velocidad de difusión de los gases en el agua. Este exceso de CO₂ provoca la aparición de bicarbonato y protones según la reacción:



De este equilibrio se deduce que por un lado, tiene lugar un aumento de la concentración de bicarbonato en el medio con los efectos mencionados anteriormente (Loeppert et al., 1994) y por otro, un incremento de la concentración de protones en disolución que producirá una disminución del pH del suelo. Esto, junto al hecho de que es un medio muy reductor, favorecerá la reducción de Fe(III) a Fe(II), lo que podría contribuir a que hubiese más Fe disponible para la planta, disminuyendo los síntomas cloróticos. Yen et al. (1988) encontraron que el aumento de la humedad en un suelo no parecía estar relacionado con la clorosis en gramíneas como sorgo, pero sí en dicotiledóneas como la soja.

Enmiendas orgánicas.

Durante mucho tiempo, uno de los métodos de corrección de la clorosis férrica ha sido la aplicación de materia orgánica, ya que mejora la estructura del suelo, disminuye el pH y puede actuar como quelante del hierro, aumentando la concentración de este nutriente disponible para el vegetal. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que la materia orgánica en determinadas circunstancias, puede inducir la aparición de clorosis férrica. Cuando los materiales aplicados al suelo son poco evolucionados, con el paso del tiempo pueden producir un aumento en la

concentración de CO₂ que acabará transformándose en bicarbonato e incrementando la concentración de este ión en la disolución del suelo (Mengel y Kirkby, 1982; Römheld y Marschner, 1986).

La aplicación de materia orgánica fresca al suelo puede agravar la clorosis en suelos compactos y húmedos debido a que se produce un incremento de la concentración de etileno en el medio (Peret y Koblet, 1984). Esta sustancia es una hormona reguladora del crecimiento vegetal que puede inhibir diversos procesos fisiológicos y/o morfológicos. Así, a determinadas concentraciones inhibe el crecimiento vegetativo y de las raíces, induce la maduración y la senescencia y reduce el contenido de clorofilas en hojas de pepino y lechuga (Mortensen, 1989).

Temperaturas extremas.

Las temperaturas extremas de un suelo puede ser otro de los factores que incrementa la clorosis férrica de los cultivos (Wei et al., 1997).

Las bajas temperaturas disminuyen el desarrollo radicular y por tanto, provocan una reducción en la capacidad de absorción del Fe por la planta (Chaney, 1984). Lahav y Turner (1984) estudiaron el efecto de la temperatura en el proceso de absorción del Fe en plataneras. Estos autores encontraron que el máximo de absorción se producía por encima de los 37/30°C (temperatura día/noche) y que cuando las temperaturas descendían hasta los 17/10°C, la absorción era dos o tres veces menor que en el óptimo de temperatura.

En resumen, las causas que producen y/o incrementan la clorosis férrica en los vegetales están relacionadas con el comportamiento del Fe en el sistema Suelo-Planta.

I.2. EL Fe EN EL SISTEMA SUELO-PLANTA.

Hasta el momento se ha descrito ampliamente cual es el comportamiento del Fe en los suelos, por lo que en este apartado nos centraremos en conocer como es el proceso de toma de este nutriente por el vegetal así como su comportamiento en el mismo.

I.2.1. Toma de Fe por la planta.

La toma de Fe por parte de la planta se produce generalmente en forma de Fe(II). Sin embargo en suelos bien aireados, condiciones en las que se encuentran normalmente los suelos de cultivo, la forma predominante es el Fe(III). Es por tanto necesario que bajo estas condiciones se produzca el paso previo de reducción del Fe(III) a Fe(II). Este proceso lo realiza una enzima reductasa que se encuentra en la membrana plasmática de la raíz (Bienfait, 1985; Römheld, 1987b), la cual es capaz de reducir aceptores externos de electrones de alto potencial, tales como el ferricianuro o el oxígeno, pero no compuestos de Fe quelado, debido a que éstos poseen potenciales rédox más bajos. El pH idóneo para que la reductasa estándar alcance su máxima actividad está entre 4 y 5. Por otro lado, las temperaturas extremas (muy por encima o por debajo de 25°C), los valores de pH mayores de 7.5 y la presencia de metales pesados afectarán su actividad (Lucena, 2000). Una vez que el hierro esté en forma de Fe(II), un transportador específico de este ión lo transportará por la raíz (Chaney et al., 1972).

En situaciones en las que existe una carencia de hierro en el medio, las plantas superiores han desarrollado una serie de mecanismos para aumentar la disponibilidad del Fe en la disolución del suelo. Dichas plantas se dividen en dos grupos dependiendo del modelo de respuesta que desarrollen bajo este déficit, plantas de estrategia I y de estrategia II (Chaney et al., 1972; Marschner et al., 1986; Römheld, 1987b; Bienfait, 1988; Brown y Jolley, 1988; Hopkins et al., 1992).

Plantas de estrategia I.

Este tipo de respuesta se observa en las plantas di- y monocotiledóneas, excepto gramíneas. Los mecanismos que muestran estas plantas vienen resumidos en la Fig.I.5.

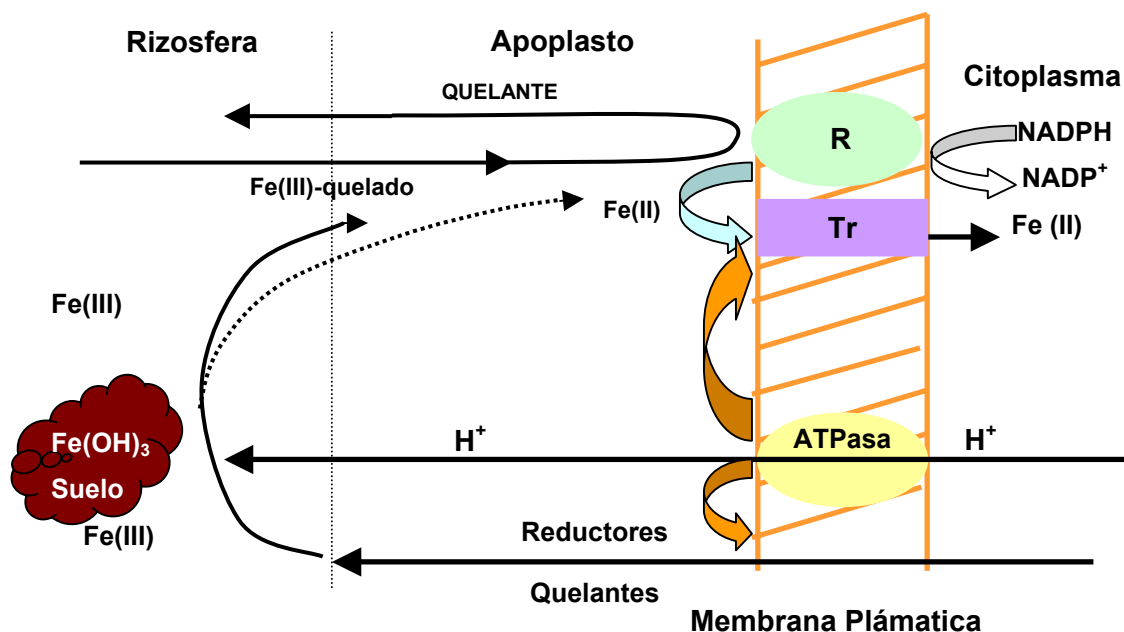


Fig.I.5. Modelo de respuesta de las plantas de Estrategia I ante situaciones de déficit de Fe (Marschner y Römheld, 1995). (R=Reductasa); (Tr=transportador Fe(II)).

- **Aumento de la capacidad reductora de la membrana plasmática de la raíz.**

Ante situaciones de deficiencia de Fe se activa un nuevo sistema rédox, la *reductasa turbo* (R Fig.I.5) que es una enzima transmembrana capaz de reducir el Fe quelado con electrones provenientes de NADPH citoplasmático, lo que no es posible mediante la reductasa estándar (Moog y Brüggemann, 1994; Rabotti y Zocchi, 1994; Susín et al., 1996). Existen dos

hipótesis sobre la reductasa turbo. Autores como Susín et al. (1996) afirman que esta enzima se origina ante situaciones de déficit de hierro, mientras que otros como Holder et al. (1991), Buckhout et al. (1989) y Moog y Brüggeman (1994), opinan que es una proteína que se encuentra en las raíces de las plantas, tanto en situaciones de deficiencia como de aporte normal de Fe, y que se activa cuando la concentración de hierro en el medio es insuficiente.

La activación de la reductasa turbo hace que la capacidad reductora de las raíces del vegetal en situación de deficiencia de Fe, aumente 20 veces con respecto al control (Moog y Brüggeman, 1994).

Cabe señalar que la enzima reductasa turbo sólo ha podido ser parcialmente purificada, por lo que no es posible conocer la secuencia de aminoácidos que permita su clonación. Este hecho se debe probablemente, a que es una proteína de la membrana plasmática y las cantidades obtenidas en la purificación no son suficientes para poder realizar el análisis de la proteína (Chaney et al., 1972; Holden et al., 1991). Sin embargo, Robinson et al. (1999) han aislado el gen FRO2 que se expresa en raíces de *Arabidopsis* (planta eficiente de estrategia I) deficientes en Fe, lo que ha permitido investigar la contribución de las diferentes reductasas en la adquisición de Fe exógeno y la distribución del mismo en los diferentes tipos de células y órganos, resultados que se han aplicado en la creación de plantas transgénicas que presentan una mayor actividad de la Fe(III) quelato-reductasa.

➤ **Disminución del pH de la rizosfera.**

Este efecto es debido a la inducción de una bomba de H⁺ (Fig.I.5), que depende del ATP de la membrana plasmática (Zocchi y Cocucci, 1990; Toulon et al., 1992). Al aumentar la capacidad de excretar protones, se produce una disminución del pH de la rizosfera, con lo que se consigue un aumento de la solubilidad del Fe presente en el suelo y de la actividad turbo

reductasa, dado que esta enzima alcanza su máxima actividad a pH 6'5 (Holden et al., 1991).

Jolley et al. (1988) destacan el papel del K^+ en el funcionamiento de la bomba de protones. Así, plantas de tomate y soja no son capaces de responder al estrés férrico en ausencia de K^+ , ni sustituyendo este ión por Na^+ o Rb^+ . Parece ser que el potasio es un estimulador específico de la ATPasa.

➤ **Generación de otros reductores y/o quelantes.**

Chaney y Bell (1987) observaron que cuando la concentración de Fe disponible en el medio es suficiente para el desarrollo óptimo de la planta, la liberación de reductores es muy escasa, en cambio en plantas sometidas a estrés férrico la liberación de reductores se ve favorecida (Marschner et al., 1986). Brown y Jolley (1988) encontraron que en plantas de tomate sometidas a estrés férrico, se produce un aumento de sustancias reductoras en el medio. Se han identificado en exudados de plantas de tomate y sorgo sustancias reductoras tales como ácido caféico y ftalato de butilo, respectivamente (Kannan y Ramani, 1988).

En muchos casos, la disminución del pH de la rizosfera está asociada con un aumento en la liberación de ácidos orgánicos por parte de las raíces, principalmente ácido cítrico y oxálico, los cuales son potentes quelantes del Fe (Wallace et al., 1976; Tyler y Ström, 1995). Soleen y Tyler (2000) afirmaron que la concentración de Fe que puede solubilizar el citrato liberado por las plantas, es superior a la conseguida por agentes quelantes sintéticos tales como el EDTA.

Por otro lado, destacar que Welkie y Miller (1993) encontraron que en plantas cloróticas, no sólo se produce un aumento de la concentración de ácidos orgánicos en la rizosfera sino también en el resto de la planta,

fenómeno que parece estar relacionado con la secreción de protones al medio (Fig.I.5).

➤ **Transporte activo del Fe por la raíz.**

Las plantas que presentan estrategia I se caracterizan por la inducción de un sistema de transporte de Fe^{2+} por la raíz (Fig. I.5) (Young y Terry, 1982; Fox et al., 1996).

En levaduras se ha demostrado que la reducción del Fe^{3+} y el transporte del Fe^{2+} son regulados independientemente (Eide et al., 1992) mientras que en *A. Thaliana*, se observa la existencia de un único sistema de regulación (Eide et al., 1996). Zaharieva y Römheld (2000) determinaron que en plantas de tomate, con una mutación que provoca la imposibilidad de inducir la reductasa turbo en situaciones de deficiencia de hierro, el transporte de Fe^{2+} en la raíz sí se produce, aunque de una forma menos eficiente. Este hecho pone en evidencia que en las plantas de tomate y probablemente en otras plantas de estrategia I, existe un sistema de regulación para la reducción de Fe^{3+} y otro para el transporte del Fe^{2+} .

Estudios cinéticos llevados a cabo con plantas de pepino muestran que existen dos sistemas de transporte de Fe distintos (uno de alta y otro de baja afinidad). En condiciones de suficiencia de Fe^{2+} , el sistema de baja afinidad es el que aporta hierro a la planta mientras que cuando se producen deficiencias de este elemento, el sistema de alta afinidad es activado (Zaharieva y Römheld, 2000). Estos autores observaron que en el rango de concentraciones de 0'03-400 μM de Fe^{2+} ambos sistemas se encuentran activos. Dix et al. (1994) indicaron que el desarrollo de células de levadura en situaciones de carencia de Fe también produce la activación de dos sistemas de transporte, los cuales presentan distintos caminos para la toma del Fe, siendo ambos biológicamente relevantes para la adquisición de este nutriente.

➤ **Modificaciones de la morfología de la raíz.**

Como respuesta a las deficiencias de Fe se pueden producir cambios morfológicos en la raíz.

A nivel macroscópico se produce un engrosamiento de las zonas subapicales y la aparición de pelos radiculares, lo que aumenta la superficie de adsorción (Welkie y Miller, 1993).

En cuanto a los cambios microscópicos se observa la presencia de células de transferencia en la zona de engrosamiento en las que se incrementa la superficie de contacto entre la pared celular y el citoplasma (Welkie y Miller, 1993).

Parece ser que tanto la disminución del pH de la rizosfera, como la liberación de reductores y/o quelantes, y el incremento de la capacidad reductora de la raíz no son respuestas independientes, sino que es un mecanismo global cuya respuesta se verá afectada si cualquiera de los tres factores disminuye (Brown y Jolley, 1988).

La importancia relativa de los tres mecanismos de respuesta frente a la deficiencia de Fe parece que difiere según genotipos. En general, el mecanismo más probable es el aumento de la actividad reductasa, al menos en plantas anuales mientras que, la liberación de reductores, es menos común si bien, también es más difícil de identificar (Marschner, 1991).

Plantas de estrategia II.

Este tipo de respuesta únicamente la desarrollan las gramíneas (Fig.I.6).

La respuesta de las plantas de Estrategia II ante situaciones de deficiencia de Fe se caracteriza por la liberación en la zona radicular de

unos compuestos quelantes de Fe de bajo peso molecular llamados fitosideróforos, por las similitudes que presentan con los sideróforos liberados por los microorganismos (Neilands y Leong, 1986; Takagi et al., 1984; Marschner et al., 1990), y por un sistema de transporte de alta afinidad de los quelatos de Fe(III)-fitosideróforos en la membrana plasmática de las células radiculares (Römheld y Marschner, 1990) (Fig.I.6).

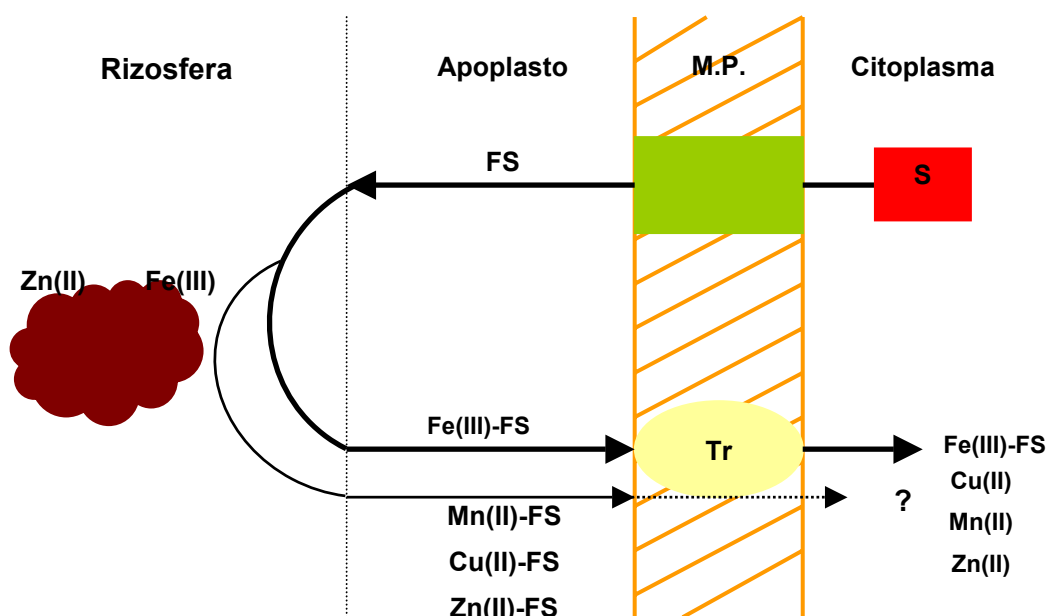


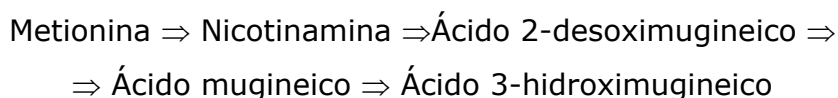
Fig.I.6. Modelo de respuesta de las plantas con Estrategia II ante situaciones de déficit de Fe (Marschner y Römheld, 1995). (S= síntesis y liberación de fitosideróforos; Tr= transportador de Fe(III)-Fitosideróforo; FS=fitosideróforo; M.P.= membrana plasmática).

