

## **IV. EXPERIENCIA I**

---

#### **IV. EXPERIENCIA I. ESTABILIDAD DE LOS ISÓMEROS DE FeEDDHA Y FeEDDHMA EN FERTIRRIGACIÓN.**

El uso de los quelatos de hierro como correctores de la clorosis férrica es cada vez mayor en fertirrigación, pero esta práctica de cultivo puede suponer un riesgo para la estabilidad del quelato y por tanto, para su eficacia como aporte de Fe a la planta (Cadaña, 1998a).

En las instalaciones en las que están implantados sistemas de fertirrigación, antes de que los fertilizantes se adicionen a las aguas de riego, se procede a la preparación de la disolución madre. En esta disolución, las concentraciones en las que se encuentran los distintos nutrientes son elevadas lo que puede llevar a que sino se realiza una adecuada gestión del sistema, se produzcan descensos de pH que hagan que el quelato se descomponga. Cuando la disolución madre es mezclada con las aguas de riego se formará la disolución nutritiva que saldrá por los goteros, la cual sufrirá un aumento de pH hasta valores próximos a la neutralidad. Este aumento del pH dará lugar a la recomposición del quelato férrico que se hubiese descompuesto durante la preparación de la disolución madre. Estudios realizados por Bermúdez et al. (1999) ponen de manifiesto que la presencia de otros nutrientes en el medio producen, en mayor o menor medida, reducciones en la concentración del quelato que se recupera tras los procesos de descomposición-recomposición, que dependen de la relación nutriente/quelato (NQ) y del pH.

Por otro lado, como se ha indicado en la introducción, los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA están formados por dos isómeros de diferente estabilidad (Bannochie y Martell, 1989, Ahrlund et al., 1990), por lo que se supone que serán afectados de forma diferente por la reacción de descomposición-recomposición.

Basándonos en estos datos se propone estudiar el efecto que tienen sobre los isómeros de FeEDDHA y FeEDDHMA, la presencia de distintos iones que compiten con el Fe por el agente quelante o con el agente quelante por el Fe, tanto cuando están por separado como cuando se encuentran todos juntos en la disolución nutritiva, a las concentraciones y los valores de pH que según los resultados obtenidos por Bermúdez et al. (1999), son los que causan un mayor efecto en dicha reacción.

## **IV.1. ENSAYO 0: CARACTERIZACIÓN DE LOS QUELATOS EDDHA Y EDDHMA QUE INTERVIENEN EN EL ESTUDIO.**

En este ensayo previo se sintetizaron y caracterizaron los quelatos de Fe y de diferentes iones competidores (Cu, Zn, Mn, Ni,...) que sirvieron como patrones en los ensayos que se realizaron posteriormente.

También se cuantificaron los contenidos reales de Fe quelado y total de los quelatos comerciales que se emplearon en los Ensayos 1, 2 y 3 que comprenden la Experiencia 1 así como, la posible presencia de algunos micronutrientes que suelen añadirse a la formulación de estos productos.

### **IV.1.1. Materiales y Métodos.**

#### **V.1.1.1. Síntesis de los patrones.**

A la hora de sintetizar los quelatos de Fe que se utilizaron como patrones, no se pudo encontrar en el mercado agente quelante EDDHMA libre con una pureza apta para permitir su elaboración. Por esta razón únicamente se realizó la síntesis del quelato de FeEDDHA al que denominaremos FeEDDHA estándar.

#### **FeEDDHA estándar.**

Para preparar el quelato FeEDDHA estándar se disolvió en agua bidestilada el ácido EDDHA (Sigma, E4135) con una cantidad equivalente de NaOH (para análisis-ACS-ISO, Panreac) con el fin proporcionar un medio básico y facilitar la disolución del compuesto. Una vez disuelto, se añadió el Fe(III) en forma de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Panreac) en cantidad suficiente para obtener una concentración de quelato de hierro de  $1,79 \cdot 10^{-3}$  M. Para ello, se adicionó un 105% molar de la sal frente al 100% molar de HEDDHA, asegurando así la quelación completa. Una vez obtenida la disolución de quelato, se ajustó a pH 6 con HCl 1:1 (para análisis-ACS-ISO, Panreac) y se

dejó reposar durante 24 horas para que precipitase el exceso del ión adicionado, protegiéndolo de la luz y guardándolo en un lugar refrigerado (Hill-Cottingham, 1962). Pasado este tiempo, se filtró con filtros de  $0'45\ \mu\text{m}$  (Osmonics) y se ajustó al volumen deseado con agua ultrapura.

### **Quelatos EDDHA de los iones competidores.**

Para poder determinar si los procesos de descomposición-recomposición de los quelatos FeEDDHA en presencia de los iones competidores producen la formación de los quelatos de dichos iones se realizó la síntesis de CuEDDHA, ZnEDDHA, CaEDDHA, MgEDDHA, MnEDDHA y NiEDDHA, siguiendo el mismo procedimiento que para el FeEDDHA pero partiendo de las siguientes sales:  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  todas ellas de Panreac, que se adicionaron en una cantidad suficiente para conseguir quelatos de la siguiente concentración: CuEDDHA  $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ ; ZnEDDHA  $1'79 \cdot 10^{-3}\text{M}$ ; CaEDDHA  $0'375\ \text{M}$ ; MgEDDHA  $0'135\ \text{M}$ ; NiEDDHA  $1 \cdot 10^{-2}\ \text{M}$ ; MnEDDHA  $5'37 \cdot 10^{-5}\ \text{M}$ . Las concentraciones a las que se prepararon los diferentes quelatos se determinaron en función de la máxima concentración a la que los cationes metálicos se adicionaron en las disoluciones nutritivas que se emplearon en ensayos posteriores.

### **Quelatos EDDHMA de los iones competidores.**

Con el fin de obtener al menos la forma de los cromatogramas de HPLC de los quelatos de CuEDDHMA, ZnEDDHMA, NiEDDHMA, CaEDDHMA, MgEDDHMA y MnEDDHMA se preparó una disolución de FeEDDHMA comercial la cual se llevó a pH 12 con NaOH (para análisis-ACS-ISO, Panreac) y se dejó reposar durante 48 horas para que el Fe precipitase, protegiéndola de la luz y en un lugar refrigerado. Pasado este tiempo, la disolución se filtró con filtros de  $0'45\ \mu\text{m}$  (Osmonics) y se ajustó a pH 6 con HCl 1:1 (para análisis-ACS-ISO, Panreac). Mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica se determinó la concentración de Fe. Este proceso se

repitió hasta que se eliminó todo el hierro, quedando así el agente quelante EDDHMA libre. Cuando se obtuvo el EDDHMA, se prepararon los quelatos de Cu, Ni, Zn, Ca, Mg y Mn del mismo modo que se habían realizado los de EDDHA.

### **IV.1.1.2. Caracterización de los patrones.**

Una vez sintetizados los patrones, se sometieron a análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) siguiendo el método descrito por Lucena et al. (1996). La identificación de cada pico se llevó a cabo mediante la realización de un espectro UV-Vis en el rango 200-600 nm. Además, el área de estos picos se utilizó como referencia a la hora de determinar la concentración de Fe quelado y de cada uno de los isómeros obtenidos tras los procesos de descomposición-recomposición.

La fase móvil utilizada en el estudio cromatográfico se preparó adicionando 20 mL de hidróxido de tetrabutilamonio al 40 % (p/v) (Acros), a 650 mL de agua ultrapura. Posteriormente, se ajustó a pH 6 con HCl 1:1 (para análisis-ACS-ISO, Panreac), ya que las fases móviles neutras son adecuadas para mantener la estabilidad de los quelatos, y a continuación se adicionaron 300 mL de Acetonitrilo (para HPLC, Scharlau FEROSA). Finalmente, se ajustó el volumen a 1 L y se filtró a través de filtros de 0'22  $\mu\text{m}$  (Osmonics).

Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura y se filtraron previamente a ser inyectadas en la columna con filtros de 0'22  $\mu\text{m}$  (Osmonics). Se empleó un columna Chromspher C<sub>18</sub>, siendo el volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y la velocidad de flujo de 1'5 mL/min.

### **IV.1.1.3. Caracterización de los quelatos comerciales.**

De la gran variedad de quelatos que existen hoy en día en el mercado español se seleccionaron dos, un quelato FeEDDHA que de acuerdo con su

etiqueta contiene un 6% de hierro en forma quelada, y otro constituido por FeEDDHMA y que presenta un 6'5% de hierro quelado soluble en agua.

### **Determinación de la concentración de Fe, Cu, Mn y Zn total en los productos comerciales.**

Se prepararon disoluciones de los dos quelatos comerciales (FeEDDHA y FeEDDHMA) de una concentración 20 mg de Fe/L teniendo en cuenta que de acuerdo con la etiqueta, contienen un 6% y un 6'5% de hierro quelado respectivamente. De estas disoluciones se tomaron 10 mL a los que se añadió 1 mL de HCl 1:1 para destruir el quelato y después se determinó, mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (Philips PU 9100), los contenidos Fe, Cu, Mn y Zn. Las muestras se analizaron por triplicado.

### **Determinación de la concentración de hierro quelado en los productos comerciales.**

Basándonos en el porcentaje de Fe quelado indicado por el fabricante, se prepararon disoluciones de FeEDDHA comercial de una concentración de 100 mg de Fe/L que se sometieron a análisis por HPLC siguiendo el método propuesto por Lucena et al. (1996) y descrito en el Apartado IV.1.1.2.

La cuantificación del contenido real de hierro quelado que presenta el quelato FeEDDHA comercial se realizó a partir de la elaboración de una recta patrón de FeEDDHA estándar. Sin embargo, al no disponer de un patrón de FeEDDHMA, no ha sido posible calcular la concentración Fe quelado en el FeEDDHMA comercial.

## **IV.1.2. Resultados y discusión.**

### **IV.1.2.1. Caracterización de los patrones.**

#### **FeEDDHA estándar.**

El cromatograma del quelato FeEDDHA estándar se muestra en la Fig.IV.1. En él se observan dos picos que corresponden a cada uno de los isómeros que constituyen este quelato. La mezcla d,l-racémica a 6'6 min (pico 1) y el isómero meso a 7'9 min (pico 2). El área de cada uno de ellos así como los espectros UV-Vis también se recogen en la Fig.IV.1.

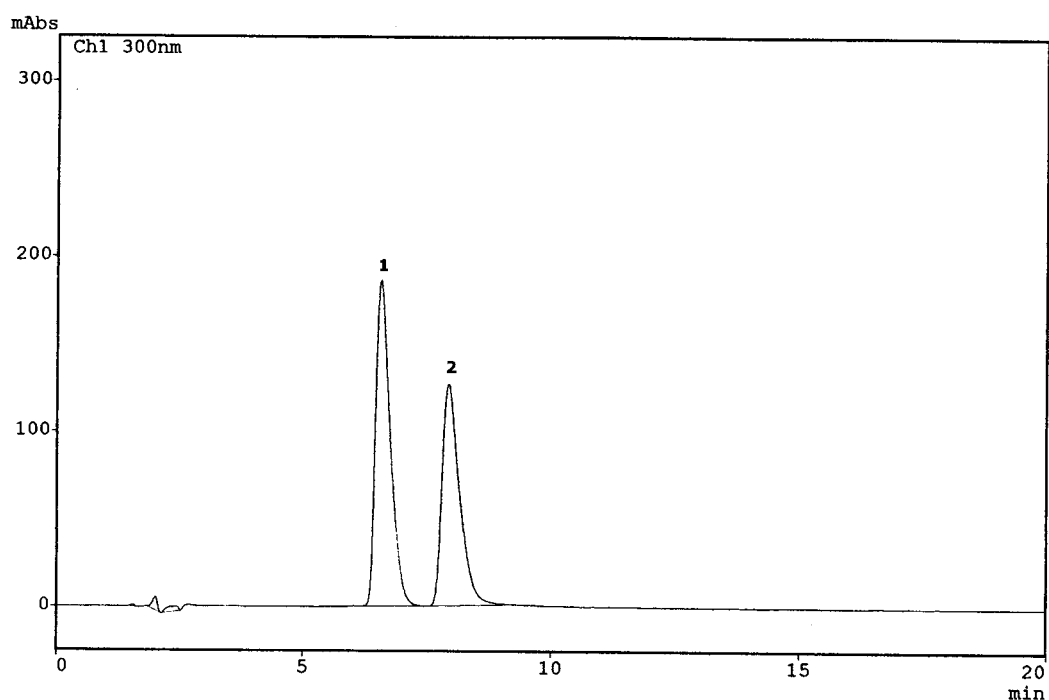
#### **CuEDDHA.**

En el cromatograma de HPLC del quelato CuEDDHA aparecen dos grandes picos unidos en la base, el primero a 3'2 min (pico 1) y el segundo a 3'4 min (pico 2), los cuales deben corresponder a los diferentes isómeros que presenta este quelato (Fig.IV.2). A diferencia de lo ocurrido para el FeEDDHA estándar, el análisis de los espectros UV-Vis (Fig.IV.2) no ha permitido identificar que isómero da lugar a la formación de cada pico.