Los fitosideróforos son aminoácidos no proteinógenos tales como el ácido mugineico, que se caracterizan por formar complejos muy estables con el Fe(III) pero no con el Fe(II) (Takagi, 1976 y 1993). La presencia de fitosideróforos en el medio hace que la cantidad de hierro disponible en las zonas más próximas a las raíces sea mayor que en presencia de quelatos sintéticos de hierro, tales como FeEDDHA, o de complejos producidos por

los microorganismos (sideróforos), tales como ferricromo. Esta mayor disponibilidad es debida a que los fitosideróforos presentan una afinidad 2 ó 3 veces superior por el sistema de transporte a través de la membrana plasmática que los sideróforos o que los quelatos sintéticos (Bar-Ness et al., 1991; Römheld y Marschner, 1990; Crowley et al., 1992;).

➤ **Liberación de fitosideróforos.**

La biosíntesis de los fitosideróforos producida en las raíces comienza con un precursor común para todos, la metionina, siendo la nicotinamida un compuesto intermedio (Shojima et al., 1990).



La cantidad de fitosideróforos presentes en el medio está relacionada con el grado de resistencia a la clorosis (Kawai et al., 1988). A mayor deficiencia de Fe en el medio, mayor será la cantidad de fitosideróforos segregados por las raíces. En general, especies que liberan gran cantidad de fitosideróforos tales como cebada, centeno y trigo son más resistentes a la clorosis que especies que producen una menor cantidad tales como maíz, sorgo, y arroz (Marschner et al., 1986; Kawai et al., 1988; Römheld y Marschner, 1990; von Wirén et al., 1995). Sin embargo, esta correlación (mayor resistencia a la clorosis cuanto mayor sea la cantidad de fitosideróforos excretados) no siempre es cierta, ya que se ha encontrado que en distintos genotipos de maíz la resistencia a la clorosis es diferente, y que a pesar de que produzcan cantidades similares de fitosideróforos, la velocidad de toma será mayor para aquellos genotipos más eficientes (von Wirén, 1994; von Wirén et al., 1995).

Por tanto, la eficiencia de los fitosideróforos para aportar Fe a la planta no debe basarse solamente en la cantidad de estos compuestos que han sido segregados por el vegetal, sino también en el resto de factores que

controlan la efectividad de los fitosideróforos como sustancias que aportan Fe a las plantas (Lytle y Jolley, 1991; von Wirén, 1994), tales como:

- La susceptibilidad a la degradación microbiológica.
- Afinidad con los transportadores a través de la membrana plasmática de la raíz.
- Propiedades de quelación con respecto al Fe(III).
- Estabilidad frente a la fotodegradación.

En general, estos factores están relacionados con la estructura del fitosideróforo, sin embargo, existe muy poca información sobre cómo la estructura de un fitosideróforo puede influir en el grado de resistencia a la clorosis de la planta y la que existe, en muchos casos, es contradictoria. Por ejemplo, algunas especies resistentes a la clorosis tales como cebada y centeno sintetizan en mayor medida fitosideróforos hidroxilados, mientras que en especies menos resistentes tales como maíz y arroz, predomina el ácido desoximugineico no hidroxilado (DMA) (Kawai et al., 1988, Römheld y Marschner, 1990; Mori et al., 1991). El trigo, sin embargo, es bastante resistente y solamente produce DMA (Römheld y Marschner, 1990). Estudios llevados a cabo por von Wirén et al. (2000) observaron que la capacidad de quelación de los fitosideróforos, su constante de estabilidad y la afinidad por el transportador a través de la membrana plasmática depende de la presencia de grupos hidroxilados en su estructura y de la carga superficial neta del complejo Fe(III)-fitosideróforo. Esta carga superficial estará influenciada por el pH del medio. Así, en medios ligeramente ácidos, la introducción de grupos hidroxilo en la estructura del fitosideróforo aumenta la estabilidad del quelato y la toma de Fe por la planta.

Por otro lado, existe un gran número de microorganismos presentes en la rizosfera que pueden utilizar los fitosideróforos como fuente de carbono o de hierro. Aunque en la mayoría de los casos, lo que ocurre no es la utilización de los fitosideróforos como fuente de Fe, sino un intercambio

de ligando entre los sideróforos y los fitosideróforos (Guerinot y Yi, 1994). Römheld (1991) propone una separación física de la raíz en zonas que liberan fitosideróforos y zonas en las que se absorben Fe(III)-fitosideróforos. En estas zonas existiría una intensa colonización de bacterias que protegerían a los fitosideróforos de la degradación por los microorganismos y de la competencia por el Fe con los sideróforos.

Es importante conocer la capacidad de los fitosideróforos para poder complejar Fe proveniente de diferentes oxohidróxidos de Fe presentes en los suelos. Inoue et al. (1993) realizaron interacciones entre el ácido mugineico (AM) y cuatro óxidos de hierro sintéticos y encontraron que la cantidad de Fe solubilizada por el AM seguía el orden:

Ferrihidrita >> Lepidocrocita \geq Hematita = goethita

La disolución de Fe por parte del AM dependerá de la cristalinidad de los oxohidróxidos de Fe y del pH, encontrando que la máxima cantidad se obtiene para un rango de pH 7-8.

Es de destacar que los fitosideróforos son capaces de formar complejos con otros cationes metálicos como Mn, Cu o Zn. Son muchos los autores que han encontrado que la producción de fitosideróforos no es solamente una respuesta ante situaciones de déficit de Fe, sino también bajo condiciones de deficiencias de Zn (Zhang et al., 1991; Cakmak et al., 1994; Walter et al., 1994; Hopking et al., 1997; Erenoglu et al., 2000). Sin embargo, aunque los fitosideróforos pueden formar complejos con otros cationes, solamente la absorción de Fe(III)-fitosideróforos es altamente selectiva, siendo la absorción de los complejos formados por los fitosideróforos y otros nutrientes comparable a la de otras formas inorgánicas o a la de los quelatos sintéticos (Marschner y Römheld, 1995).

➤ **Sistema de transporte Fe(III)-fitosideróforos.**

El transporte de los quelatos Fe(III)-fitosideróforos a través de la membrana celular (Fig.I.6) se produce mediante una proteína específica, eludiendo el paso de la reducción del Fe(III) a Fe(II). La presencia de BPDS (agente quelante de Fe²⁺) no inhibe la adsorción de Fe en gramíneas (Blaylock et al., 1989), lo que demuestra que el transporte se produce en forma de Fe (III)-fitosideróforo. La translocación del Fe en plantas de arroz a las que se ha suministrado Fe(III)-fitosideróforo, es superior a la observada cuando se abastecen con Fe(III)-EDTA (Takagi et al., 1984), confirmando así que el sistema de transporte de Fe(III)-fitosideróforo es altamente selectivo.

I.2.2. El Fe en la planta.

I.2.2.1. Distribución del Fe en los tejidos.

El hecho que la concentración de Fe en hojas cloróticas sea en muchas ocasiones mayor que en hojas verdes (Paradoja de la clorosis) (Römheld, 1997a), junto a que el contenido de Fe en las raíces de plantas deficientes es varias veces superior al de las hojas, ha llevado a algunos autores como Marschner (1995) y Toselli et al. (2000) a sugerir la idea de que el desarrollo de la clorosis férrica puede estar más asociado a un problema de inactivación del Fe en los diferentes órganos del vegetal, que a un problema de disponibilidad del Fe en el medio de cultivo.

El recorrido que el Fe tiene que hacer desde la raíz hasta las células de las hojas tiene varias etapas críticas que podrían inducir a la aparición de la clorosis férrica.

La primera de ellas es que, como ya se ha visto en el Apartado.I.2.1, para que las plantas puedan tomar el Fe de la disolución del suelo es necesario que se produzca la reducción de Fe(III) a Fe(II) en la membrana

plasmática de las células radiculares. Este proceso es llevado a cabo por la Fe(III) quelato-reductasa, cuya actividad a los valores de pH de los suelos donde suelen aparecer síntomas cloróticos (7-8), está fuertemente inhibida lo que podría provocar la acumulación de Fe en la raíz (Mengel, 1995). Por otro lado, los elevados valores de pH que se alcanzan en el interior del apoplasto de la célula de la raíz, también pueden provocar la precipitación del Fe impidiendo su transporte al resto de la planta (Nikolic y Römheld, 1999).

Una vez se ha producido la reducción de Fe(III) a Fe(II), el ión ferroso se transporta a través de la membrana plasmática mediante transportadores específicos (Fox y Guerinot, 1998). A continuación y todavía en el simplasto del sistema radicular, el Fe(II) sufre una oxidación a Fe(III), proceso poco conocido. El transporte a las partes superiores de la planta se realiza principalmente vía xilema. Se piensa que sigue la dirección del flujo de masas, creado y mantenido por la transpiración. Parece razonable que debido al elevado valor de pH fisiológico que presenta el vegetal ante las situaciones que provocan la clorosis (presencia de ión bicarbonato y/o nitrato), la movilidad del ión Fe (III) sea baja. Por este motivo, el Fe se transporta por el xilema en forma de complejo soluble. Cambell y Redinbangh (1984) y Mengel y Kirby (1982) coinciden en considerar al citrato como el anión transportador del hierro, concretamente como dicitrato ($\text{Fe}_2\text{Cit}_2^-$), el cual es bastante estable en las condiciones del xilema. White et al. (1981) propusieron un modelo informático con el que se predecía que todo el Fe presente en el xilema estaba esencialmente en forma Fe (III)-citrato. Sin embargo, con este modelo no quedó clara la naturaleza molecular del complejo Fe-citrato.

Una vez el Fe llega a las hojas, éste tiene que atravesar la membrana plasmática para entrar en las células foliares. Este paso requiere de nuevo la reducción del Fe(III) a Fe(II), proceso que es llevado a cabo por una enzima reductasa similar a la que se encuentra en la membrana plasmática de las raíces. Este proceso sería otra de las etapas críticas que podrían

inducir a la clorosis férrica en el vegetal, ya que esta reductasa también se ve afectada por el pH del medio (Moog y Grünewald, 1997; Rombola et al., 1997). Así, se ha encontrado que la entrada del Fe desde el xilema al interior de la célula puede inhibirse si los valores de pH en el apoplasto son elevados (Mengel, 1995), lo que podría explicar que ante situaciones de deficiencia de Fe, los nervios de las hojas permaneciesen verdes mientras que los espacios intervenales quedaran amarillos.

Por otro lado, aunque el transporte se realiza principalmente vía xilema, Maas et al. (1988) encontraron Fe en savia del floema. Existen muy pocos trabajos que describan el comportamiento del Fe en el floema aunque parece ser que su capacidad para transportar este ión está relacionada con la respuesta de las plantas a la carencia de hierro. Estos autores encontraron que la concentración de Fe en el floema es mayor en plantas deficientes que en plantas normales (20 y 7 mmol/m³ respectivamente).

De acuerdo con lo visto hasta el momento, parece lógico pensar que las raíces podrían ser el órgano que controlara la respuesta de la planta ante deficiencias de Fe. Sin embargo, Maas et al. (1988) observaron que la aplicación foliar de FeEDTA en plantas de remolacha con clorosis férrica, provocaba un incremento en los contenidos de Fe en las raíces del vegetal y un descenso en la respuesta por parte de las raíces ante la deficiencia de este nutriente. Este hecho hace pensar que las hojas y los tallos deben constituir junto con las raíces un sistema regulador global de la respuesta del vegetal ante situaciones de carencia de Fe.

Bienfait (1985) también sugieren que los tallos y las hojas podrían ejercer una influencia en la respuesta de la raíz para la regulación del Fe y que se haría vía floema. Maas et al. (1988) extrajeron exudados del floema de plantas de judía con un aporte deficiente de hierro. A partir del análisis de la savia del floema, se determinó la existencia de complejos aniónicos de un peso molecular de 2400 en forma férrica, lo que parece indicar que el transporte de Fe a través del floema se haría en forma de complejos de

Fe(III). Stephan y Scholz (1993) proponen la nicotianamina como transportador del Fe.

I.2.2.2. Funciones metabólicas del Fe en la planta.

El hierro esta implicado en un gran número de funciones fisiológicas en la planta que se resumen en la Figura.I.7 (Mengel y Kirkby, 1982; Marschner et al., 1986; Terry y Zayed, 1995).

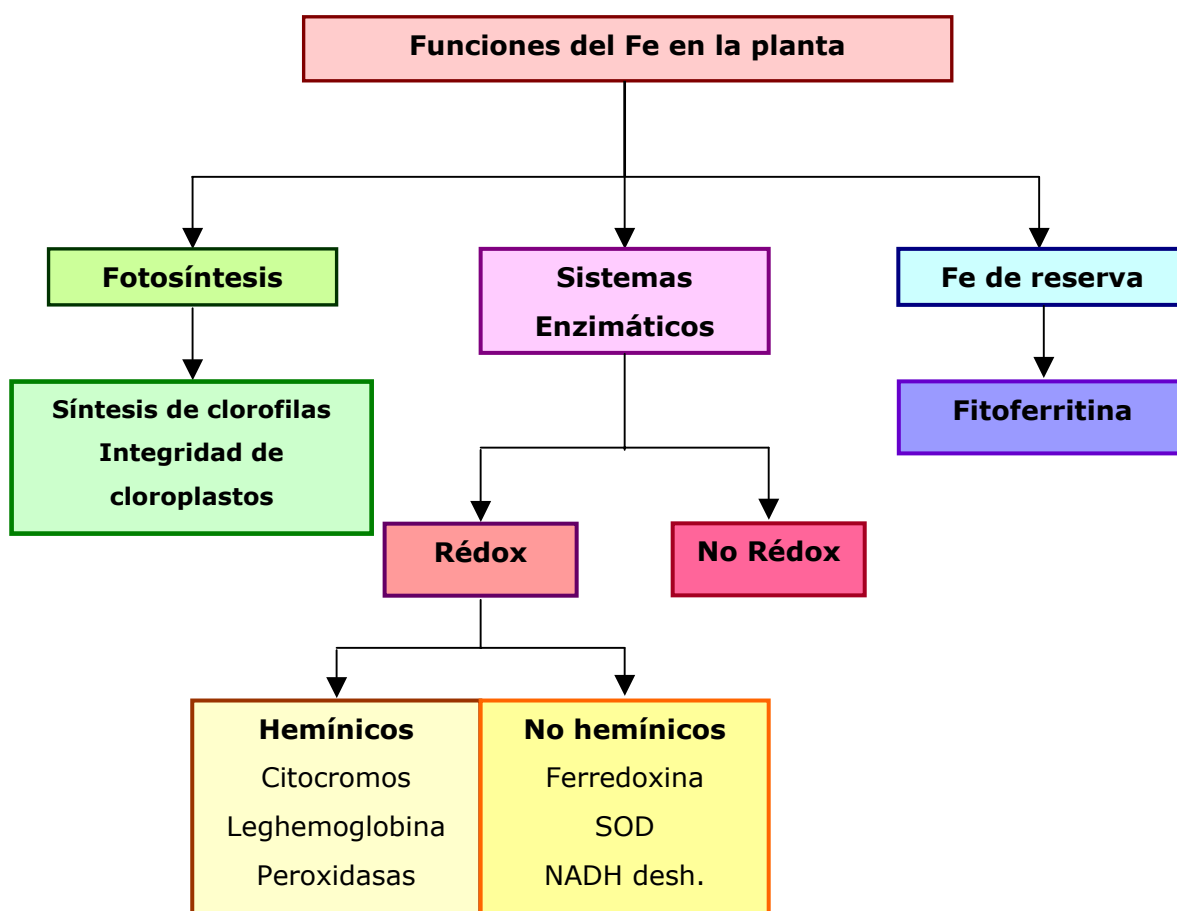


Fig.I.7. Funciones del Fe en la planta (Álvarez-Fernández, 2000).

Este elemento juega un papel muy importante en la fotosíntesis, no sólo por su acción en la síntesis de clorofilas (Miller et al., 1984) sino

también, por su influencia en la morfología de los cloroplastos (Terry y Abadía, 1986). Se ha observado que ante situaciones de deficiencia de Fe se produce una disminución en el tamaño y el número de cloroplastos de las hojas cloróticas.

Ante situaciones de carencia de hierro, los pigmentos fotosintéticos y los componentes de la cadena de electrones disminuyen, aunque no todos en la misma proporción. Así, la actividad del PSI se ve mucho más afectada que la del PSII. Cuando se aporta Fe a hojas cloróticas, los componentes del PSI (P700, citocromos y proteínas) incrementan sus contenidos en forma similar, lo que indica que el hierro influye en el desarrollo de la regulación del PSI y en el ensamblado de las subunidades en la membrana de los tilacoides (Pushnik y Miller, 1989). En contraste, el deterioro de la actividad respiratoria es prácticamente nulo. Esto indica que la deficiencia de Fe afecta en mayor medida al desarrollo y a las funciones de los cloroplastos que a la función mitocondrial (Pushnik y Miller, 1989) debido a que la etapa final de oxidación en las oxidasas citocromiales de las mitocondrias está catalizada por el cobre y no por el hierro.

Cuando se producen deficiencias de Fe en el vegetal tiene lugar una disminución de los contenidos de clorofilas y β -carotenos (Morales et al., 1990) mientras que la concentración de ciertas xantófilas puede aumentar (Quilez et al., 1992). Este incremento ha sido observado en zeaxantina, violaxantina y anteoxantina (Abadía et al., 1991). El cambio en la composición de los pigmentos en el cloroplasto ante deficiencias de Fe, está relacionado con cambios en la estructura. Así, la mayoría de las xantófilas se encuentran localizadas en la corteza de los cloroplastos y no en los tilacoides (Terry y Abadía, 1986).

Las hojas deficientes en Fe se caracterizan por tener bajos contenidos en azúcares y almidón (Arulanathan et al., 1990). Esto es debido a que la disminución del contenido de clorofilas en hojas cloróticas, reduce el transporte de electrones fotosintéticos, produciendo una disminución en la

concentración y la capacidad reductora de la ferredoxina. Otros de los factores que contribuyen a reducir el contenido de carbohidratos es la disminución de la velocidad en la regeneración de la ribulosabifosfato, que actúa como sustrato para el CO₂ en el ciclo de Calvin (Arulanthan et al., 1990) y en la fijación del CO₂ por unidad de clorofila (Sharma y Sanwal, 1992).