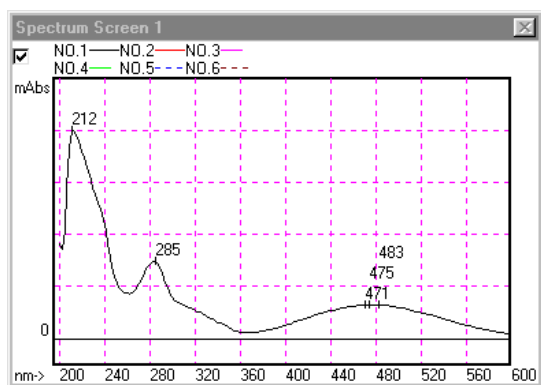
#### **ZnEDDHA.**

Para el quelato ZnEDDHA se ha obtenido un cromatograma de HPLC en el que entre 3 y 4 minutos, aparecen una serie de pequeños picos unidos entre si (Fig.IV.3). Los espectros UV-Vis y el área correspondiente a cada uno de ellos se muestra en la Fig.IV.3.

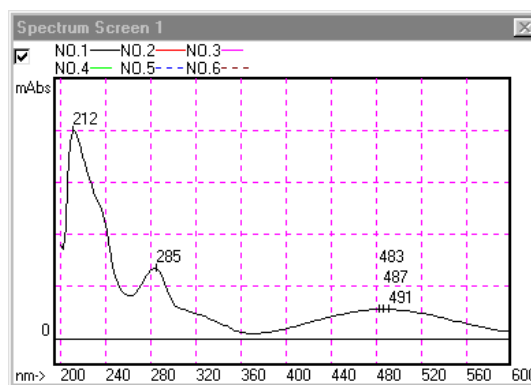




Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	6'6	3771429	$9'7 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'9	3161096	$8'2 \cdot 10^{-4}$
--	<b>Total</b>	--	<b>6932525</b>	<b><math>1'79 \cdot 10^{-3}</math></b>

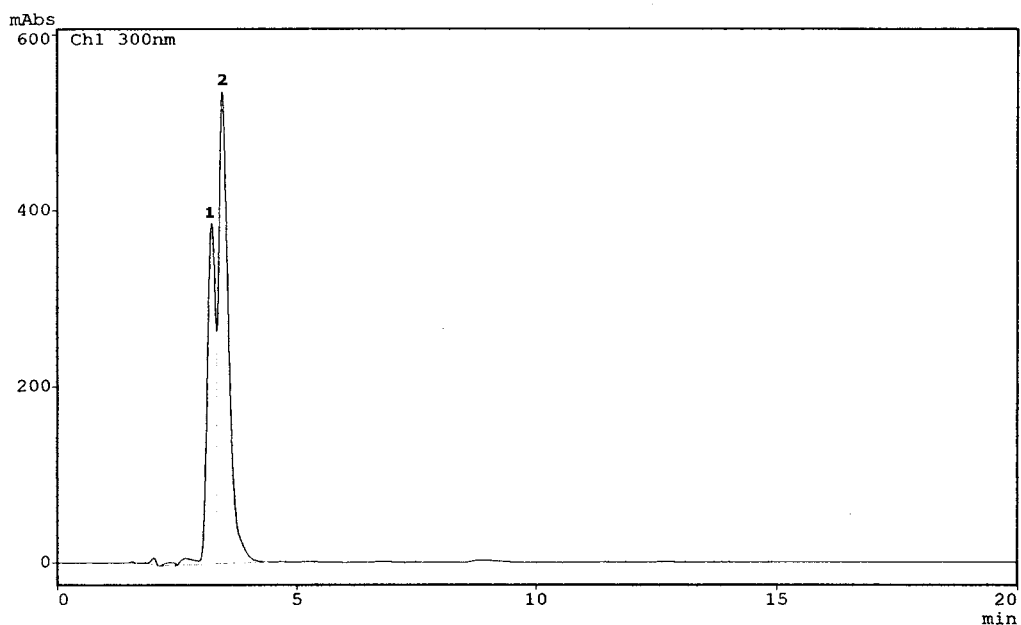


Pico 1

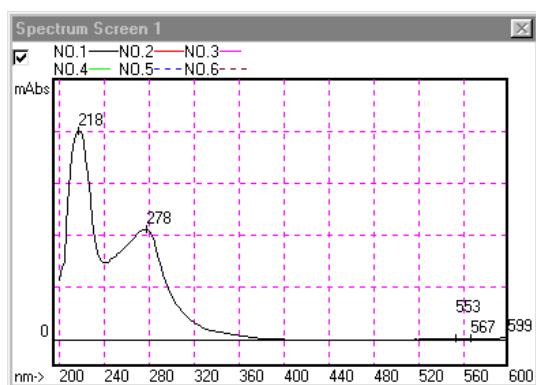


Pico 2

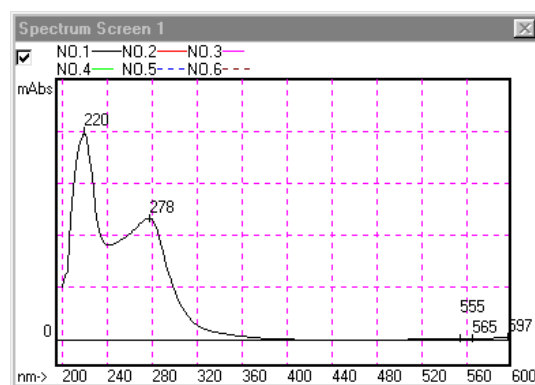
**Fig.IV.1. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato FeEDDHA estándar ( $1'79 \cdot 10^{-3}$  M). Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.**