Por otro lado, mencionar que el hierro es esencial para las síntesis de proteínas. Shetty y Miller (1966) encontraron que la clorosis férrica produce una disminución del contenido de proteínas en hojas cloróticas, aunque este efecto es mucho mayor en los cloroplastos que en el citoplasma celular. Perur et al. (1961) observaron que en hojas de maíz cloróticas se producía una disminución del 25% en el contenido de proteínas totales en el citoplasma, mientras que en cloroplastos era del 82% debido probablemente, a que en los cloroplastos tiene lugar la síntesis de mRNA y rRNA y las necesidades hierro son mayores (Spiller et al., 1987). La deficiencia de Fe también afecta al número de ribosomas de las células, de forma que en hojas deficitarias en hierro su contenido se reduce significativamente con respecto al de hojas sanas (Lin et al., 1997). Cabe destacar que en casos muy severos de carencia de Fe también puede inhibir la división celular, lo que provocará una reducción del crecimiento foliar.

El Fe está relacionado con una serie de sistemas enzimáticos que se pueden dividir en hemínicos y no hemínicos. Dentro del grupo de los **sistemas enzimáticos hemínicos**, destacan los citocromos, complejos proteicos hierro-porfirínicos, que son constituyentes de los sistemas redox en los cloroplastos, en las mitocondrias y en la nitrato reductasa (Clarkson y Hanson, 1980).

Otros de los sistemas enzimáticos hemínicos estarían constituidos por catalasas y peroxidasas (Bar-Akiva et al., 1978; Römheld y Marschner, 1991), cuya actividad desciende en situaciones de déficit de Fe. La catalasa facilita la dismutación de H₂O₂ en H₂O y O₂ y junto a la

superóxidodismutasa toma parte en la fotorespiración y en el ciclo de Calvin. Las peroxidasas son abundantes en plantas y catalizan varios procesos. Por un lado, favorecen la detoxificación de H_2O_2 en los cloroplastos y por otro, catalizan la polimerización de fenoles a lignina y suberina en la rizodermis y endodermis de las raíces (Marschner, 1995). Cabe señalar que como hemos mencionado antes, en las raíces deficientes en Fe la actividad de las peroxidasas disminuye, lo que provocará una acumulación de grupos fenólicos en la rizodermis (Sijmons et al., 1985 y Römheld, 1987b).

Los **sistemas enzimáticos no hemínicos** se caracterizan por tener enlaces Fe-S en los que el Fe está coordinado con un grupo tiol de cisteína o con S inorgánico (Römheld y Marschner, 1991). El más conocido de los componentes de los sistemas no hemínicos es la ferredoxina, proteína férrica que actúa como aceptor final de electrones en la cadena de electrones en la fotosíntesis. Su alto potencial redox le permite reducir sustancias como NADP^+ , nitrito, oxígeno, sulfato, etc.

Además de la ferredoxina, existen otros sistemas no hemínicos (isoenzimas peróxidodismutasa, aconitasa, xantina oxidasa) que tienen funciones en procesos metabólicos tales como la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la fijación de N_2 , la reducción de SO_4^{2-} a SO_3^{2-} , etc.

El Fe también activa una serie de enzimas tales como ácido aminolevulínico sintetasa, coproporfirinogéno oxidasa, y juega un papel importante en las síntesis de RNA (Römheld y Marschner, 1991).

Dentro del cloroplasto se almacena Fe en forma de una fosfoproteína denominada fitoferritina, la cual es una proteína multimérica que actúa secuestrando más de $4 \cdot 10^3$ átomos de Fe en forma mineral estable dentro de un recubrimiento proteínico (Andrews et al., 1992), constituyendo una reserva de Fe no tóxica en la célula (Hewitt, 1983).

I.3. MÉTODOS DE CORRECCIÓN DE LA CLOROSIS FÉRRICA.

La clorosis férrica es uno de los principales factores nutricionales limitantes de la producción de los cultivos. Teniendo en cuenta que este problema afecta a gran parte de la zonas de cultivo de la superficie terrestre, las pérdidas económicas que genera son difíciles de calcular. Éste es el motivo por el que durante el último siglo se ha intentado buscar una tecnología que permita erradicar esta alteración nutricional. Sin embargo, aún no se ha encontrado un método que proporcione resultados que sean totalmente satisfactorios. En la actualidad la prevención y corrección de la clorosis férrica se puede atajar a través de dos vías (Chen, 1997):

Mejora y selección genética de cultivos resistentes.

Son muchos los estudios que ponen de manifiesto que la alteración genética de los cultivos permite obtener plantas más resistentes ante las situaciones de déficit de Fe (Han et al., 1994; Viti y Cinelli, 1993; Cinelli et al., 1995; Almaliotis et al., 1995; Han et al., 1998). Esta mejora genética implica la obtención de nuevos clones y genotipos que sean resistentes ante situaciones de carencia de este nutriente evaluando posteriormente su efectividad y obteniendo plantas más eficientes (Cianzo, 1995).

Aunque los primeros estudios indicaban que un único gen era el responsable de la eficiencia de las plantas ante carencias de Fe, estudios más recientes han demostrado que los genes implicados son varios y muy diferentes (Fairbanks, 1997). El uso de marcadores genéticos en semillas de soja resistentes a la clorosis revelan que probablemente sean dos los mecanismos genéticos que determinen la resistencia a la clorosis de esta especie (Lin et al., 1997). Esta resistencia podría ser debida a la distribución y al nivel de actividad de la Fe reductasa (Fairbanks, 1997).

Adición de fertilizantes.

Además del empleo de especies vegetales más eficientes, otro método que permite prevenir y corregir la clorosis férrica es la aplicación de aditivos que actúen como fuente de Fe para las plantas. Estos materiales se clasifican en (Lucena, 1990):

➤ **Sales inorgánicas de Fe.**

La fuente inorgánica de Fe de mayor uso en la agricultura es el FeSO_4 (Mortvedt et al., 1992) sin embargo, su empleo en suelos y sustratos calizos no aporta unos resultados demasiado satisfactorios, ya que estas sales son transformadas de manera rápida en formas no asimilables por la planta y por tanto, anulando su acción fertilizante. Según Mortvedt (1986), la aplicación del sulfato de Fe en bandas resulta más eficaz que la aplicación con espolvoreo. Del mismo modo, este autor también indica que el empleo del sulfato ferroso embebido en geles de poliacrilamida podría incrementar el tiempo que el Fe permanece en la disolución del suelo y en consecuencia, aumentar su efectividad. Por contrario, Natt (1992) no ha obtenido resultados satisfactorios cuando aplica esta sal recubierta con una resina natural.

Tal y como que ocurre cuando las sales inorgánicas se adicionan a suelos calizos, su empleo en sistemas de fertirrigación en los que el agua es rica en carbonatos y/o bicarbonatos, no es la forma más idónea de combatir la clorosis férrica dado que, por las características de este agua de riego, el Fe de la disolución podría precipitar obturando los goteros.

La aplicación de sales de Fe vía foliar ha dado mejores resultados, siempre que se aplique con un tensoactivo y con un mojante adecuado (Lucena, 1990; Sanz et al., 1992; Chen, 1997).

➤ **Compuestos orgánicos naturales.**

La adición de fertilizantes o sustratos orgánicos puede ser una solución a la clorosis férrica ya que aumentan la disponibilidad del Fe en la disolución del suelo. Así, la aplicación de abono verde en cultivos de arroz produjo un descenso del pH y del potencial rédox del suelo, lo que supuso un aumento de la disponibilidad del Fe para la planta (Sadana y Nayyar, 1997). El uso de compost básico también mejora la toma de Fe por parte de la planta (Dick y Chen, 1997; Malakouti y Kalantari, 1997), debido a que los microorganismos presentes en el compost, producen sideróforos hidroxamato que aumentan la movilidad del Fe en el suelo y por tanto, la cantidad disponible para plantas (Dick y Chen, 1997).

➤ **Acidificantes del suelo.**

Otra alternativa para prevenir o corregir la clorosis férrica es la adición de disoluciones ácidas al suelo, de esta forma se consigue disminuir el pH y aumentar la movilidad del Fe en el mismo (Mortverdt, 1991). La aplicación de este tipo de aditivos a suelos calizos es eficaz a corto plazo, ya que el poder amortiguador del bicarbonato neutraliza el efecto rápidamente. Singh et al. (1997) muestran que la aplicación de S a este tipo de suelos reduce la clorosis, siendo mejores los resultados si se adiciona con Fe.

La aplicación foliar de disoluciones ácidas en árboles frutales también proporciona buenos resultados, ya que incrementa la disponibilidad de Fe en hojas y la actividad de la reductasa (Tagliavini et al., 1995 y 1997; Wagner y Moog, 1997; Rombola et al., 1997; Moog y Grünwald, 1997). Estudios realizados por Tagliavini et al. (1997) ponen de manifiesto que la pulverización por el envés de las hojas es más efectiva que cuando se realiza por el haz.

Aunque en un principio estos fertilizantes se solían aplicar en forma de S o H_2SO_4 , en la actualidad es muy común encontrarlos como mezclas de

soluciones de urea con H_3PO_4 y/o H_2SO_4 . De forma que los productos resultantes tienen propiedades distintas de las de sus componentes por separado. Así, el US (urea- H_2SO_4) no es tan corrosivo como cuando se emplea H_2SO_4 sólo.

Cabe destacar que su uso está cada vez más centrado en aquellos cultivos que se desarrollan con sistemas de fertirrigación, ya que la disminución del pH evita la obstrucción de los goteros. Mikkelsen y Jarrell (1987) indican que la aplicación tanto de US como de UP (urea- H_3PO_4) en sistemas de riego localizado pueden ser beneficiosos en aquellos suelos donde tienen lugar deficiencias de Fe, Mn y Zn.

➤ **Complejos de hierro.**

El uso de complejos de Fe es el método más común para tratar actualmente la clorosis férrica (Lucena, 1990). Estos complejos se pueden dividir en dos grandes grupos, sintéticos y naturales.

El uso de los **complejos sintéticos de hierro** (quelatos) como correctores de la clorosis férrica comenzó en España a finales de los años cincuenta (Carpena, 1957) y hoy en día, son compuestos de gran importancia en la agricultura. Los quelatos de hierro más utilizados son los derivados de los ácidos poliaminocarboxílicos y en especial los FeEDDHA y FeEDDHMA que por su elevada estabilidad, proporcionan la mejor solución al problema de la clorosis férrica inducida por carbonatos (Lucena, 1990). El mayor inconveniente del empleo de estos productos es su elevado precio, lo que provoca que en muchas ocasiones su aplicación no resulte económicamente rentable para el agricultor.

Entre los **complejos naturales** se encuentran aquellos que provienen de compuestos biogenerados que no han sufrido transformaciones industriales, tales como los lignosulfonatos y poliflavonoides. Estas sustancias pueden no resultar eficaces para la

corrección de la clorosis férrica cuando se aplican al suelo, debido a la baja estabilidad de los complejos formados (Lucena, 1990). En cambio, su aplicación foliar sí parece dar buenos resultados (Bitiutsky et al., 1992). El-Fourly et al., (1997) emplearon lignosulfonato y lignopolicarboxilato como tratamiento de la clorosis en plantas de algodón, obteniendo mejores resultados que cuando se realizaba con quelatos sintéticos tales como el FeEDDHA. La aplicación de urea-formaldehído a cultivos de viña deficientes en hierro también fue efectiva para reducir los síntomas cloróticos (Akl et al., 1997). En relación al empleo de aminoácidos, humatos y fulvatos como correctores de las deficiencias férricas, destacar que aportan resultados satisfactorios ya que además de aumentar la solubilidad del Fe en el suelo, también incrementa la capacidad de toma de este nutriente por parte de la planta (Pinton et al., 1999; Cesco et al., 2000; Sánchez, 2002).

I.4. QUELATOS SINTÉTICOS DE Fe.

A la hora de elegir un quelato que sea eficaz para su uso como aporte de Fe al vegetal, se ha de tener en cuenta que su efectividad estará condicionada por las características del mismo, tales como (Brown, 1969):

- Ser estable frente a las reacciones de hidrólisis y precipitación.
- Ser soluble en agua.
- Estar en una forma química que permita ser asimilable por la planta.
- Permanecer inalterable frente a la actividad de los microorganismos del suelo.
- Ser barato.
- No ser tóxico en las cantidades aplicadas.
- Ser de fácil aplicación.
- El catión central no debe ser sustituido fácilmente por otros cationes presentes en el medio.
- No debe fijarse con facilidad en la superficie de los distintos componentes del suelo.

Estas características estarán en parte condicionadas por la forma de aplicación del quelato, que en general suele hacerse mediante:

- Aplicación foliar
- Aplicación al suelo.
- Fertirrigación.

Aplicación foliar.

Existe alguna controversia sobre si la aplicación foliar de los quelatos de hierro puede ser eficaz como medida correctora de la clorosis férrica. Algunos autores como Wallace (1988) y Rashid et al. (1997) están a favor de esta técnica ya que han obtenido que el uso vía foliar de quelatos sintéticos resulta más eficaz que el FeSO_4 a la hora de combatir la clorosis férrica. Sin embargo, Potdar y Anders, (1995), Tagliavini et al. (1997), Loupassaki et al. (1997) y Modaihsh (1997) encuentran que la aplicación foliar de FeSO_4 produce el mismo efecto que los quelatos sintéticos por lo que interesaría aplicar la sal, dado que el elevado precio de los quelatos, hacen que su empleo no resulte económicamente rentable.

La aplicación foliar de cualquier fertilizante será eficaz dependiendo de una serie de factores que se resumen en la Tabla I.1 (Alexander, 1985). Básicamente todos ellos están relacionados con las características de la especie vegetal, de la disolución empleada y de las condiciones ambientales.

Esta es una técnica que por su elevado coste podría restringir su utilización, pero la aplicación junto con fitosanitarios la abarata, obteniendo buenos resultados. La aplicación de quelatos férricos vía foliar será pues una vía alternativa y/o complementaria a la nutrición radicular.

Tabla I.1. Factores que determinan la eficacia de la aplicación foliar de nutrientes (Alexander, 1985).

Planta	Condiciones externas	Disolución
Cera cuticular Edad de la hoja Estomas Células guardas Tricomas Haz de las hojas Envés de las hojas Turgencia foliar Variedad de cultivo Etapa de cultivo Estado nutricional de la planta	Temperatura Luz Fotoperíodo Viento Humedad Sequía Hora del día Potencial osmótico radicular Estrés nutritivo	Concentración Cantidad aplicada Tecnología de aplicación pH Polaridad Higroscopicidad Estabilidad Relaciones entre los nutrientes Surfactantes Calidad de agua Humectantes

Aplicación al suelo.

Es el método más empleado junto con la técnica de adición a las aguas de riego y el que mejores resultados ha proporcionado.

La aplicación de FeEDTA como fuente de Fe en cultivos desarrollados sobre suelos calizos resulta ineficaz, dado que este quelato no es estable a los valores de pH que presentan estos suelos. Además, Lucena et al. (1988a) demostraron que su ineficacia no se debe únicamente al efecto del pH, sino a un efecto conjunto del pH y de la presencia de Ca²⁺ que provoca que el Fe³⁺ sea desplazado del quelato y precipite en forma de óxido e hidróxidos de Fe insolubles. Natt (1992) sugirió la utilización de fertilizantes de liberación lenta que contienen FeEDTA recubierto de una resina natural que disminuye la inestabilidad de este quelato en suelos calizos, produciendo además una liberación continua de Fe a lo largo de todo el ciclo de cultivo.

A pesar de que los quelatos FeDTPA son más estables que los de EDTA, su empleo en suelos calizos tampoco resulta efectivo, ya que tienden a fijarse en las arcillas y descomponerse (Wallace y Wallace, 1983).

En relación a los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA señalar que son los más eficaces cuando se aplican a suelos calizos (Wallace, 1983). Cuando se compara la efectividad de estos dos productos como correctores de la clorosis férrica, se encuentra que en muchas ocasiones los resultados pueden ser contradictorios. Así, Wallace (1971) afirmó que el FeEDDHMA era menos eficaz que el FeEDDHA. Reed et al. (1988) observaron que no existían diferencias en la efectividad de estos dos quelatos para corregir la clorosis férrica en melocotonero pero que en vid, el FeEDDHA era el más efectivo. Álvarez-Fernández et al. (1996) observaron que la aplicación de un producto de FeEDDHMA presentaba una mayor eficacia que otro producto FeEDDHA para aportar Fe a plantas de tomate desarrolladas sobre un suelo calizo. Wallace y Wallace (1992), Hernández-Apaolaza et al. (1995), Álvarez-Fernández (2000) y Cantera et al. (2002) encontraron que esta disparidad de resultados es debida a la gran variedad de formulaciones existentes en el mercado, las cuales presentan riquezas de hierro quelado distintas a las indicadas en las etiquetas e incluso en algunas de ellas, el agente quelante no se corresponde con el declarado por el fabricante. Será por tanto difícil comparar la efectividad de estos dos quelatos en las formulaciones comerciales.

Fertirrigación.

La fertirrigación, también denominada técnica de riego localizado, consiste en la aplicación conjunta de agua y fertilizantes e incluso fitosanitarios a partir de una fuente puntual en torno a la planta que, humedeciendo la zona de la rizosfera, hace posible que el vegetal pueda tomar el agua y los nutrientes necesarios para un crecimiento óptimo.

A la hora de analizar cual es el comportamiento de los quelatos de Fe sintéticos en fertirrigación se han de tener en cuenta dos aspectos fundamentales, por un lado las características del sustrato y de las aguas de riego que se van a emplear a lo largo del desarrollo del cultivo y por otro el funcionamiento de las instalaciones del sistema.

El uso de sustratos y aguas de riego calizas, van a provocar que la utilización de los quelatos FeEDTA y FeDTPA no sea efectiva ya que, como se ha mencionado anteriormente, estos compuestos no son estables frente a las condiciones del medio (pH, concentración de Ca, contenido de arcillas, ...). Por el contrario, los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA por su elevada estabilidad y su fácil solubilidad, son los materiales más utilizados en fertirrigación (Cadaña, 1998b).