Picos	Tiempo (min)	Área
1	3'2	4536403
2	3'4	7719895

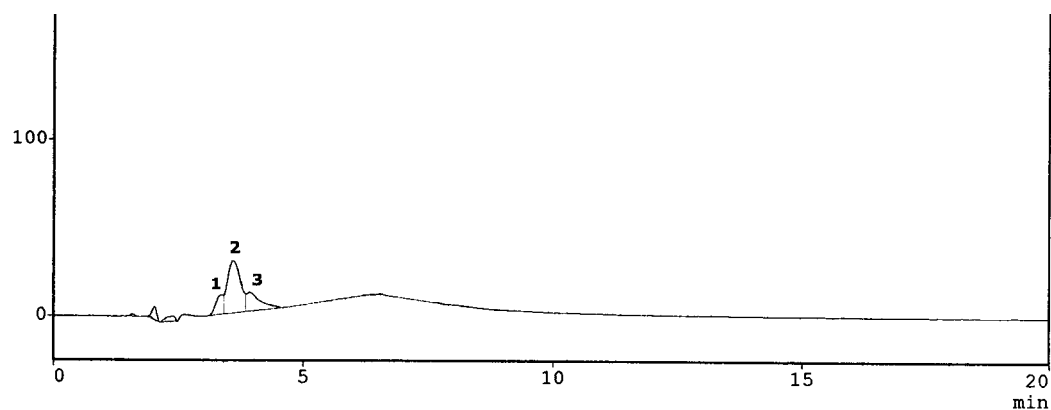


Pico 1

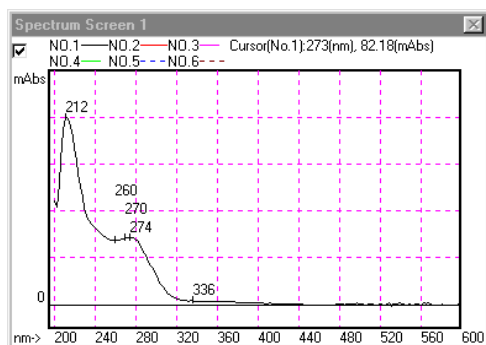


Pico 2

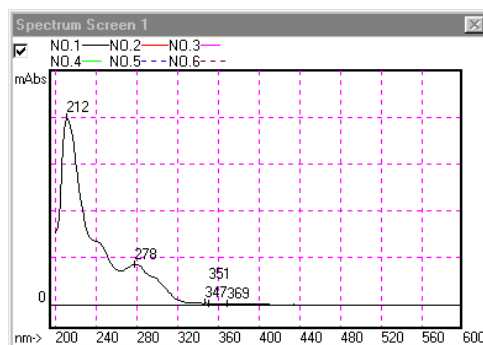
Fig.IV.2. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato CuEDDHA ( $5 \cdot 10^{-3}$  M).



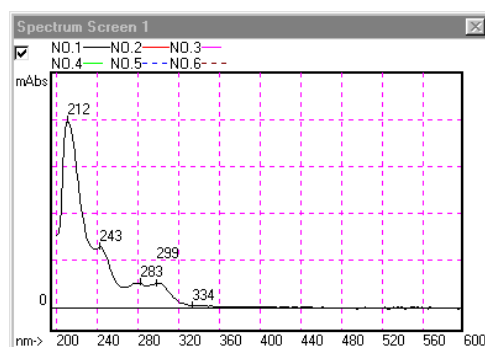
Picos	Tiempo (min)	Área
1	3'3	115999
2	3'6	536084
3	3'9	208956



Pico 1



Pico 2



Pico 3

Fig.IV.3. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato ZnEDDHA ( $1'79 \cdot 10^{-3}$  M).

### **NiEDDHA.**

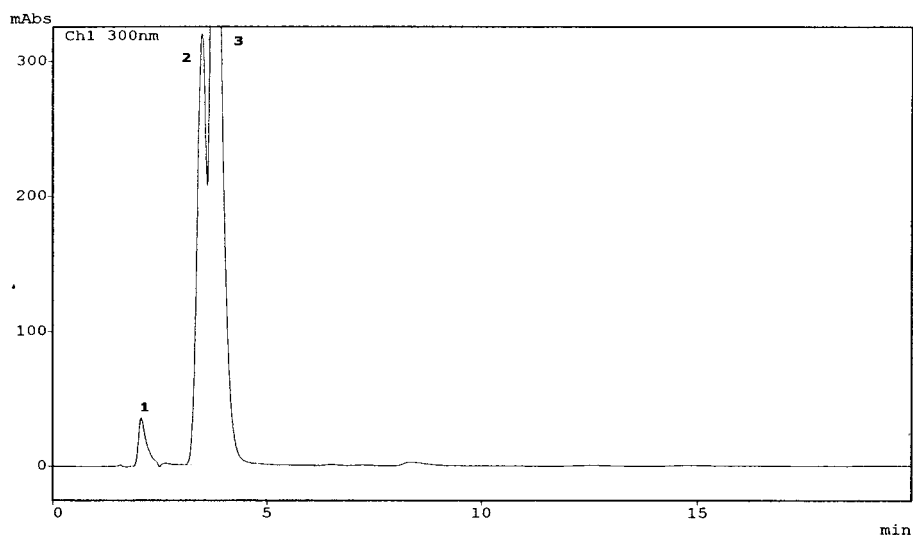
En el cromatograma de HPLC correspondiente al quelato NiEDDHA se observan dos grandes picos unidos por la base (picos 2 y 3) y un tercer pico de menor área y tiempo de elución que los anteriores (pico 1) (Fig.IV.4). Por los espectros de UV-Vis obtenidos (Fig.IV.4), se podría decir que los picos 2 y 3 corresponden a los diferentes isómeros del quelato. Sin embargo, las diferencias que presenta el espectro del pico 1 con respecto a los anteriores, hace pensar que éste pueda deberse a la señal producida por algún compuesto de Ni que no se encuentra en forma de (o-EDDHA) en la disolución (Fig.IV.4).

### **MnEDDHA.**

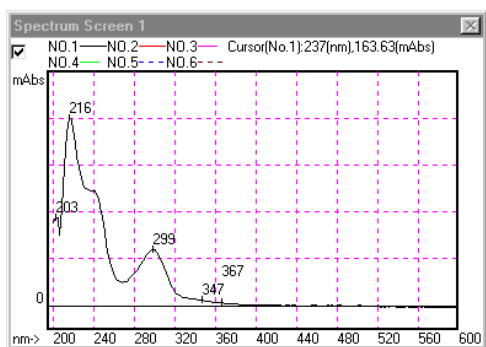
La síntesis del MnEDDHA da lugar a un cromatograma de HPLC (Fig.IV.5) en el que aparecen tres picos a 1'8 min (pico 1), a 3'6 min (pico 2) y a 6'6 min (pico 3), cuyos espectros UV-Vis se recogen en la Fig.IV.5. Como se observa en esta figura, el área del pico 1 es en torno a un 80% menor que la de los otros dos picos y su espectro UV-Vis no presenta los mismos máximos de absorbancia que los de los picos 2 y 3, lo que parece indicar que el pico 1 puede ser debido a la presencia de algún compuesto no (o-EDDHA) en disolución.

### **CaEDDHA y MgEDDHA.**

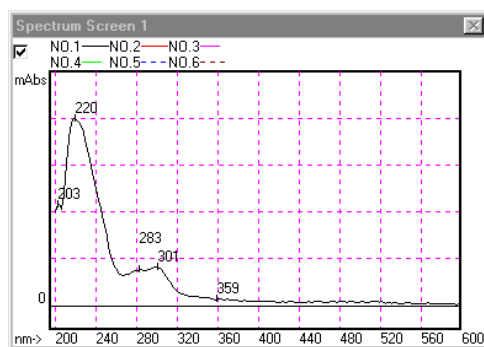
Los quelatos CaEDDHA y MgEDDHA no han podido ser identificados mediante HPLC, ya que se obtuvieron unos cromatogramas muy mal definidos de los que no se pudo obtener ninguna información significativa (no se incluye figura).



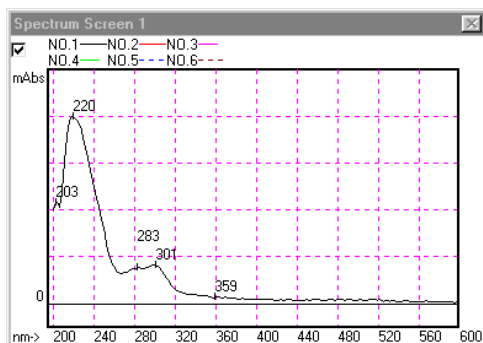
Picos	Tiempo (min)	Área
1	2'0	491332
2	3'5	4633259
3	3'7	11379449



Pico 1

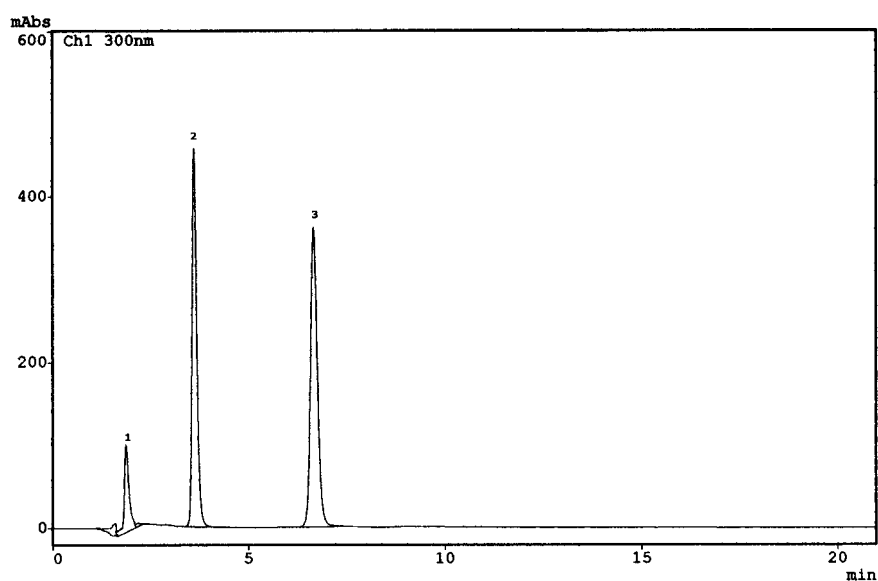


Pico 2

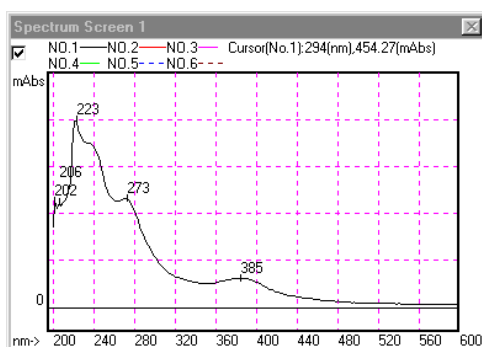


Pico 3

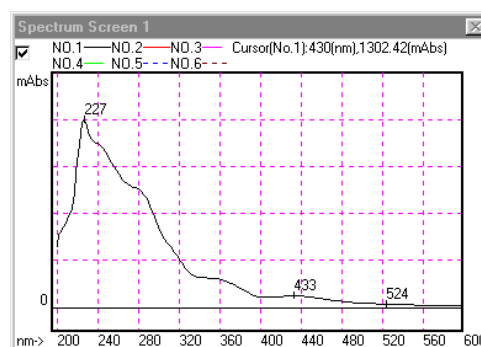
Fig.IV.4. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato NiEDDHA ( $1 \cdot 10^{-2}$  M)



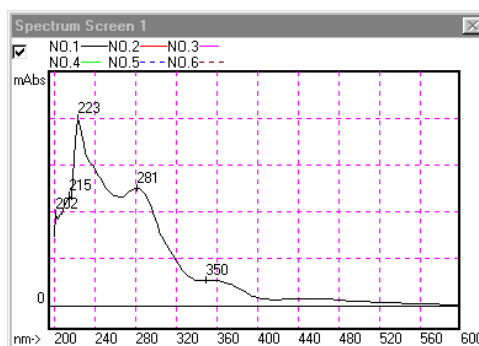
Picos	Tiempo (min)	Área
1	1'8	877791
2	3'6	3750175
3	6'6	4465035



Pico 1



Pico 2



Pico 3

Fig.IV.5. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato MnEDDHA ( $5'37 \cdot 10^{-5}$  M).

### **CuEDDHMA**

En la Fig.IV.6 se muestra el cromatograma de HPLC del quelato CuEDDHMA. En él que se distinguen cuatros picos cuyos tiempos de elución oscilan entre 3'4 y 7'2 min. Tras la comparación de los espectros UV-Vis realizados a cada uno de ellos (Fig.IV.6), se encontró que el espectro del pico 4 presentaba marcadas diferencias con respecto a los de los demás picos, las cuales pueden ser debidas a que el compuesto que da lugar a dicho pico, no sea CuEDDHMA sino alguna impureza procedente de la síntesis del quelato.

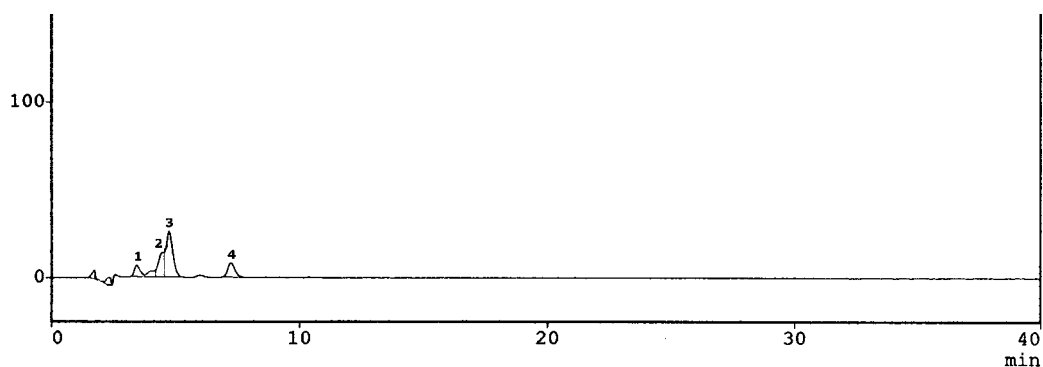
### **ZnEDDHMA**

En el cromatograma de HPLC correspondiente al ZnEDDHMA se observan dos picos. El pico 1 de menor área y con un tiempo de elución de 4'7 min y el pico 2 a 5'6 min (Fig.IV.7). Cabe señalar que a pesar de que los tiempos de elución son superiores a los obtenidos para los picos 1 y 3 del quelato ZnEDDHA (Fig.IV.3), los espectros UV-Vis son similares.