En cuanto al funcionamiento de las instalaciones de los sistemas de riego localizado, señalar que los fertilizantes antes de ser mezclados con las aguas de riego, se introducen en tanques de disolución con el fin de preparar lo que se denomina disolución madre. En estos tanques, debido a las elevadas concentraciones en las que se encuentran los diferentes materiales, pueden producirse variaciones de pH que alteren la estabilidad del quelato. Normalmente, la presencia de ácidos minerales va a provocar un descenso del valor de pH por debajo del rango de estabilidad del quelato, pudiendo llegar a su descomposición. Cuando la disolución madre se mezcla con el agua de riego, si éstas son alcalinas, se producen aumentos de pH, alcanzándose valores próximos a la neutralidad que hacen que el quelato se recomponga de nuevo. Estas variaciones de pH afectan a la eficacia del quelato debido en gran medida, a la existencia de nutrientes que compiten con el Fe por la molécula quelante o con el agente quelante por el ión metálico (Bermúdez et al., 1999). Según estos autores, los factores que afectan a la eficacia de los quelatos utilizados en fertirrigación son, además del pH y la presencia de iones competidores, el tipo de quelato y las concentraciones relativas en las que se encuentren los iones competidores con respecto al quelato.

Lucena et al. (1991a) observaron que cuando el pH de la disolución nutritiva descendía hasta pH 1 y posteriormente aumentaba hasta pH 7,5, la estabilidad de FeEDTA se veía muy afectada, de forma que se producía una disminución en la concentración de Fe soluble que era aproximadamente el doble de la encontrada cuando el pH final era 6. Estos resultados se deben

principalmente a que a valores de pH superiores a 6'2, la competencia de Ca^{2+} y Zn^{2+} con el Fe^{3+} se incrementa considerablemente (Lindsay, 1984).

Bermúdez et al. (1999) indicaron que el comportamiento del FeEDDHA y FeEDDHMA frente a los procesos de descomposición-recomposición en disolución nutritiva era diferente, mostrando el primero una menor estabilidad tanto cuando la recomposición tiene lugar hasta pH ligeramente ácidos (4 y 5) como hasta valores de pH neutros (7).

I.4.1. Legislación española y de la CE.

La normativa vigente referida a los quelatos de Fe sintéticos de uso en agricultura es la Orden Ministerial del 28 de mayo de 1998 (publicada en el B.O.E. del 12 de julio de 1998), que se corresponde con la directiva de la CE 98/3/CE (D.O.C.E. L.18 del 23/1/98). Según esta orden, los quelatos de Fe deben ser solubles en agua y obtenidos por combinación química de un catión metálico con un agente quelante, deben presentar al menos un 5% de Fe soluble en agua y un mínimo de un 4% en forma quelada. Además en la etiqueta del producto debe indicarse el tipo de agente quelante que se habrá elegido dentro de los autorizados por la directiva UE 76/116/EC, y el rango de pH en el que se garantiza una buena estabilidad del quelato.

Esta orden también regula la comercialización de productos obtenidos por disolución de los quelatos de hierro en agua, y que en algunos casos, pueden ir acompañados de otras sales de hierro. Dichos productos han de tener al menos un 2% de hierro soluble en agua y se ha de especificar el tipo de agente quelante y los aniones de las diferentes sales que pueda llevar.

Por otro lado, destacar que de entre los distintos agentes quelates que se pueden usar para obtención de los quelatos sintéticos de hierro, la citada Orden Ministerial únicamente reconoce los siguientes:

- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.
- **HEDTA:** Ácido hidroxí-2-etilendiaminotriacético.
- **DTPA:** Ácido dietilentriaminopentacético.
- **EDDHA:** Ácido etilendiamino-di-(o-hidroxifenilacético)
- **EDDHMA:** Ácido etiléndiamino-di-(o-hidroxí-p-metilfenilacético).
- **EDDHCA:** Ácido etilendiamino-di-(5-carboxi-2-hidroxífenilacético).

Todo ellos se encuentran dentro de los denominados poliaminocarboxílicos. Sin embargo, hoy en día existen otros muchos agentes quelantes tales como el EDDHSA, HBED, HBEP, etc..., que proporcionan quelatos de estabíldades parecidas e incluso superiores a los anteriormente citados, pero que su empleo con fines agrícolas aún no ha sido aceptado por la presente legislación.

I.4.2. Agentes quelantes EDDHA y EDDHMA.

El HEDDHA y HEDDHMA son los agentes quelantes más utilizados actualmente en la agricultura, debido a los buenos resultados que aporta en la corrección de la clorosis férrica (Fig.I.8).

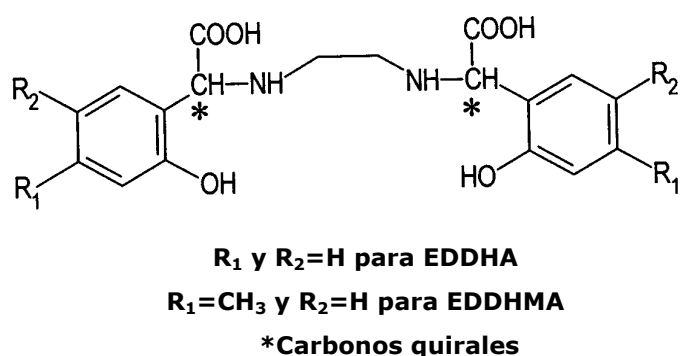
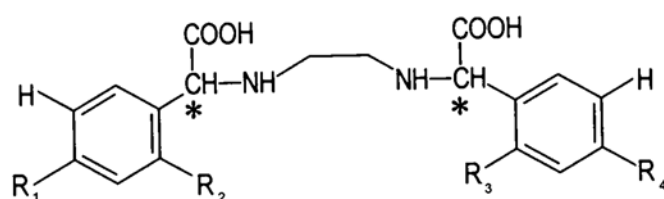


Fig.I.8. Estructura de los agentes quelates EDDHA y EDDHMA.

Los primeros en caracterizar el agente quelante EDDHA, fueron Lindsay et al. (1966), llegando a la conclusión de que formaba quelatos de hierro estables en un rango de pH entre 4 y 10, con una constante de estabilidad mayor de 10^{30} . Además se conocía que el EDDHA tiene una gran afinidad por el Fe(III), siendo menor por el Zn(II) y Mn(II) y mucho menor para Ca(II) y Mg(II) (Kroll, 1957).

La síntesis del EDDHA da lugar a la formación de tres isómeros posicionales debido a que el grupo hidroxilo, puede entrar en posición *-orto* o en posición *-para* en el anillo aromático (Fig.I.9):

- **orto-orto EDDHA** (los dos hidroxilos entran en posición *-orto*), conocido como isómero o-EDDHA.
- **para-para EDDHA** (los dos hidroxilos entran en posición *-para*), conocido como isómero p-EDDHA.
- **orto-para EDDHA** (un grupo hidroxilo entra en posición *-orto* y el otro en *-para*).



R_2 y $R_3=OH$ y R_1 y $R_4=H$ isómero orto-orto EDDHA

R_1 y $R_4=OH$ y R_2 y $R_3=H$ isómero para-para EDDHA

R_2 y $R_4=OH$ y R_1 y $R_3=H$ isómero orto-para EDDHA

***Carbonos quirales**

Fig.I.9. Estructuras de los isómeros posicionales del EDDHA.

A la hora de formar el quelato a partir del isómero *orto-orto*, los grupos hidroxilos se encuentran en una posición que favorece la formación del enlace Fe-fenol (Fig.I.9). Esto permite que el Fe pueda formar seis enlaces de coordinación con la molécula de agente quelante (dos enlaces con los átomos de nitrógeno, dos con los carboxilos y dos con los fenoles), dando lugar a una estructura de 5 anillos (2 anillos de 6 átomos y 3 de 5 átomos) muy estable, que hace que el quelato sea efectivo como fuente de hierro para las plantas.

Si el EDDHA tiene los grupos hidroxilos en posición *-para* (Fig.I.9), la formación del enlace Fe-fenol está estéricamente impedida, por lo que el hierro sólo podrá formar cuatro enlaces de coordinación (dos con los átomos de carbono y dos con los átomos de nitrógeno), obteniéndose una estructura de 3 anillos de 5 átomos que es menos estable, y en consecuencia, menos eficaz como fertilizante.

Puede ocurrir que uno de los grupos hidroxilo se encuentre en posición *-orto* y el otro en *-para* (Fig.I.9). En este caso, se forma una estructura de 4 anillos (1 anillo de 6 átomos y 3 de 5 átomos) que da lugar a un quelato menos eficaz que el *orto-orto*, pero más que el *para-para*.

La normativa comunitaria sólo reconoce el isómero *-orto* como quelato aplicable a la agricultura, aunque puede ocurrir que los productos comerciales no contengan un 100% de dicho isómero, lo que provocará que presenten distinta eficacia (Hernández-Apaolaza et al., 2000; Álvarez-Fernández, 2000; Cremonini et al., 2001; Cantera et al., 2002).

El quelante EDDHMA apareció más tarde en el mercado y se diferencia del EDDHA en que incluye un grupo metilo en la posición *-para* de los dos anillos aromáticos (Fig.I.8) (Davenport, 1973). Como el EDDHMA tiene bloqueada la posición *-para* con un metilo, la entrada del grupo hidróxilo en posición *-orto* está favorecida. Esto evita que se produzcan mezclas de isómeros, si bien, en los productos comerciales también se ha

detectado la presencia de diferentes compuestos procedentes de la síntesis del agente quelante que producirán diferencias en su eficacia (Álvarez-Fernández et al., 2002).

En cualquiera de los dos casos (o-EDDHA y EDDHMA), el isómero *orto*, está formado a su vez por dos isómeros ópticos:

- Mezcla d,l-racémica.
- Isómero meso

El isómero meso es ópticamente inactivo y presenta un plano de simetría en la molécula mientras que el isómero d,l-racémico está formado por la mezcla de dos isómeros que difieren en la dirección de desviación del plano de luz polarizada (Lucena et al., 1996).

Cuando el agente quelante compleja al Fe (III), se pueden dar a su vez diferentes disposiciones espaciales (isomería geométrica) (Fig.I.10). El isómero meso del (o-EDDHA), sólo presenta una disposición espacial que corresponde a aquella que posee un fenol en posición ecuatorial con respecto al plano formado por el Fe y los dos N; y el otro fenol en posición axial. Esta disposición debe contener el 50% del Fe (o-EDDHA). Por el contrario, para cada uno de los enantiómeros de la mezcla d,l-racémica, se pueden dar dos disposiciones espaciales diferentes, una en la que los dos fenoles se encuentran en posición ecuatorial y otra en la que los dos fenoles están en posición axial. Esta última disposición es la de menor estabilidad y tan sólo contribuye con un 0'5% del 50% del Fe (o-EDDHA) que se encuentra en forma d,l-racémica.

Si se comparan los pK de ambos isómeros geométricos (Tabla I.2.) se encuentra que para el Fe (o-EDDHA) la mezcla d,l-racémica es 500 veces más estable que el meso (Bannochie y Martell, 1989). Mientras que, en el caso del FeEDDHMA, el isómero meso es más estable que el d,l-racémico (Tabla I.2.) (Ahrlund et al., 1990).

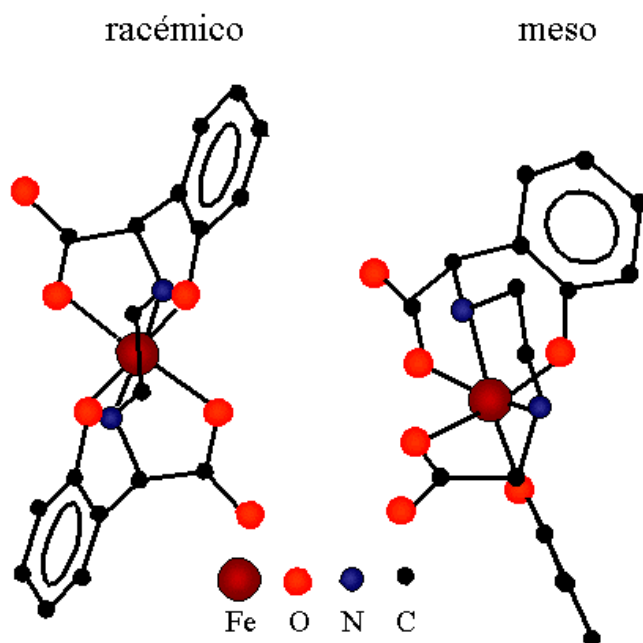


Fig.I.10. Isómeros geométricos de Fe (o-EDDHA).

Tabla I.2. pK de los isómeros d,l-racémico y meso de FeEDDHA y FeEDDHMA (Bannochie y Martell, 1989). (L=EDDHA o EDDHMA)

Log K	rac-EDDHA	meso-EDDHA	rac-EDDHMA	meso-EDDHMA
FeL/Fe+L	35'54	33'28	37'90	39'00

Se han intentado separar los dos isómeros del Fe (o-EDDHA) por diversos métodos. Hill-Cottingham (1962) los separó mediante cromatografía de papel y obtuvo dos bandas, una roja y otra violeta, aunque no pudo asignar que banda correspondía a cada uno de ellos. Ryskiewich y Boka (1962) separaron ambos isómeros mediante

cromatografía en columna, encontrando dos bandas que coincidían con las obtenidas por Hill-Cottingham (1962) mediante cromatografía de papel.

Barak y Chen (1987) a partir de una sal magnésica de FeEDDHA (que sólo presentaba el isómero *d,l*-racémico (Bailey et al., 1981)), encontraron que la banda roja obtenida mediante cromatografía de papel presenta el mismo tiempo de retención que el isómero *d,l*-racémico en cromatografía de intercambio iónico. De esta forma, se identificó el isómero *d,l*-racémico como la banda roja y al meso se le asignó la violeta.

Ahrland et al. (1990), Deacon et al. (1994) y Hernández-Apaolaza et al. (1996) consiguieron separar mediante cromatografía de intercambio iónico los isómeros geométricos del FeEDDHMA. Estos autores encontraron que tanto para el FeEDDHA como para el FeEDDHMA, el espectro de absorción en el UV-Vis de sus correspondientes isómeros geométricos, presentan unos máximos de absorbanza determinados (Fig.I.11).

Como se observa en la Fig.I.11, los espectros UV-Vis de estos compuestos presentan un máximo de absorción a 214 nm que corresponde al anillo de benceno, y otro alrededor de 285 nm asociado a la sustitución *orto* en el anillo (Jaffe y Orchin, 1962). La absorción en la zona del visible difiere un poco entre los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA así como para cada uno de los isómeros, lo que ha permitido la separación e identificación de los mismos. Tanto el FeEDDHA como el FeEDDHMA, presentan un máximo de absorbanza en la zona de espectro visible en torno a 480 nm, típica de los complejos con un enlace Fe-fenol, existiendo una diferencia en torno a 7 nm en la absorbanza de cada uno de los dos isómeros. El FeEDDHA presenta un máximo a 474 nm para el isómero *d,l*-racémico y a 485 nm para el meso, mientras que el FeEDDHMA, presenta un máximo a 485 nm para meso y otro a 492 nm para el *d,l*-racémico (Hernández-Apaolaza et al., 1996). Las pequeñas diferencias encontradas entre los valores de los máximos de absorción por distintos autores (Barack y Chen, 1987; Ahrland et al., 1990; Bannochie y Martell, 1991; Hernández-Apaolaza

et al., 1996 y Álvarez-Fernández, 2000) se atribuyen a las condiciones experimentales.

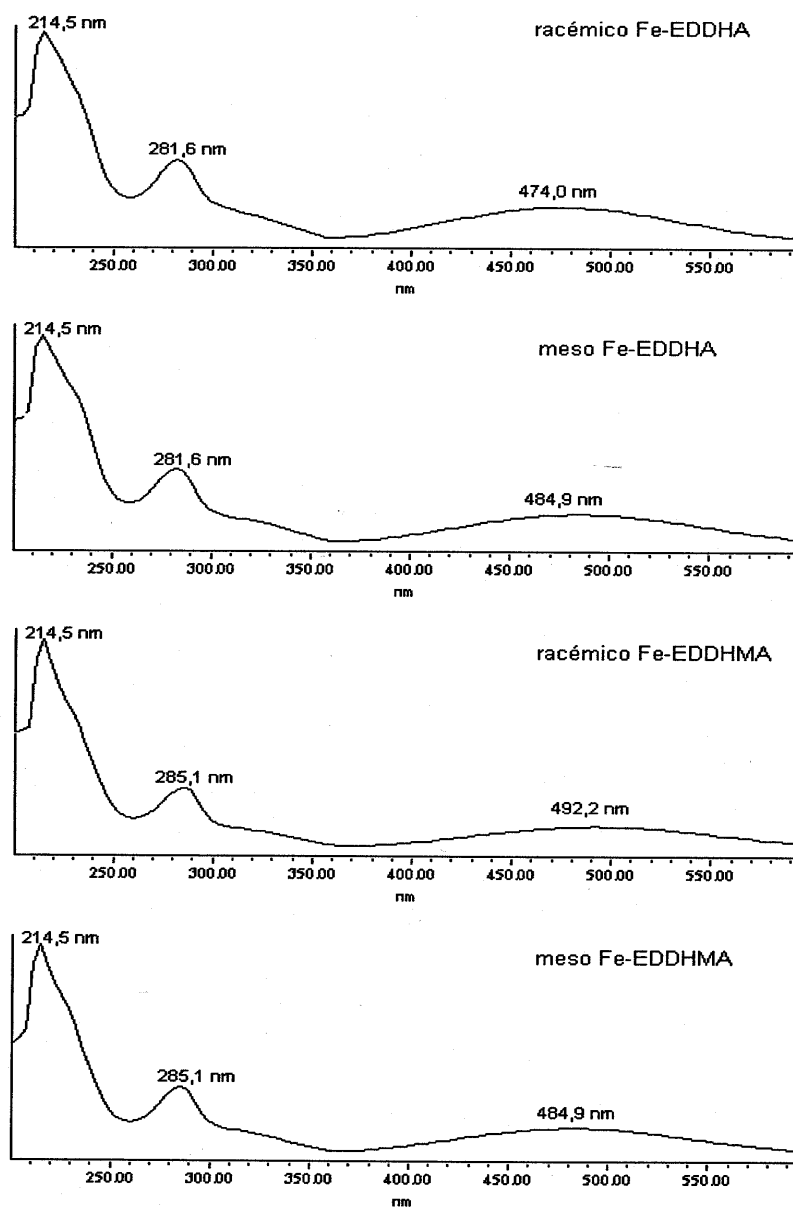


Fig.I.11. Espectros UV-Vis en el rango de 200-600 nm de los isómeros d,l-racémico y meso de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA (Álvarez-Fernández, 2000).