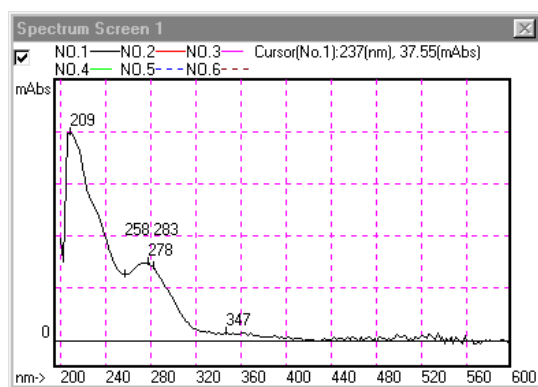
### **NiEDDHMA**

El estudio cromatográfico del quelato NiEDDHMA ha dado lugar a un cromatograma de HPLC en el que aparecen dos picos unidos por la base (picos 1 y 2) cuyos espectros UV-Vis se recogen en la Fig.IV.8.

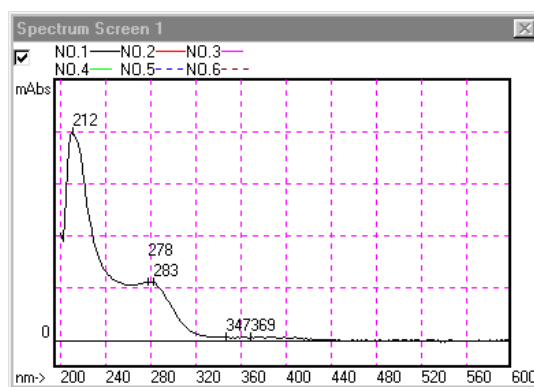
Tal y como ocurre para el resto de los quelatos EDDHMA, los tiempos de elución de los picos del NiEDDHMA son superiores a los que presenta el quelato NiEDDHA.



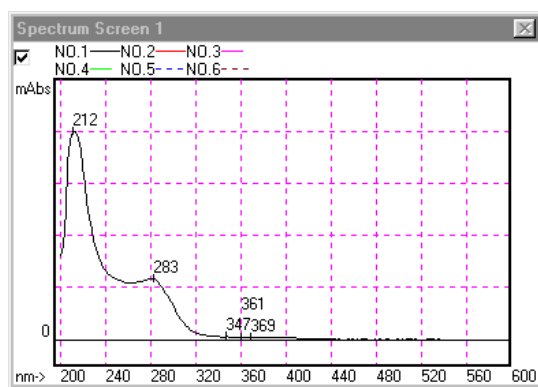
Picos	Tiempo (min)	Área
1	3'4	107291
2	4'4	211282
3	4'7	510811
4	7'2	159565



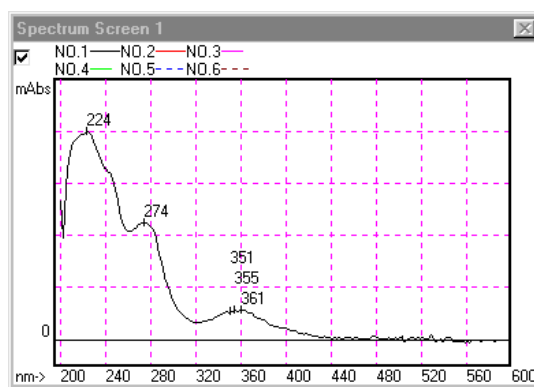
Pico 1



Pico 2



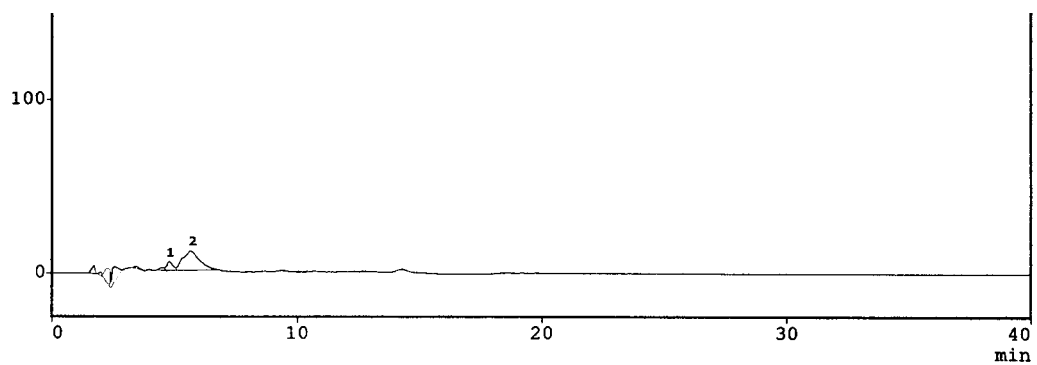
Pico 3



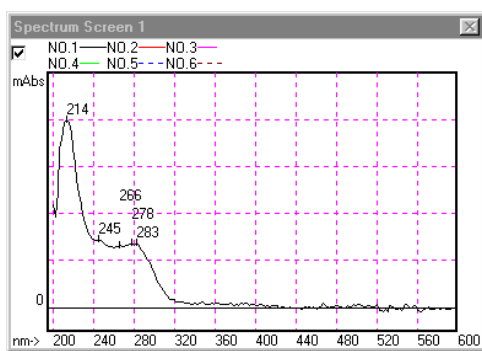
Pico 4

Fig.IV.6. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato CuEDDHMA ( $5 \cdot 10^{-3}$  M).

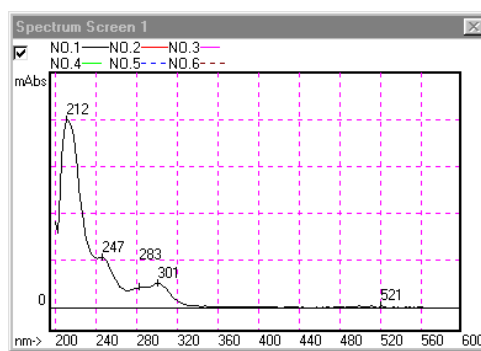




Picos	Tiempo (min)	Área
1	4'7	84747
2	5'6	536311

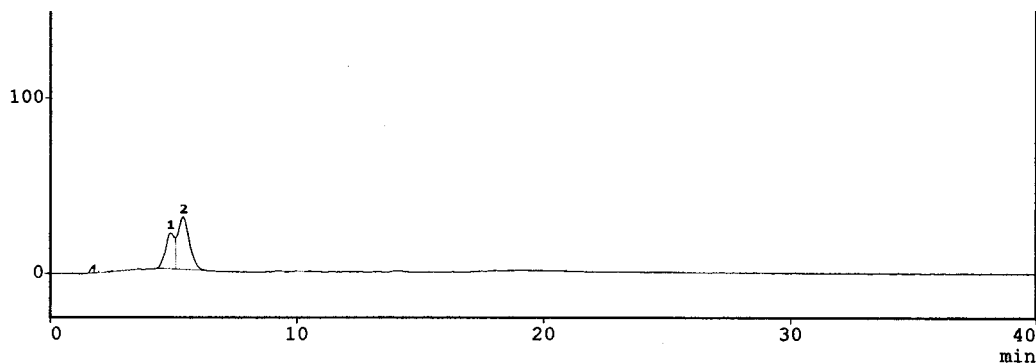


Pico1

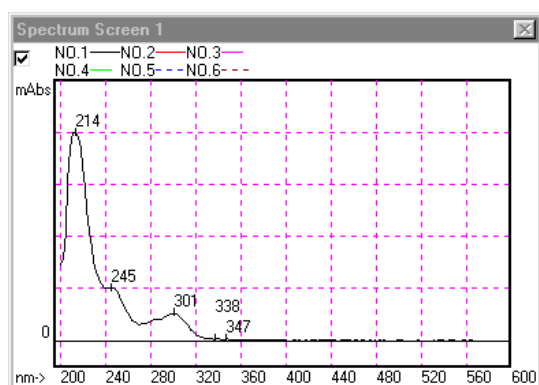


Pico2

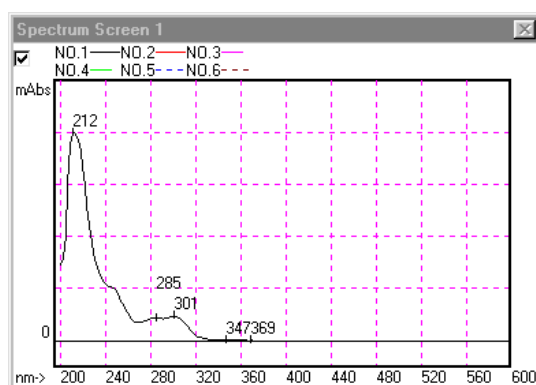
**Fig.IV.7. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato ZnEDDHMA ( $1'79 \cdot 10^{-3}$  M)**



Picos	Tiempo (min)	Área
1	4'8	516049
2	5'3	977360



Pico1



Pico2

Fig.IV.8. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato NiEDDHMA ( $1 \cdot 10^{-2}$  M).

**CaEDDHMA, MgEDDHMA y MnEDDHMA**

Para los quelatos CaEDDHMA, MgEDDHMA y MnEDDHMA se han obtenido de nuevo cromatogramas de HPLC muy mal definidos de los que no se pudo extraer ninguna información (no se incluyen figuras).

De acuerdo con los datos mostrados hasta el momento, los tiempos de elución de los quelatos EDDHA y EDDHMA de Cu, Zn, Mn y Ni son inferiores a los de los isómeros de los quelatos férricos. Esto hace pensar que será fácil establecer si se ha producido la formación de los quelatos de dichos iones pero quizás, lo que resulte más difícil sea indicar de cual o cuales se trata cuando estén presentes varios al mismo tiempo.

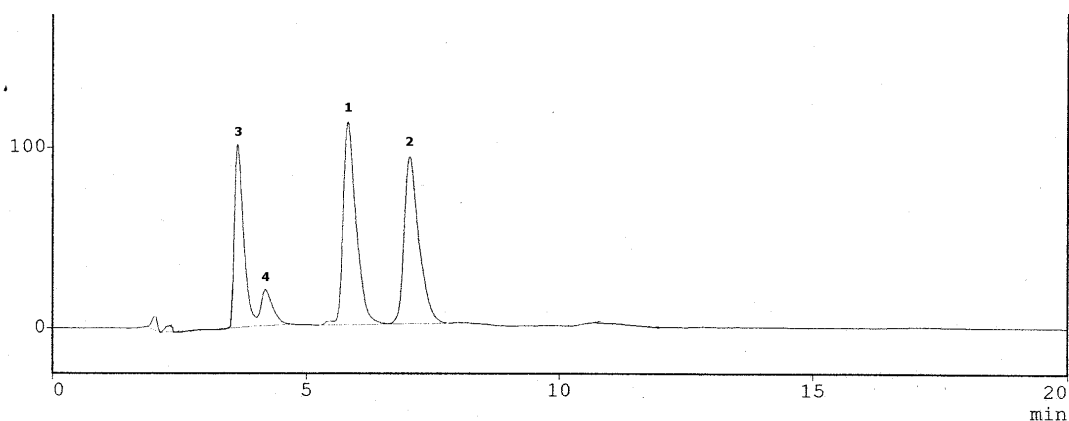
### **IV.1.2.2. Caracterización de los quelatos comerciales.**

#### **FeEDDHA comercial**

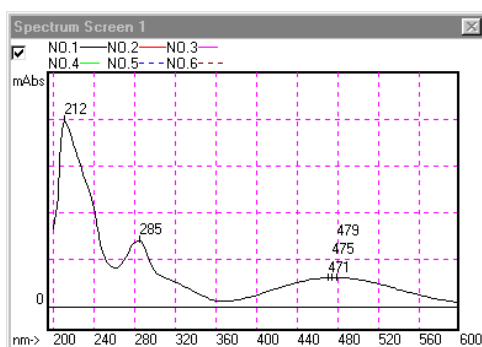
En el cromatograma de HPLC del FeEDDHA comercial (Fig.IV.9) aparecen los dos picos correspondientes a los isómeros del quelato, a 5'8 min (pico 1) la mezcla d,l-racémica y 7'0 min (pico 2) el meso, cuyos tiempos de retención son ligeramente superiores que los del FeEDDHA estándar, un tercer pico a 3'6 min (pico 3) y un pico pequeño a 4'2 min (pico 4) que son debidos a las impurezas que suelen presentar los productos comerciales en su formulación (Hernández-Apaolaza, 1997; Álvarez-Fernández, 2000).