Según Wallace (1983), los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA son eficaces para el aporte de Fe a suelos calizos, debido a que presentan:

- Alta estabilidad a los altos valores de pH que presentan los suelos calizos, ya que son estables hasta pH 10.
- Baja capacidad de intercambio con el Ca.
- Poca fijación con la fracción arcilla del suelo.
- Baja toxicidad.

Por contra:

- Su efectividad disminuye si la concentración de carbonato cálcico es mayor del 30% (Jordá et al., 1987).
- En algunas situaciones forman quelatos de hierro tan estables que existe una competencia con las raíces de las planta por la absorción de Fe (Reid y Crowley, 1984, Lucena et al., 1987b).
- El elevado precio de los quelatos junto con el hecho de que su aplicación deba hacerse varias veces a lo largo del ciclo de cultivo, da lugar a que en muchas ocasiones su empleo no resulte económicamente rentable para el agricultor (Sanz et al., 1992).
- Los quelatos comerciales de FeEDDHA y FeEDDHMA presentan distinta efectividad debido a que:
 1. La riqueza de Fe (o-EDDHA) y de FeEDDHMA es inferior a la declarada en las etiquetas y en la mayoría de los casos, por debajo del 4% requerido por la normativa (Hernández-Apaolaza, 1997 y Hernández-Apaolaza et al., 2000; Álvarez-Fernández, 2000). En

cuanto al agente quelante, es frecuente encontrar EDDHSA y EDDHCA en lugar de EDDHA (Álvarez-Fernández, 2000).

2. Poseen una importante fracción de Fe soluble no (o-EDDHA) y no EDDHMA (superior al 2%) que no es estable a los valores de pH de los suelos calizos y cuya naturaleza y estabilidad son poco conocidas (Hernández-Apaolaza et al., 2000; Álvarez-Fernández et al., 2002).
3. En el FeEDDHA aparecen mezclas de isómeros (*orto-orto*, *para-para* y *orto-para*) que presentan distinta eficacia, incluso algunos de ellos no son capaces de remediar la clorosis férrica en plantas (Hernández-Apaolaza, 1997; Cremonini et al., 2001; Álvarez-Fernández et al., 2002).
4. Las formulaciones de FeEDDHMA presentan numerosos isómeros posicionales de la molécula EDDHMA, tales como el EDDH4,6MA, que pueden ser la causa de que los valores de FeEDDHMA declarados sean inferiores a los que en realidad presenta (Álvarez-Fernández, 2000). No obstante, cabe destacar que en general los quelatos EDDHMA, son más puros que los EDDHA (Álvarez-Fernández et al., 1997; Hernández-Apaolaza, 1997; Álvarez-Fernández, 2000).

I.4.3. Eficacia de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA.

Desde el punto de vista de la agricultura, un quelato se puede considerar eficaz siempre que pueda mantener el Fe en una forma asimilable para las plantas, durante un período de tiempo y a una concentración adecuada para cubrir las necesidades del vegetal. En consecuencia, los principales factores que van influir en la eficacia de los quelatos de hierro son los siguientes:

- Estabilidad del quelato férrico.
- Degradación del quelato férrico

- Reactividad del quelato férrico con los componentes del suelo.
- Capacidad de las plantas para tomar el Fe aportado por el quelato.

Estabilidad del quelato férrico.

Los factores que afectan a la estabilidad de los quelatos de Fe en disolución son los siguientes:

➤ **El tipo de agente quelante y de ión metálico.**

Factores como la resonancia, el tamaño del anillo, factores estéricos y cambios de basicidad son dependientes del agente quelante y más concretamente del átomo donador de electrones. En general, la estabilidad del quelato aumenta con el número de anillos formados entre la molécula de quelante y el ión metálico así, los anillos de 5 o 6 átomos son los más estables, siendo los que predominan en los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA.

Los quelatos de hierro también aumentan su estabilidad cuando el número de átomos donadores de electrones disponibles en el agente quelante para coordinarse con el Fe(III) aumenta. Cuando se trata de ligandos hexadentados, como es el caso de EDDHA y EDDHMA, la estabilidad del quelato férrico formado se incrementa con el número de grupos fenólicos disponibles para la coordinación (Ahrland et al., 1990, Álvarez-Fernández, 2000).

➤ **Condiciones del medio.**

La temperatura, la fuerza iónica, el valor de pH, el potencial rédox, la presión parcial de CO₂ y la presencia de otros iones en el medio son factores que afectan a la estabilidad del quelato.

La temperatura y la fuerza iónica.

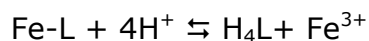
Cambios en la temperatura pueden disminuir en la estabilidad de los quelatos, ya que afectan al valor de las constantes de estabilidad y de formación de los mismos (Lindsay, 1979). En relación a la fuerza iónica, se debe prestar una especial atención cuando los quelatos férricos se empleen en fertirrigación ya que en estos sistemas, la concentración salina de las disoluciones nutritivas puede variar considerablemente afectando a la estabilidad de dichos quelatos

El valor de pH.

El pH de la disolución de suelo es uno de los factores que más puede afectar a la estabilidad de los quelatos férricos. Por este motivo, la normativa europea exige que en los envases de los quelatos comerciales se indique el rango de pH en el que se garantiza la estabilidad de dicho producto.

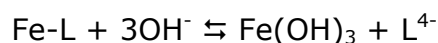
El rango de pH en el que un quelato es estable depende del tipo de agente quelante. Así, los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA lo son en un rango de 4-9 (Norwell, 1991), siendo el primero más estable en el intervalo de pH 4-6, mientras que el FeEDDHMA presenta una estabilidad superior cuando el pH del medio se encuentra entre 8-9 (Hjelte y Aminke, 1989). En consecuencia, ambos quelatos son recomendables para la corrección de la clorosis férrica en suelos calizos o disoluciones nutritivas que presenten valores altos de pH, sin embargo, su uso no es aconsejable para valores ácidos de pH (Lucena et al., 1991a).

En general, los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA se van a descomponer a valores de pH extremos. A valores de pH ácidos, el agente quelante tiende a formar su ácido, con la consiguiente descomposición del quelato.



Bermúdez et al. (1999) realizaron un estudio sobre los procesos de descomposición del FeEDDHA y FeEDDHMA a valores de pH ácido y obtuvieron que este proceso es prácticamente instantáneo y que el porcentaje de quelato descompuesto aumenta a medida que el pH disminuye en un rango de 4 a 1. De esta forma cuando el valor de pH está próximo a 1, la descomposición del quelato es superior al 90% mientras que a pH 4 (valor de pH que se encuentra dentro del rango de estabilidad de estos dos quelatos), el porcentaje de descomposición oscila entre un 2% y un 9%. Estos autores también observaron para un rango de pH entre 1 y 2, el quelato FeDDHMA se descompone más que el FeEDDHA mientras que en el intervalo de pH 3-4, ocurre el efecto contrario. Es de señalar que para valores de pH en torno a 1, el porcentaje de descomposición se ve influenciado por la concentración de quelato en disolución, a mayor concentración menor descomposición. En definitiva, los porcentajes de quelato descompuesto dependen del pH, del tipo de agente quelante y de la concentración de quelato presente en el medio.

A valores alcalinos de pH, la fuerte competencia de los iones OH^- con los agentes quelantes por el Fe^{3+} , da lugar a la formación de hidróxidos férricos insolubles, quedando el quelante libre en la disolución (Lucena, 1986).



Potencial rédox.

Dado que el Fe presenta dos estados de oxidación (Fe^{3+} y Fe^{2+}), los quelatos férricos se ven afectados por el potencial rédox. Si las condiciones del medio son normales, es decir, existe una buena aireación, la forma predominante del hierro presente en el suelo es Fe^{3+} , siendo este el estado

de oxidación con el que los agentes quelatos EDDHA y EDDHMA son capaces de formar quelatos estables (Lehman, 1963).

Presión parcial de CO₂.

Los suelos calizos contienen gran cantidad de Ca²⁺ que puede competir con el hierro por el agente quelante, por tanto, aquellos factores que afecten a la solubilidad del CaCO₃ (pH y presión parcial de CO₂), afectarán a la estabilidad de los quelatos férricos. Según Lucena et al. (1987a), en suelos calizos en los que estén presentes quelatos férricos se produce la siguiente reacción:



De esta ecuación se deduce que incrementos en la presión parcial de CO₂ hacen que el Ca²⁺ precipite como CaCO₃ y por tanto, que se reduzca la competencia entre el Fe y el Ca por el agente quelante, aumentando la concentración de Fe quelado en el medio.

Del mismo modo, un aumento en la concentración de CO₂ en el suelo provoca una disminución del pH del medio. En el caso de suelos calizos (con valores de pH en torno a 8) este hecho resulta satisfactorio, ya que incrementa la estabilidad de los quelatos férricos.

Presencia de otros iones interferentes.

Cuando los quelatos de hierro se encuentran presentes en disoluciones nutritivas o son aplicados al suelo, tanto el agente quelante como el Fe pueden sufrir la competencia de otros aniones y metales presentes en la disolución. Por tanto, es necesario considerar no sólo la constante de estabilidad del quelato férrico, si no también las constantes de formación de los posibles quelatos de los iones competidores presentes en la disolución del suelo (Tabla.I.3), así como el intervalo de pH para el cual

son estables y las concentraciones relativas de cada uno de estos iones (Lucena,1986).

Tabla.I.3. Constantes de formación de los quelatos EDDHA de los iones presentes en la disolución (Norwell, 1991).

M= metal L= EDDHA	Log Constante de Formación						
	Equilibrio	Ca	Mg	Fe(III)	Cu	Mn	Ni
M+L ⇌ ML	8'2	9'0	35'4	25'0	--	20'7	17'8
M+L+H ⇌ MHL	17'7	18'2	--	33'2	--	28'5	25'8
M+L+2H ⇌ MH ₂ L	25'1	26'3	--	38'4	--	34'8	32'7

De esta forma se ha observado que la presencia de iones fosfato en el medio produce competencias con el agente quelante por el Fe³⁺, lo que provoca la descomposición del quelato y la consiguiente formación de fosfatos de hierro insolubles (Tong et al., 1986).

A pesar de que autores como Nabahn et al. (1977) afirman que los cationes Ca y Mg pueden desplazar al Fe del quelato, Jordá (1990) encontró que tras la interacción del FeEDDHA con CaCO₃, el Fe³⁺ no era desplazado del quelato por el Ca²⁺.

Tanto Halvorson y Lindsay (1972) como Tong et al. (1986) observaron que la presencia de iones Cu, Mn y Zn en las disoluciones nutritivas, afecta en mayor o menor medida a la estabilidad del FeEDDHA, ya que estos cationes son capaces de desplazar al Fe³⁺ del quelato, produciendo la formación de los quelatos de estos micronutrientes y la consiguiente precipitación del Fe³⁺ en forma de óxidos de hierro hidratados.

Lucena et al. (1987b) estudiaron cómo variaba la composición de la disolución de un suelo calizo al que se había añadido FeEDDHA, observando que la concentración de Cu en dicha disolución había aumentado

ligeramente mientras que la del quelato férrico había disminuido. Estos autores atribuyeron este comportamiento al hecho de que el Cu podría haber desplazado al Fe del quelato, provocando la precipitación de este nutriente y la formación del CuEDDHA. Resultados similares fueron obtenidos por Álvarez-Fernández et al. (1997), Hernández-Apaolaza (1997) y Álvarez-Fernández et al. (2002) cuando adicionaron al suelo quelatos comerciales de Fe-EDDHA y Fe-EDDHMA.

Por otro lado, en fertirrigación la preparación de la disolución madre y la posterior adición a las aguas de riego puede provocar variaciones de pH que den lugar a procesos de descomposición-recomposición de los quelatos presentes en esta disolución. Bermúdez et al. (1999) realizaron una serie de ensayos sobre el efecto que tenían sobre los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA, el que se produjeran estos procesos de descomposición-recomposición en presencia de otros nutrientes, obteniendo que:

- Los iones Ca, Mg, Cu y Zn no afectan al comportamiento de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA en el proceso de descomposición. Por el contrario, el ión fosfato aumenta la descomposición del FeEDDHMA a pH 4.
- En cuanto a la recomposición, la presencia de Ca, Mg, Cu, Mn, Ni y Zn en el medio, da lugar a que el porcentaje de quelato recuperado se reduzca, siendo esta pérdida mayor a pH 7 que a pH 4. En contraste, la presencia del ión fosfato reduce las pérdidas de quelato a medida que aumenta el pH de la disolución.
- El ión Cu es el que más afecta al proceso de recomposición de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA.
- De los dos quelatos en estudio, el que sufre mayores pérdidas por la recomposición en presencia de otros iones competidores es el FeEDDHA, para todos los valores de pH estudiados.

- Estos autores definen una relación entre la concentración del ión y la concentración de quelato a la que denominan NQ ($[\text{i3n}]/[\text{Q}]$) y afirman que el efecto de recuperación del quelato tras los procesos de descomposición-recomposición dependerá del valor que alcance esta relación. Así, a medida que la concentración de FeEDDHA o FeEDDHMA aumenta en la disolución, el efecto negativo que los iones competidores provocan en la recomposición del quelato disminuye, necesitándose concentraciones elevadas de estos iones para que se vea afectada la estabilidad de dichos quelatos.

Degradación de los quelatos férricos.

La degradación de los quelatos sintéticos afecta fundamentalmente a la parte orgánica de la molécula (agente quelante) y se debe a la acción de la población microbiana del suelo (biodegradación) y de la luz (fotodegradación).

➤ **Biodegradación.**

La biodegradación se produce en el suelo y afecta al agente quelante ya que disminuye su efectividad como transportador de metales en el suelo. Los factores que influyen en la magnitud y velocidad de la degradación son (Norwell, 1991):

- Resistencia del agente quelante a ser biodegradado
- Concentración del agente quelante
- Metales a los que se encuentra asociado el agente quelante
- Presencia de una adecuada población microbiana
- Temperatura
- Aireación

Los quelatos una vez adicionados al suelo, permanecen durante varias semanas en disolución, esto hace pensar que la degradación de los distintos agentes quelantes no es muy rápida (Hill-Cottingham y Lloyd-Jones, 1957 y 1958; Norwell y Lindsay, 1969), aunque la información existente es muy limitada para quelatos poliaminocarboxílicos, tales como FeEDDHA y FeEDDHMA.

➤ **Fotodegradación.**

La fotodegradación afecta a los quelatos en disolución, por lo que su efecto suele ser mayor en cultivos hidropónicos y en aguas superficiales que reciben aguas del lavado de zonas agrícolas e industriales, que en los suelos.

Los agentes quelantes que contienen grupos ácidos carboxílicos en su estructura son objeto de fotodegradación cuando éstos se unen al Fe(III) y a otros metales.

La fotorreducción de los quelatos metálicos depende en gran medida del metal quelado, siendo los quelatos de Fe(III) los más fotorreactivos.

Schröder (1964) estudió la fotodegradación del FeEDDHA encontrando que cuando el quelato era sometido a la luz solar directa, su espectro UV-Vis presentaba un máximo de absorbancia alrededor de 300 nm, que está relacionado con la absorción de las quinonas coloreadas que se forman al oxidarse el agente quelante por el efecto de la luz solar. Hernández-Apaolaza (1997) tras exponer diversos productos comerciales de FeEDDHA y FeEDDHMA a la luz solar observó un aumento en la absorbancia a 300 nm y un descenso en la absorbancia a 480 nm (absorbancia que está relacionada con el enlace Fe-fenol). Esta autora propone que la fotodescomposición de estos quelatos férricos se produce por oxidación del agente quelante, ya que la adición de H₂O₂ a las disoluciones de quelatos, produce un aumento en la absorbancia a 300 nm tras 24 horas.

Cada vez que se produce la fotorreducción, el agente quelante se va descomponiendo gradualmente, apareciendo un depósito de hidróxido férrico y perdiendo color progresivamente. Hernández-Apaolaza (1997) expuso a la luz del sol disoluciones de quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA, y obtuvo que todos los quelatos, independientemente de que se tratase de productos EDDHA o EDDHMA, sufrían una pérdida progresiva del color, pudiendo llegar a la total decoloración, si la exposición fuese más prolongada.

Por esta razón, se recomienda que la manipulación de los quelatos se realice evitando la exposición a la luz, y que cuando sean aplicados al suelo se entierren o mezclen con el mismo, en lugar de aplicarlos sobre la superficie.

➤ **Degradación de los quelatos frente al tiempo.**

El tiempo es otro de los factores que puede afectar a la estabilidad de los quelatos, si bien, estudios llevados a cabo muestran que las pérdidas de hierro en los quelatos almacenados durante un cierto período de tiempo sólo ocurren en productos en disolución mientras que los sólidos no parecen verse afectados. Hernández-Apaolaza (1997) realizó estudios con quelatos comerciales sólidos almacenados durante 25 años y tras medir la concentración de hierro total y hierro quelado, obtuvo que estos productos mantenían las características que se indicaban en la etiqueta, por lo que no es necesario incluir en el etiquetado de los productos sólidos, una fecha de caducidad.

Cuando se analiza el comportamiento de los quelatos FeEDDHA en disolución, Lucena (1986) observa que las pérdidas de hierro que sufren estos quelatos únicamente son atribuibles a la fracción de Fe no (o-EDDHA) que los productos comerciales presentan en su formulación. Del mismo modo, Manzanares (1991) llevó a cabo estudios en los que distintas disoluciones de FeEDDHA eran almacenadas en oscuridad durante 20 días.

En todas ellas sólo se produjeron pérdidas de hierro total. Por el contrario, Álvarez-Fernández (2000) encuentra que la estabilidad de diferentes quelatos FeEDDHA comerciales en disolución acuosa tras un año y medio de almacenamiento en oscuridad y a 30°C de temperatura, es del 100% tanto para Fe (o-EDDHA) como para el no (o-EDDHA).

En relación al FeEDDHMA señalar que a diferencia de lo estudiado para el FeEDDHA, algunos productos comerciales no son capaces de mantener el FeEDDHMA con el transcurso del tiempo, de forma que tras 120 días de almacenamiento, las pérdidas son superiores al 80% (Álvarez-Fernández, 2000). Por el contrario, el contenido de Fe no (EDDHMA) en estos mismos productos permanece constante, indicando que una vez descompuesto el FeEDDHMA, el Fe permanece en disolución y no precipita en forma de óxido férrico (Álvarez-Fernández, 2000).

Interacción con los materiales del suelo.

Normalmente, cuando los quelatos de Fe entran en contacto con los distintos materiales que constituyen la fase sólida del suelo, suelen producirse reacciones de adsorción y/o de desplazamiento tanto del Fe como del agente quelante por los diferentes iones metálicos presentes en el medio. Una vez se hayan producido estas reacciones, la efectividad del quelato se verá modificada incluso llegando a perderla por completo. Este fenómeno fue detectado en los años 50 por Stewart y Leonard (1954) y Wallace et al. (1955).

La pérdida de la efectividad del quelato por los procesos anteriormente citados y la extensión en la que se produzca, depende de factores tales como (Wallace et al., 1955; Lunt et al., 1956; Hill-Cottingham y Lloyd-Jones, 1957 y 1958; Juárez, 1983; Norwell, 1991):

- Tipo de suelo o sustrato.
- Tipo de agente quelante.

- Tiempo de interacción entre el quelato y el sustrato.
- Concentración del quelato.
- Tipo de ión metálico al que se encuentra unido el agente quelante.
- Temperatura.
- pH.
- Tipo de material con el que esté en contacto.

Wallace et al. (1955), y Norwell (1991) observaron que cuando se adicionan quelatos férricos de EDTA, DTPA, HEDTA, EDDHA o CTDA a diferentes suelos, se producían pérdidas tanto de hierro como de agente quelante. Estas pérdidas dependían del tipo de agente quelate, de forma que oscilaban entre el 7 y 30%. Estos autores destacan que el FeEDDHA es el quelato férrico que sufre una menor adsorción sobre la superficie del suelo. Por otro lado, cuando estos mismos quelatos interaccionan con un suelo arcilloso moderadamente ácido, las pérdidas son superiores a las de los suelos calizos (0-51%), siendo de nuevo el FeEDDHA el menos retenido. Hill-Cottingham y Lloyd-Jones (1957 y 1958) estudiaron la interacción de FeEDTA, FeDTPA, FeEDDHA, FeHEDTA y FeCTDA con suelos calizos durante 30 días, encontrando que la adsorción de los agentes quelantes se produce preferentemente durante el primer día, y que las pérdidas oscilan entre un 10 y un 75 % del total, siendo el EDDHA el que se ha visto menos afectado; datos que confirman los resultados obtenidos por Wallace et al. (1955) y posteriormente por Norwell (1991).

Hernández-Apaolaza (1997) realizó interacciones de productos comerciales de FeEDDHA y FeEDDHMA con distintos suelos calizos obteniendo que la retención de Fe quelado en estos suelos es casi despreciable. Sin embargo, para todos los compuestos ensayados, independientemente del tipo de quelato, se producen pérdidas de hasta un 70% del Fe no (o-EDDHA/MA) que estos productos comerciales contienen en su formulación. Resultados que han sido corroborados por Álvarez-Fernández et al. (2002) y Cantera et al. (2002) para estos dos quelatos y para el FeEDDHSA.

Hill-Cotigham y Lloyd-Jones (1957, 1958) y Sánchez-Andréu et al. (1991) comprobaron que la cantidad de quelato adsorbida sobre un suelo es proporcional a la concentración de quelato presente en el mismo de forma que la retención de los quelatos FeEDDHA se incrementa a medida que la concentración de este compuesto aumenta en el medio.

Por otro lado, cuando se realizan interacciones de quelatos con distintos suelos calizos se observa que la disminución de la concentración de quelato también depende del metal al que esté unido el agente quelante. Así, las pérdidas de EDDHA son elevadas cuando está unido a Zn o Mn, mientras que cuando lo está al Fe, son prácticamente despreciables (Wallace y Lunt, 1956; Alboulroos, 1981, Alboulroos et al., 1983).

El efecto de la temperatura sobre la interacción entre los quelatos y los materiales del suelo ha sido estudiado por distintos autores. Juárez (1983) comprobó que la temperatura no parecía influir en la absorción de EDTA sobre montmorillonita sódica y magnésica, aunque el aumento de temperatura podía favorecer la liberación de moléculas de agua retenidas en la arcilla que serían reemplazadas por el agente quelante. Álvarez-Fernández et al. (1997) observaron que la temperatura no afecta al proceso de adsorción de los quelatos FeEDTA, FeEDDHA y FeEDDHMA sobre hidróxido de hierro amorfo, turba ácida, carbonato cálcico y montorillonita-Ca.

Las variaciones de pH también pueden influir en los procesos de adsorción de los quelatos sobre las superficies de carga variable del suelo. Éste es el caso de los óxidos e hidróxidos, los cuales, a valores de pH bajos presentan una carga positiva mientras que a valores de pH altos, la carga es negativa. Esto provoca que como los quelatos poseen una carga superficial negativa, su retención sobre la superficie de los óxidos sea mayor a medida que disminuya el pH, es decir, cuando más positiva sea la carga neta de la superficie del óxido. Hernández-Apaolaza et al. (2001) muestran que la adsorción de FeEDDHA y FeEDDHMA sobre ferrihidrita es

total hasta pH 8 y que a partir de ese valor de pH, la retención disminuye. Esto es debido a que ese valor de pH coincide con el punto isoeléctrico del óxido por lo que para valores de pH mayores a 8, el material se cargaría negativamente y la adsorción del agente quelate sobre el mismo sería nula. Lo mismo ocurre con la interacción de FeEDDHA y FeEDDHMA sobre óxidos de manganeso amorfos en los que la adsorción es total hasta pH 7 y a partir de este valor de pH, disminuye (Hernández-Apaolaza, 1997).

La naturaleza de los distintos materiales que constituyen un suelo va a tener una gran influencia en las reacciones de adsorción y/o desplazamiento del Fe del quelato y por tanto, en la eficacia del mismo a la hora de aportar hierro a la planta. Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios en los que se ha tratado de determinar el comportamiento del quelato en el suelo y que materiales edáficos son los más reactivos (Sánchez-Andréu et al., 1991; Norwell, 1991; Álvarez-Fernández, 1995; Hernández-Apaolaza et al., 2001; Álvarez-Hernández et al., 2002). A continuación se describe la reactividad de diferentes quelatos de hierro frente a cada uno de estos materiales por separado.

➤ **Silicatos.**

Los silicatos se caracterizan por su capacidad de intercambio iónico y su gran superficie específica que puede dar lugar a que los quelatos sufran reacciones de retención superficiales provocando que su eficacia como aporte de Fe a las plantas disminuya. En el caso de la montmorillonita-Ca, también se ha de tener en cuenta que el Ca^{2+} presente en el medio, puede competir con el Fe por el agente quelante, produciéndose la descomposición del quelato férrico.

Hay estudios que ponen de manifiesto la adsorción de los quelatos sobre estos materiales (Wallace y Lunt, 1956 y Lunt et al., 1956). Sin embargo, Norwell (1991) discute la capacidad de adsorción de los quelatos sobre los silicatos, dado que los primeros suelen ser aniones y los silicatos

suelen tener una carga superficial negativa. Sin embargo, Wallace et al. (1983) plantean tres posibles mecanismos por los que los quelatos pueden quedar retenidos en la superficie de los silicatos:

1. A pesar de que el quelato presenta una carga neta negativa, puede comportarse como un dipolo en el que la parte positiva sería atraída hacia la superficie del silicato cargado negativamente.
2. El quelato puede sufrir una hidrólisis parcial con los grupos $-O^-$ de los silicatos participando en la coordinación del metal.
3. Un metal situado en el borde de una partícula del suelo puede sustituir al Fe^{3+} del quelato.

Estudios realizados por Hernández-Apaolaza et al. (2001) ponen de manifiesto que la interacción de varios quelatos comerciales de FeEDDHA y FeEDDHMA con montmorillonita-Ca, provoca la adsorción de ambos quelatos sobre este material, siendo la retención de FeEDDHA superior a la de FeEDDHMA. Para los dos quelatos en estudio, las pérdidas de Fe quelado corresponden al isómero de menor estabilidad (el isómero d,l-racémico para el FeEDDHMA y el meso para el FeEDDHA). Por el contrario, Álvarez-Fernández et al. (2002) encontraron que la interacción de varios quelatos comerciales de FeEDDHA, FeEDDHMA, FeEDDHSA y FeEDDHCA con montmorillonita-Ca, no produce pérdidas significativas de Fe quelado en ninguno de los diferentes tipos de quelato con los que se ha realizado en ensayo. La diferencia de resultados entre estos autores radica en la relación adsorptivo/adsorbente presente en el medio. Así, en el ensayo realizado por Hernández-Apaolaza et al. (2001) ésta relación es el doble de la empleada en los estudios de Álvarez-Fernández et al. (2002). Por lo tanto, el efecto que produzca la montmorillonita-Ca sobre la estabilidad de los quelatos de Fe dependerá en gran medida, de la relación adsorptivo/adsorbente.

Cuando se realizan interacciones de diferentes productos comerciales de FeEDDHA y FeEDDHMA sobre illita, se observa que la adsorción de ambos quelatos es muy baja en comparación con la encontrada para la montmorillonita-Ca. Sin embargo, mientras que en el FeEDDHA las pérdidas son producidas por la retención los dos diastereoisómeros, para Fe-EDDHMA es el isómero meso el más retenido (Hernández-Apaolaza, 1997).

➤ **Óxidos e hidróxidos.**

Los óxidos e hidróxidos surgen como consecuencia de procesos de meteorización del suelo por lo que existe una gran variedad de estos compuestos. De esta forma se podrán encontrar óxidos e hidróxidos químicamente puros, bien cristalizados, hidratados, amorfos, de composición indefinida.... Los óxidos más comunes en los suelos son los de hierro, aluminio y manganeso, además de los de silicio y titanio. Los tres primeros aunque no se encuentran en grandes cantidades, presentan una gran superficie específica por lo que tienen una alta capacidad para retener metales y controlar la disponibilidad de los mismos en la disolución del suelo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la carga superficial de los óxidos e hidróxidos es variable con el pH, siendo positiva para valores de pH bajos y negativa a valores de pH altos. Estos cambios en la carga son debidos a la adsorción de H^+ y OH^- , y varía dependiendo de la concentración de dichos iones en disolución y en consecuencia, con el pH del medio. El pH en el que la carga neta de la superficie es cero se denomina punto cero de carga o punto isoeléctrico. A valores por debajo del punto isoeléctrico, los óxidos e hidróxidos son capaces de adsorber aniones, tales como los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA (Chang et al., 1983). Mientras que por encima del punto isoeléctrico, pueden adsorber cationes. En ambos casos, los iones podrán ser retenidos sobre la superficie o ser incorporados dentro de la estructura de los óxidos (Schwertmann y Taylor, 1989).

En estudios realizados por Hernández-Apaolaza (1997) en los que se llevaron a cabo interacciones de quelatos comerciales de FeEDDHA y de FeEDDHMA con ferrihidrita (óxido de hierro), óxido de manganeso, hidróxisulfato de aluminio, hidroxisulfato de cinc y tenorita (óxido de cobre) se obtuvieron los siguientes resultados:

- La ferrihidrita es la que tiene una mayor interacción con los quelatos, produciendo un descenso considerable de la concentración de Fe quelado en la disolución. La adsorción de FeEDDHA es menor que la de FeEDDHMA. En cuanto a los isómeros, el más retenido es el que presenta una menor constante de estabilidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Álvarez-Fernández et al. (2002) para este mismo sustrato.
- En el caso de hidroxisulfato de aluminio, la retención del quelato es escasa. Los únicos valores que parecen verse afectados son los de Fe no quelado, pero quizás las pérdidas no sean debidas a un proceso de adsorción, si no un proceso de precipitación.
- La interacción de los quelatos FeEDDHA con óxido de manganeso, produce pérdidas tanto de Fe (o-EDDHA) como de Fe no (o-EDDHA), reteniéndose predominantemente el isómero meso. Por el contrario, los quelatos FeEDDHMA presentan únicamente pérdidas de Fe no (EDDHMA).
- Los resultados obtenidos de la interacción de los quelatos con hidroxisulfato de cinc y tenorita, parecen indicar que las importantes pérdidas de quelato son consecuencia de un desplazamiento del Fe por el Zn y el Cu, en lugar de un proceso de retención superficial. En ambos casos, las pérdidas de Fe no quelado son mínimas lo que es indicativo de que una vez descompuesto el quelato, el Fe permanece en disolución.

➤ Carbonato cálcico.

En los suelos donde suelen aparecer los problemas de clorosis férrica las concentraciones de CaCO_3 son elevadas. La presencia de este compuesto va a provocar un considerable aumento del pH así como elevadas concentraciones de Ca^{2+} del medio. Ciertos autores como Dyanad y Sinha (1979) y Loeppert (1986) afirman que la principal razón por la que el Fe soluble desaparece de la disolución del suelo es la presencia de Ca, el cual puede desplazar al Fe del quelato de forma que, a los valores de pH del medio (7'5-8'5), este nutriente precipita en forma de óxido e hidróxido insolubles.

Por el contrario, Jordá et al. (1987) encontraron que la interacción de Fe-EDDHA comercial en suelos con un contenido en CaCO_3 que variaba entre en 40 y el 60%, producía una retención en torno al 40% del Fe quelado presente en disolución, proponiendo que el mecanismo de dicha retención consiste en la adsorción del quelato sobre la superficie del sustrato. En posteriores investigaciones, Jordá (1990) estudió el comportamiento de los quelatos FeEDDHA estándar tras la interacción con $\text{CaCO}_3\text{-SiO}_2$ encontrando que a pH 8'4 no se produce la adsorción del quelato sobre la superficie del sustrato mientras que a pH 9'6 sí lo hace. El hecho de que no se haya generado un incremento en el contenido de Ca en disolución, hace pensar que la reacción de adsorción se produce tras la hidrólisis parcial del quelato.

Por un lado, Lahav y Hocheberg (1975) observaron que no tienen lugar reacciones de adsorción ni de descomposición del quelato sobre el CaCO_3 , tanto en condiciones anaerobias como aerobias durante un período de dos meses.

Del mismo modo, Gárate y Lucena (1991) encontraron que la interacción de disoluciones de FeEDTA y FeEDDHA con dos suelos calizos

(29'7% y 1'2% de CaCO_3 respectivamente), no produce pérdidas de Fe quelado para el FeEDDHA aunque sí de Fe-EDTA.

Hernández-Apaolaza (1997) tras realizar interacciones entre CaCO_3 y distintos productos comerciales de FeEDDHA y FeEDDHMA, no encuentra una retención significativa de los isómeros de estos quelatos, ni del Fe no (o-EDDHA) y Fe no EDDHMA que estos productos comerciales presentan en su formulación, resultados que coinciden con los obtenidos por Álvarez-Fernández et al. (2002)

➤ **Constituyentes orgánicos.**

La presencia de materia orgánica en suelos puede ayudar a combatir la clorosis férrica, ya que disminuye el pH del medio (con lo que incrementa la solubilidad de los óxidos e hidróxidos de Fe), y actúa como agente quelante del hierro libre en disolución. Sin embargo, la materia orgánica también puede disminuir la estabilidad de los quelatos férricos, bien porque éstos sean adsorbidos sobre su superficie, o bien porque formen complejos con el Fe que sean más estables que los formados con los agentes quelantes.

La adsorción de los quelatos férricos sobre materia orgánica ha sido descrita por muchos autores. Así, Elgala et al. (1971) encuentran en el FeEDDHA tiene cierta capacidad para unirse a compuestos producto de la degradación de la materia orgánica.

Tras realizar interacciones de FeEDTA y FeEDDHA sobre turba ácida (pH 4'0) y turba encalada (pH 6'6), Garate y Lucena (1991) encontraron que los quelatos de FeEDTA son estables a valores ácidos de pH y sobre sustratos orgánicos mientras que los FeEDDHA no lo son.

Lucena et al. (1991b) realizaron interacciones de FeEDDHA con turba, turba encalada y enarenado durante 15 días, observando que la retención

del quelato en los primeros días de interacción era considerable en todos los casos, mientras que pasado este tiempo, la concentración de hierro recuperada se igualaba a la adicionada inicialmente, debido a que se había llegado a la saturación de los lugares de adsorción.

En interacciones de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA sobre turba se observan elevadas retenciones (Hernández-Apaolaza et al., 2001). La adsorción de FeEDDHA es mayor que la de FeEDDHMA, siendo los isómeros menos estables (meso para el FeEDDHA y d,l-racémico para el FeEDDHMA) los más retenidos. Este resultado tiene dos posibles explicaciones. La primera sería que la adsorción se realizara por una competencia entre el agente quelante y la materia orgánica por el metal. De esta forma, sería lógico que el isómero menos estable fuese el que presentara mayores tasas de adsorción. La segunda sería considerar que la adsorción se produce a través de un proceso electrostático. Así, el isómero con menor constante de formación daría quelatos menos ácidos que presentarían una mayor afinidad para ser adsorbidos por la materia orgánica (Hernández-Apaolaza, 1997)

Álvarez-Fernández et al. (2002), tras realizar interacciones de quelatos comerciales de FeEDDHA, FeEDDHMA, FeEDDHSA, FeEDDHCA sobre turba encontraron que se producen retenciones de FeEDDHA y FeEDDHMA, datos que coinciden con los obtenidos por Hernández-Apaolaza et al. (2001). Por el contrario, esta autora observa que debido al mayor carácter ácido que presentan los quelatos FeEDDHSA y FeEDDHCA su retención sobre la turba es despreciable.

Capacidad de las plantas para tomar el Fe aportado por el quelato.

A la hora de realizar la elección de un quelato férrico que sea eficaz para corregir la clorosis debemos tener en cuenta factores como la estabilidad de dicho quelato, las condiciones del medio y la reactividad con los materiales edáficos, que condicionarán su capacidad para mantener el Fe en la disolución del suelo. Sin embargo, no podemos olvidar que el tipo

de quelato a utilizar debe hacerse en función del cultivo, ya que como hemos visto en secciones anteriores, existen distintos mecanismos por los que las plantas pueden captar el Fe de la disolución en situaciones de carencia de este nutriente. Así, aunque un quelato se muestre muy eficaz para mantener el Fe en disolución, puede que no lo sea tanto a la hora de suministrar Fe a un cultivo determinado.

Es de destacar que aunque es un hecho de mostrado que las plantas pueden tomar el Fe procedente de los quelatos sintéticos, todavía no se conoce con total certeza el mecanismo por el cual tienen lugar. Lindsay y Schwab (1982) sugieren que en el caso de plantas de estrategia I, la acción de la Fe(III)-quelato reductasa turbo podría reducir el Fe (III) del quelato férrico a Fe(II). Esta reducción provocaría una desestabilización del quelato que daría lugar a su disociación, liberándose por un lado el agente quelante y por otro al Fe(II) que sería absorbido por la raíz.

Lucena et al. (1988b) indican que en plantas de estrategia I, sería aconsejable emplear un quelato férrico que fuese más estable que el correspondiente quelato ferroso, para de este forma evitar la competencia entre el agente quelante y el vegetal por el Fe^{2+} . Además, los quelatos férricos que presente una mayor afinidad por la Fe(III)-quelato reductasa turbo serán más eficaces.

Chaney (1989) trabajando con cacahuetes, estudió la cinética de reducción de varios quelatos férricos con constantes de estabilidad muy diferentes, encontrando que no existe una aparente relación entre la constante de Michaelis (K_m) y la constante de formación del quelato. Sin embargo, las V_{\max} descienden a medida que la constante de formación aumenta.

El uso de quelatos de hierro para evitar la clorosis en plantas de estrategia II es menos frecuente que en plantas de estrategia I, ya que la respuesta de las primeras ante situaciones de déficit hierro es mucho más

efectiva. Sin embargo, en el caso de que se realice la adición de dichos quelatos a este tipo de cultivos, sería conveniente que se limitase a productos de estabilidad intermedia, capaces de ceder el Fe a los fitosideróforos segregados por las raíces del vegetal (Lucena et al., 1988b).

I.5. QUELATOS NATURALES DE Fe.

Como se ha comentado en el Apartado.I.3 uno de los aditivos que se puede emplear como fuente de Fe para las plantas son los complejos naturales de Fe. De entre los diferentes compuestos que pueden actuar como agentes complejantes del Fe, nos centraremos en las sustancias húmicas las cuales tienen la ventaja de que además de su capacidad para formar complejos con este nutriente también presenta todos los beneficios que la materia orgánica puede ejercer tanto en el suelo como en el vegetal.

I.5.1. Definición y fraccionamiento de la sustancias húmicas.

Las sustancias húmicas son sustancias orgánicas que comprenden un grupo de compuestos difícilmente clasificables de color amarillo a negro, de elevado peso molecular, muy resistentes al ataque microbiano, de naturaleza coloidal y propiedades ácidas, cuya composición y estructuras son muy complejas y varían dependiendo de su origen, del método de extracción,... (MacCarthy et al., 1990; Stevenson, 1994).

Dentro de la sustancias húmicas se distinguen tres fracciones que se podrían clasificar como (Stevenson,1994):

- **Humina**, es aquella fracción que es insoluble en agua a cualquier pH.
- **Ácidos húmicos**, es aquella porción de la sustancias húmicas que es soluble en medio básico e insolubles en medios ácidos.

- **Ácidos fúlvicos**, se definen como la fracción que es soluble a cualquier valor de pH.

Estas fracciones presentan diferentes propiedades físicas y químicas. Así en la Figura.I.12, se observa que los ácidos fúlvicos tienen un menor peso molecular, mayores contenidos de oxígeno y menores de C y N, y un menor grado de polimerización que los ácidos húmicos (Calace et al., 2000). También son la fracción más ácida y con mayor C.I.C. (Stevenson, 1994) debido a que como se verá más adelante, los ácidos fúlvicos presentan un mayor contenido en grupos carboxílicos e hidroxílicos (Steelink, 1985).

Con respecto a las huminas, destacar que es la fracción menos estudiada de las sustancias húmicas y que se caracterizan por tener una menor actividad tanto química como geológica, que los ácidos húmicos y fúlvicos (Ayuso, 1995). Las húminas estarían constituidas por ácidos húmicos de alta condensación que se encuentran fuertemente unidos a la parte mineral del suelo.

1.5.2. Composición y estructura.

El estudio de la composición y de la estructura de las sustancias húmicas ha sido objeto de atención de numerosos investigadores, ya que debido a su heterogeneidad y complejidad, la obtención de fórmulas exactas presenta una gran dificultad.

El análisis elemental es uno de los métodos más usuales en la caracterización de las sustancias húmicas y proporciona información sobre el contenido de C, H, N, O, S y P en las mismas, lo que permite establecer los límites para una posible composición molecular, describir su comportamiento geoquímico y distinguir entre diferentes tipos de sustancias húmicas. En la Tabla.I.5 se muestran los intervalos más usuales de la composición elemental, aunque se ha de tener en cuenta que estos valores

se pueden ver afectados por numerosos factores como el pH, el material de partida, la vegetación, la edad del suelo e incluso por los métodos de extracción y fraccionamiento del material húmico (Stevenson, 1994).

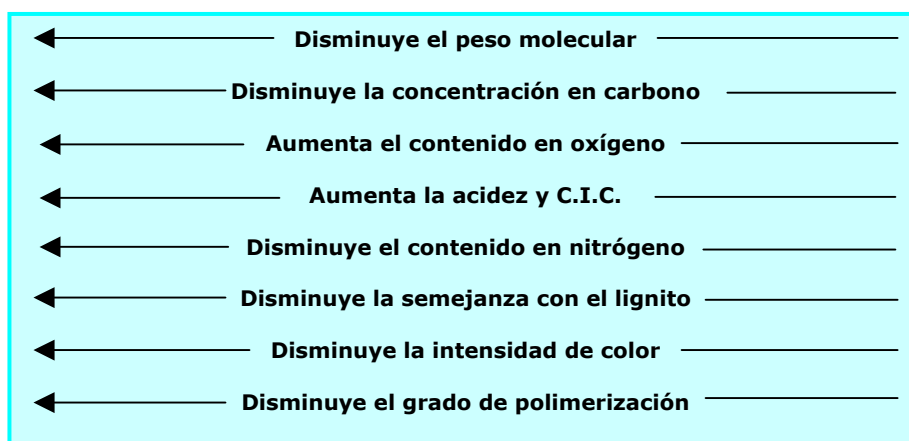
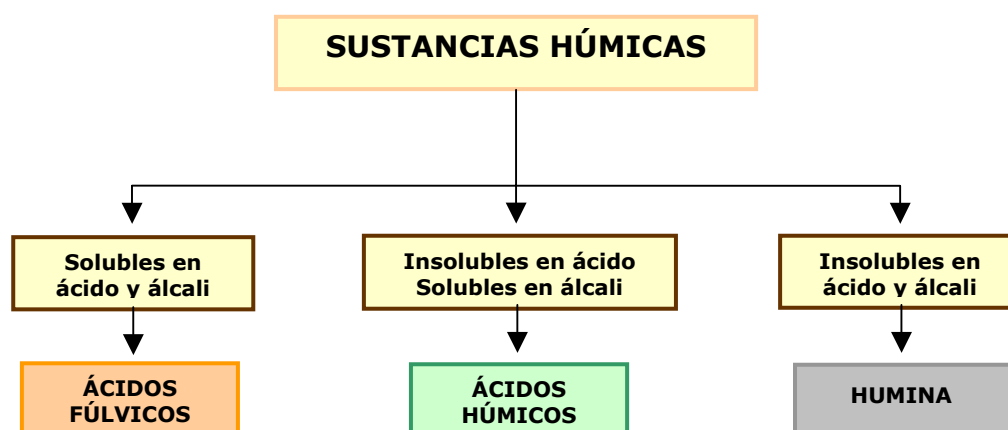


Fig.I.12. Propiedades de las sustancias húmicas (Vivas, 2001).

Tabla.I.5. Intervalos usuales para la composición elemental de las sustancias húmicas (Steelink, 1985).

Elemento	Ácidos húmicos (%)	Ácidos fúlvicos (%)
Carbono	53'8-58'7	40'7-50'6
Oxígeno	32'8-38'3	39'7-49'8
Hidrógeno	3'2-6'2	3'8-7'0
Nitrógeno	0'8-4'3	0'9-3'3
Azufre	0'1-1'5	0'1-3'6
Fósforo	0'1-1	0'1-1

Una forma de completar la información que puede aportar el análisis elemental de una sustancia húmica es mediante el cálculo de las relaciones atómicas O/C, H/C y N/C. De este modo la relación O/C para los ácidos húmicos suele ser de 0'5, mientras que en los ácidos fúlvicos este valor se centra en 0'7 (Senesi y Lofredo, 1999). Estas diferencias son índices de que en los ácidos fúlvicos el contenido de grupos funcionales oxigenados es superior al de los húmicos. Del mismo modo, la relación H/C presenta un valor aproximado de 1'0 para los ácidos húmicos y de 1'4 para los fúlvicos, lo que refleja el menor carácter alifático de los primeros (Senesi y Lofredo, 1999).

La reactividad de las sustancias húmicas, y en consecuencia los efectos que podrán causar sobre el suelo y las plantas, están en función del tipo y contenido de grupos funcionales presentes en las mismas. En la Tabla.I.6 se muestran la gran variedad de grupos funcionales que tienen las sustancias húmicas. Los más frecuentes son los grupos fenólicos, alcohólicos, quinónicos y cetónicos (Stevenson, 1994) aunque la presencia de grupos nitrogenados también está ampliamente demostrada (Varanini y Pinton, 1995).

En la Tabla.I.7 se recoge la distribución de los distintos grupos funcionales en los ácidos húmicos y fúlvicos. Como se observa, en la fracción fúlvica la cantidad de grupos de carácter ácido (-COOH y -OH) es superior a

la de la húmica (Stevenson, 1994; Schnitzer, 1990). Por el contrario, es esta última la que presenta un mayor porcentaje de uniones tipo C=O. En relación al contenido en grupos metoxilo, destacar que es muy similar para estas dos fracciones.

Tabla.I.6. Grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas (Stevenson, 1994).

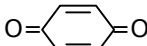
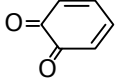
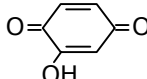
Amino	-NH ₂	Anhídrido	R-CO-O-CO-R*
Amina	R-CH ₂ -NH ₂	Imina	R-CHNH
Amida	R-CO-NH ₂	Imino	=NH
Alcohol	R-CH ₂ -OH	Éter	R-CH ₂ -O-CH ₂ -R*
Aldehído	R-CHO	Ester	R-COOR*
Carboxilo	R-COOH		
Carboxilato	R-COO ⁻		
		Quinona	
Enol	R-CH=CH-OH		
Cetona	R-CO-R*		
Ceto-ácido	R-CO-COOH	Hidroxiquinona	
Carbonilo insaturado	-CH=CH-CHO	Péptido	R-CH(NH ₂)-NH-CH(COOH)-R

Tabla.I.7. Distribución de grupos funcionales oxigenados en SH (meq/100g) (Stevenson, 1994).

Grupos funcionales	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos
Acidez total	560-890	640-1420
COOH	150-570	520-1120
OH acídicos	210-570	30-570
OH alcohólicos y débilmente ácidos	20-490	260-950
C=O cetónicos y quinónicos	10-560	120-420
OCH₃	30-80	30-120

A pesar de que a lo largo de los años se han propuesto diferentes modelos estructurales para las sustancias húmicas, ninguno de ellos ha resultado totalmente satisfactorio. Sin embargo, el desarrollo de modernas técnicas analíticas como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la resonancia de espín electrónico, la pirólisis-espectroscopía de masas, difracción de rayos X,...., junto al apoyo de la informática, han permitido obtener un conocimiento más preciso de las estructuras (Schulten, 1996; Piccolo et al., 1998; Monteil-Rivera et al., 2000; Mahieu et al., 2000). Estudios realizados por Schulten (1996) encuentran que estas estructuras se componen de una gran cantidad de anillos aromáticos unidos por largas cadenas alquílicas de diferente longitud, que dan lugar a un esqueleto flexible que puede enlazarse a otros componentes orgánicos. La unión de estos bloques estructurales daría como resultado la formación de complejas macromoléculas cuyas dimensiones podrían oscilar entre unos pocos cientos de miles de Da para los ácidos fúlvicos, hasta varios cientos de miles para los húmicos (Calace et al., 2000).

En la Fig.I.13 se muestra la conformación de un pentadecámero de un ácido húmico propuesta por Schulten (1996). En ella se puede ver que dicha estructura está formada a partir de tres unidades pentámeras de ácido húmico en la que las bolas blancas corresponden a átomos de hidrógeno, las azules a átomos de carbono, las negras a átomos de nitrógeno y las rojas a átomos de oxígeno. De esta representación se deduce que se trata de un complejo que estaría formado por 11.370 átomos, con una masa molecular de 84.607'88 g/mol y cuya composición elemental podría ser $C_{4.728}H_{5.223}N_{75}O_{1.344}$.

Como es de suponer existen algunas diferencias entre las estructuras que presentan los ácidos húmicos y los fúlvicos. En general, la fracción fúlvica tiene un menor porcentaje en aromaticidad (25% frente al 35-40% de los ácidos húmicos) y una mayor carga negativa y polaridad (Varanini y Pinton, 1995).

En resumen, se podría decir que las estructuras de las sustancias húmicas estarían formada por un esqueleto central con muchos huecos y un gran números de grupos funcionales que harían posible su interacción tanto con los componentes del suelo como con las plantas.

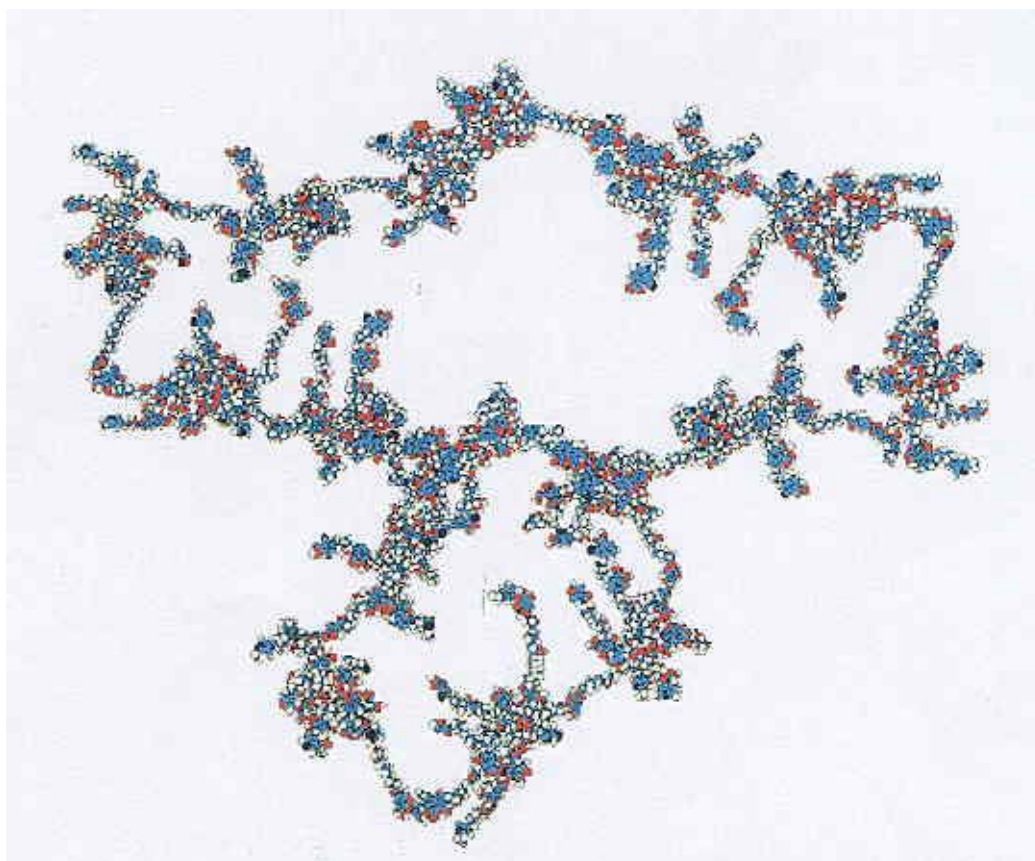


Fig.I.13 Estructura química tridimensional para un ácido húmico propuesta por Schulten (1996).

I.5.3. Efectos de las sustancias húmicas.

Son muchos los autores que han puesto de manifiesto la incidencia de la materia orgánica, y más concretamente de las sustancias húmicas, en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Chen y Aviad, 1990; Piccolo et al., 1992; Stevenson, 1994; Varanini y Pinton, 1995 y 2000; Pinton et al., 1998 y

1999; Ramos, 2000; Vivas 2001; Sánchez, 2002). En consecuencia, a las sustancias húmicas se les podrían asignar una serie de efectos que se pueden agrupar en:

- **Efectos indirectos**, influyen y modifican las propiedades físicas, químicas y biológicas que determinan la fertilidad de un suelo.
- **Efectos directos**, actúan en el vegetal con un comportamiento hormonal.

En la Tabla.I.8 se describen más detalladamente algunos de estos efectos.

Tabla.I.8. Efectos de las sustancias húmicas en el desarrollo vegetal.

Efectos Indirectos	Efectos directos
-Capacidad tampón o buffer. -Contribución a la CIC del suelo -Mejora de la estructura del suelo. -Incremento de la población microbiana. -Transformación de sustancias y elementos en el suelo. -Suministro de nutrientes.	-Aumento de la permeabilidad de las membranas celulares. -Efecto sobre los mecanismos de toma de nutrientes. -Regulación del desarrollo vegetal.

El que se puedan causar tales efectos y la extensión en la que se produzcan dependerá de la naturaleza, del peso molecular, y del contenido en grupos funcionales que presenten las distintas fracciones que componen las sustancias húmicas así como de la especie vegetal, su edad y su estado nutricional (García, 1990; Piccolo et al., 1992).

En este caso, únicamente nos centraremos en los diferentes mecanismos por los que las sustancias húmicas pueden incidir indirectamente en la nutrición vegetal, es decir, en aquellos que modifiquen

las propiedades del suelo. Sin embargo, antes de detallar de forma más exhaustiva el papel de las sustancias húmicas en la fertilidad de un suelo, es conveniente señalar que para que se produzcan tales efectos, en la mayoría de los casos, es necesario el aporte de grandes cantidades de estos productos.

Capacidad tampón o buffer.

Como se ha visto en la sección anterior, los ácidos húmicos y fúlvicos son compuestos que presentan un carácter de polielectrolito y que poseen un gran número de grupos carboxilo e hidroxilo que pueden sufrir procesos de disociación-asociación. Este hecho dará lugar a que dichos compuestos puedan regular el pH de los suelos con un contenido adecuado en sustancias húmicas, impidiendo que se produzcan cambios bruscos del mismo (Stevenson, 1994; Barón et al., 1995).

Aunque no se conoce con exactitud cual es la contribución exacta de las sustancias húmicas a la capacidad tampón total de un suelo, se estima que puede ser considerable.

Contribución a la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) del suelo.

La importancia de esta propiedad en la fertilidad del suelo, radica en que permite retener numerosos nutrientes (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) en una forma fácilmente disponible para las plantas y evitando las pérdidas por lavado.

La posibilidad de ionización de ciertos grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas tales como COOH, OH fenólicos y alcohólicos, imidas, etc, provocan que entre el 25 y el 90% de la CIC de un suelo dependa del contenido de materia orgánica del mismo. Aunque, se ha de

tener en cuenta que como la cantidad de M.O. aumenta con el contenido de arcilla, la CIC no puede ser atribuida exclusivamente al efecto de la M.O.

La CIC se incrementa con el grado de humificación de los materiales y con el pH del suelo, ya que a medida que aumenta el valor de pH también lo hace la ionización de los grupos funcionales ácidos (Stevenson, 1994). Por lo general, los ácidos húmicos adsorben cationes polivalentes y para iones con igual valencia, los menos hidratados serán los que presenten una mayor energía de adsorción (Stevenson, 1994).

Mejora de la estructura del suelo.

La presencia de materia orgánica en un suelo va a influir en la obtención de una estructura desarrollada y estable, ya que favorece la formación y estabilización de los agregados en el suelo, lo que supondrá un incremento en la capacidad de retención de agua y una buena aireación del mismo y por tanto, que el medio sea más idóneo para el crecimiento de las plantas (Ibarra et al., 1979; Fortún et al., 1989; Canarutto et al., 1996; Piccolo y Mirabella, 1997).

Incremento de la población microbiana.

Las sustancias húmicas presentes en el suelo van a actuar como fuente de energía de la población microbiana del suelo, incrementado tanto el número de microorganismos como la actividad de los mismos (Murzakow, 1988; Lizarazo, 2001). Este hecho favorece una serie de procesos tales como la mineralización y humificación de los materiales orgánicos, la fijación biológica del nitrógeno, la hidrólisis de esteres fosfatos, la reducción de elementos como el Fe, etc., que contribuirán en una mayor disponibilidad de nutrientes para el vegetal y en una mejora de las condiciones físicas del suelo.

Transformación de sustancias y elementos del suelo.

Las sustancias húmicas son capaces de formar radicales oxigenados muy oxidantes (superóxido, hidrogenosuperóxido) especialmente a través de sus radicales quinónicos y semiquinónicos (Jurcsik, 1994) (Fig.I.14).

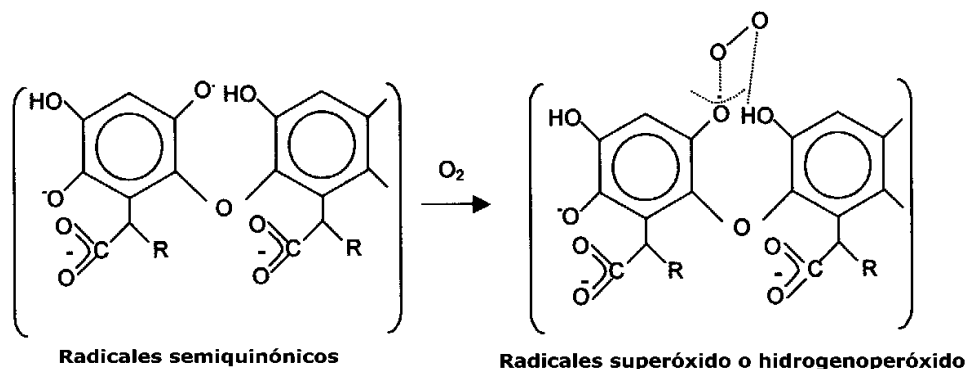


Fig.I.14. Formación de radicales oxigenados por las sustancias húmicas (Jurcsik, 1994).

Estos oxidantes pueden actuar de dos formas, por un lado pueden transformar sustancias orgánicas como los fitosanitarios, lo que afectará a su bioactividad, persistencia y biodegradabilidad (Chen et al., 1990; Genevini et al., 1994; Senesi y Lofredo, 1994) y por otro lado, puede provocar la reducción de metales. Así, se ha observado que aquellas bacterias anaeróbicas que no pueden reducir directamente el Fe (III), transfieren electrones a otros mediadores externos tales como los ácidos húmicos que actúan como catalizadores químicos de la reducción biológica de este ión e incluso de formas oxidadas de manganeso (Sunda y Kieber, 1994). Del mismo modo, Lovely et al. (1998) han encontrado que los grupos quinónicos de los ácidos húmicos de bajo peso molecular pueden actuar como transportadores de electrones entre las reacciones parciales biológicas y químicas (oxidación del sustrato y reducción del hierro), favoreciendo la reducción de Fe(III) por bacterias reductoras de hierro.

Suministro de nutrientes.

Las sustancias húmicas pueden incidir en el contenido de nutrientes disponibles para el vegetal de dos formas:

➤ **Mineralización de compuestos orgánicos.**

Mediante el proceso de mineralización microbiana que la materia orgánica sufre en el suelo, se liberan al medio diferentes elementos minerales tales como N, P y S (Akinremi et al., 2000).



Fig.I.15. Esquema de la transformación de la materia orgánica de un suelo.

Akinremi et al. (2000) observaron que la adición de sustancias húmicas al suelo producía mejoras en los niveles foliares de N, P en cultivos de trigo, judías y en el nivel de S en cultivos de nabos. Del mismo modo, Barón et al. (1995) también encontraron que la adición de sustancias húmicas provocaba un estímulo en la absorción de N y P en plantas de trigo cv. *Cajame*, que se reflejaba tanto en los análisis foliares como en los del grano. En consecuencia, estos resultados deben ser producidos por una combinación de los efectos indirectos que incrementan la disponibilidad de estos nutrientes en la disolución del suelo así como, de los efectos directos que las sustancias húmicas producen en las plantas, aumentando la capacidad de absorción de dichos elementos por las mismas (Akinremi et al., 2000).

En relación al P, Juárez y Sánchez-Andréu (1996) indican que la liberación de fosfato durante el proceso de mineralización de las sustancias

húmicas, da lugar a un abastecimiento continuo de P, con una mínima exposición a los distintos mecanismos de retención en suelo.

➤ **Formación de complejos o quelatos.**

Uno de los factores por los que las sustancias húmicas pueden influir en la fertilidad del suelo es por su capacidad para formar complejos con algunos cationes polivalentes tales como Cu, Mn, Zn, Fe, Ca, ... (Brun et al., 1994; Stevenson, 1994; Sánchez-Andréu et al., 2000). La formación de estos complejos órgano-metálicos tiene algunos efectos de gran interés:

- Incrementa la solubilidad de los metales en el suelo. Este hecho facilita los procesos de meteorización de los constituyentes del suelo, incidiendo en la mayor disponibilidad de nutrientes para la planta (Albuzio et al., 1994; Varanini y Pinton, 1995; Pinton et al., 1998; Cesco et al., 2000; Varanini y Pinton, 2000) y en los procesos de desarrollo y evolución de los suelos.
- En ciertas condiciones reducen los contenidos de determinados elementos hasta niveles no tóxicos. Esto se produce cuando los complejos flocculan o cuando la retención se produce sobre superficies orgánicas. Este hecho resulta de gran interés en el caso de suelos contaminados por metales tóxicos tales como Pb y/o Cd (Wang et al., 1997).

La capacidad de las sustancias húmicas para formar complejos con cationes polivalentes se debe a su alto contenido en grupos funcionales oxigenados y nitrogenados, que contienen pares de electrones sin compartir que les permiten establecer varias uniones entre el ión metálico y la molécula orgánica (Chen, 1996). La facilidad de estas sustancias para formar dichos complejos así como la estabilidad y solubilidad de los mismos, dependerá del contenido en grupos funcionales y del tamaño molecular de las distintas fracciones implicadas (Linehan, 1985).

Como ya se ha mencionado antes, los ácidos fúlvicos presentan un menor peso molecular y un mayor contenido de grupos ácidos que los ácidos húmicos, lo que les permite formar complejos solubles. Así, Cesco et al. (2000) establecen que la adición de sustancias húmicas de bajo peso molecular a diferentes tipos de suelos (vertisol, alfisol y leptosol) provoca la solubilización de cantidades importantes de Fe en los mismos. Estos autores indican que en el caso del alfisol, la aplicación de las sustancias húmicas en una concentración de 1'7 mmol de C/L aportan unos resultados comparables a los que se obtendrían si se adicionasen 100 μ M de DTPA. Para los otros dos suelos en estudio, la adición de sustancias húmicas parece ser más eficaz que los quelantes sintéticos a la hora de solubilizar Fe del medio. Por otro lado, Pandeya et al. (1998) observaron que la adición de Fe-fulvatos al suelo incrementaba el coeficiente de difusión del este nutriente a través de dicho suelo, confirmando que estos complejos podrán desplazarse con relativa facilidad hacia la zona de la rizosfera y actuar como fuente de Fe para las plantas. Por el contrario, los ácidos húmicos por su elevado peso molecular formarán complejos más insolubles que podrán actuar como una reserva de Fe fácilmente disponible para los agentes quelantes presentes en el suelo tales como sideróforos y fitosideróforos (Stevenson, 1994), impidiendo la hidrólisis del Fe y por tanto su precipitación como óxidos e hidróxidos insolubles, sobre todo en el caso de medios alcalinos (Varanini y Pinton, 2000).

Lucena y De la Torre (1994) desarrollaron un modelo matemático que describe la capacidad de los ácidos fúlvicos para formar complejos con los iones metálicos para diferentes relaciones entre las concentraciones metal/ácido fúlvico en un amplio rango de pH. Según este modelo, los ácidos fúlvicos presentan una gran capacidad para la formación de complejos cuando la relación metal/ácido fúlvico es pequeña, mientras que cuando esta relación aumenta, la capacidad de formación de estos complejos disminuye.

Si se considera un mecanismo de transporte de metales desde la fase sólida del suelo hacia las raíces similar al propuesto por Lindsay y Schwab (1982) para los quelatos sintéticos, los ácidos fúlvicos podrían actuar de manera similar. Cuando los ácidos fúlvicos se aproximan a la fase sólida del suelo, si la relación de concentraciones metal/ácido fúlvico es pequeña, las moléculas movilizan el Fe desde la fase sólida formando complejos solubles con el ión metálico. Este complejo se transportaría por difusión hasta la rizosfera donde el Fe podría ser reducido y tomado por las plantas, disminuyendo o eliminando los posibles síntomas de clorosis en el vegetal (Chen et al., 1994 y Chen, 1996). Las sustancias húmicas coloidales también pueden contribuir en este mecanismo de transporte del Fe hacia la rizosfera, aunque su movimiento en el suelo será más lento que las formas solubles.

Pinton et al. (1998) observan que las sustancias húmicas pueden movilizar Fe procedente de un hidróxido de Fe insoluble mediante la formación de complejos solubles que incrementan considerablemente la concentración de este ión en la disolución y que reducen e incluso eliminan los síntomas cloróticos en plantas de pepino.

Por otro lado destacar que las sustancias húmicas también puede incrementar la movilidad del P en el suelo a través de la formación de complejos sustancia húmica-metal-fosfato (Martínez et al., 1984). Bermúdez et al. (1993) encontraron que la adición de sustancias húmicas comerciales junto a un fertilizante fosforado granulado de liberación lenta, producía un aumento en la biodisponibilidad de P en suelo calizos.

I.5.4. Sustancias húmicas comerciales.

Actualmente en el mercado español existe una gran variedad de productos denominados enmiendas húmicas, ácidos húmicos o sustancias húmicas (De Liñan, 2003). Se presentan como sólidas y líquidas, siendo el porcentaje de estas últimas muy superior al de las sólidas. Sus orígenes son

muy diversos, aunque la gran mayoría proceden fundamentalmente de leonarditas, restos vegetales y turbas.

La normativa vigente referida a las sustancias húmicas es la orden del 28 de Mayo de 1988 sobre fertilizantes y afines que desarrolla el Real Decreto 72/1988 de 5 de Febrero, modificado por el Real Decreto 877/1991, de 31 de Mayo. Según esta normativa se podrán comercializar como:

- **Enmiendas húmicas sólidas** todos aquellos productos sólidos que adicionados al suelo mejoren las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo, cuyo contenido de extracto húmico total sea superior al 5% y presente como mínimo un 3% de ácidos húmicos.
- **Ácidos húmicos líquidos**, todos aquellos productos en disolución acuosa obtenidos por tratamiento o procesados de turbas, lignitos o leonarditas, con un contenido mínimo de extracto húmico total de un 15% y un 7% de ácidos húmicos.
- **Materia orgánica líquida**, productos en disolución o en suspensión obtenidos por tratamiento o procesado de un material de origen animal o vegetal, con un contenido mínimo de un 30% de materia orgánica total.

Los estudios realizados en los últimos años indican que, si bien la naturaleza y composición de las sustancias húmicas comerciales obtenidas de distintos materiales más o menos húmificados, no son idénticas a las presentes en los suelos, aguas, etc, sus mecanismos de formación son similares y la mayoría de los parámetros analíticos presentan valores bastante parecidos. Malcolm y McCarthy (1986) compararon las características de siete sustancias húmicas comerciales de distintos orígenes con las de cinco sustancias naturales, encontrando que existen marcadas diferencias estructurales entre ellas, sin embargo, son parecidas en cuanto

a su composición. Estos autores destacaron que la importante falta de información que se tiene sobre las fuentes, los métodos de extracción, y otros posibles tratamientos a los que son sometidos las sustancias húmicas comerciales, puede dar lugar a que estos productos se comporten de forma diferente a las sustancias húmicas presentes en el suelo o en el agua, en lo que a su acción agronómica se refiere.

Los resultados sobre los efectos que las sustancias húmicas comerciales ejercen sobre el crecimiento de las plantas son a veces contradictorios (Pokorná et al., 1963; Ron y Marschner, 1983; Visser, 1986; Miele et al., 1986). Así, se ha encontrado que la aplicación de sustancias húmicas comerciales de distintos orígenes, produce efectos negativos tanto en el desarrollo de plantas de orégano, tomillo y albahaca como en la toma de nutrientes por las mismas (de Kreij y Basar, 1995). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones ponen de manifiesto el efecto positivo de las sustancias húmicas comerciales sobre la planta. En estudios realizados por Adani et al. (1998) muestran que la adición de sustancias húmicas comerciales a plantas de tomate cultivadas en hidroponía, produce aumentos en el crecimiento de las raíces y de los tallos, similares a los encontrados para sustancias húmicas naturales (Aso y Sakai, 1963; Miele et al., 1986; Chen y Aviad, 1990). Estos autores también observan un mejor estado nutricional en la planta sobre todo en lo que a la nutrición férrica se refiere, encontrando resultados similares a los obtenidos cuando el Fe se aplica en forma de FeEDTA. Sánchez (2002) encontró que la adición conjunta de quelatos FeEDDHA y sustancias húmicas comerciales al suelo de cultivo, incrementa la capacidad de toma del Fe en plantas de tomate, en vid y en cítricos. Ramos (2000) y Vivas (2001) indican que la aplicación foliar de sustancias húmicas comerciales de distintos orígenes a plantas de tomate y pimiento, producen estímulos en el desarrollo vegetal, así como un efecto bioprotector ante situaciones de estrés salino.

Como podemos observar la mayoría de las investigaciones se centran en los efectos directos que estos productos tienen sobre el crecimiento y

desarrollo de las plantas así como en su efecto bioprotector, sin embargo, también se han observado efectos positivos en cuanto a la influencia que las sustancias húmicas comerciales pueden provocar en la fertilidad de los suelos de cultivo. Así, Olmos et al. (1998) encontraron que la adición de 11 sustancias húmicas comerciales a diferentes suelos calizos provocaba un aumento en la cantidad de Fe, Mn, Cu y Zn solubilizado con respecto a los controles.

Por último es de señalar que en muchas ocasiones los efectos negativos de las sustancias húmicas comerciales son debidos a la elevada dosis en la que estos compuestos se adicionan a los cultivos (Ramos, 2000).