Mediante RMN, Cremonini et al. (2001) lograron identificar estas impurezas de forma que el pico 3, corresponde a la presencia en disolución de un isómero de EDDHA que al menos contiene un grupo hidroxifenil en posición *para*, mientras que el pico 4, probablemente sea debido a la formación del 2,6-di[CH(COOH)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH(COOH)hidroxifenil]fenol durante la síntesis del (o-EDDHA).

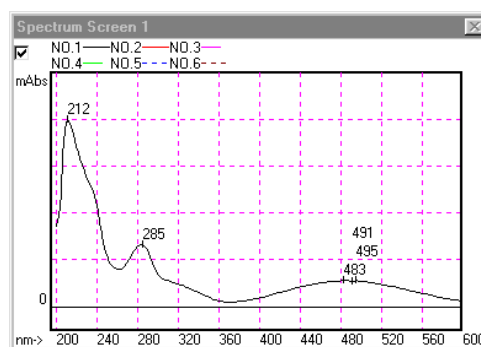
El hecho de que en los espectros UV-Vis de los picos 3 y 4 no aparezca ningún máximo de absorbancia en la zona de 480 nm (Fig.IV.9), es indicativo de que estos agentes quelantes no (o-EDDHA) no están asociados al Fe.



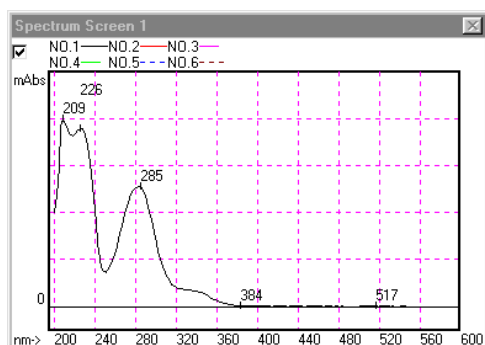
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'8	1966254	$5'02 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'0	1882050	$4'81 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3848304</b>	<b><math>9'83 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'6	1271953	--
4	--	4'2	327768	--



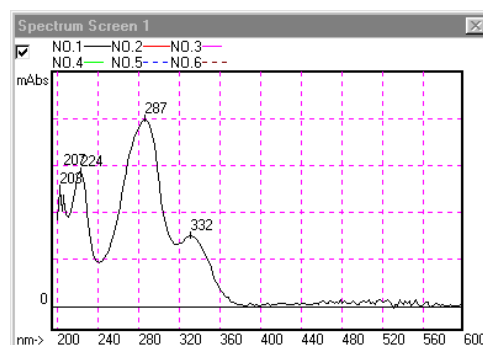
Pico 1



Pico 2



Pico 3



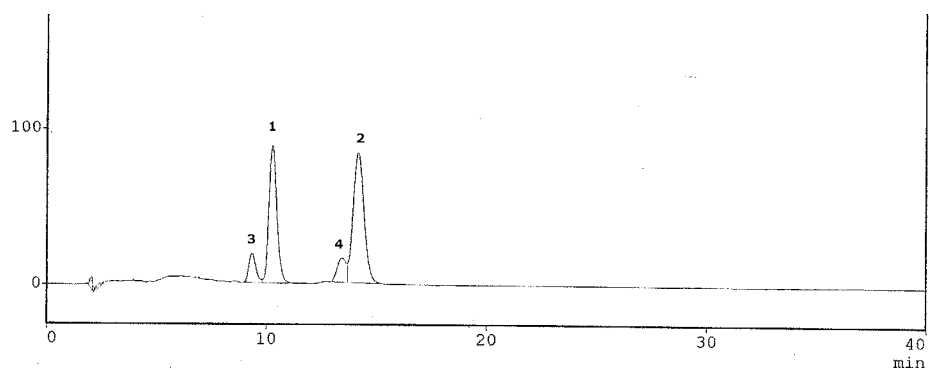
Pico 4

Fig.IV.9. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al FeEDDHA comercial ( $9'83 \cdot 10^{-4}$  M). Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso

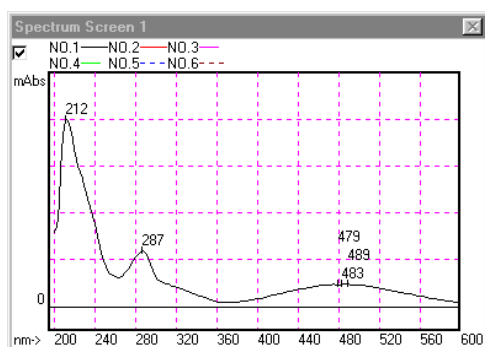
### **FeEDDHMA comercial**

El quelato FeEDDHMA comercial presenta un cromatograma (Fig.IV.10) en el que aparecen dos picos a tiempos de retención 10'2 min (pico 1) y 14'1 min (pico 2), acompañados de dos hombros de áreas y tiempos de elución menores (picos 3 y 4). La realización de un espectro UV-Vis a cada uno de ellos ha permitido determinar que los picos 1 y 2 corresponden a los isómeros meso y d,l-racémico respectivamente. Cuando se comparan estos picos con los obtenidos para los quelatos FeEDDHA (Fig.IV.1 y IV.9) se observa que los tiempos de retención son superiores y que el orden de salida de los isómeros se ha invertido.

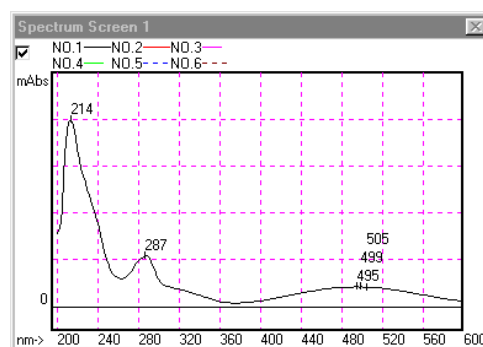
Estudios realizados por Álvarez-Fernández et al. (2002) han permitido identificar mediante RMN, los compuestos que dan origen a los picos 3 y 4, los cuales son debidos a la presencia de los isómeros del quelato etilendiamino-2-(2-hidroxi-6-metilfenil)-5-(2-hidroxi-4-metilfenil)-di-acetato de Fe(III) en disolución al que nos referiremos como FeEDDH4,6MA.



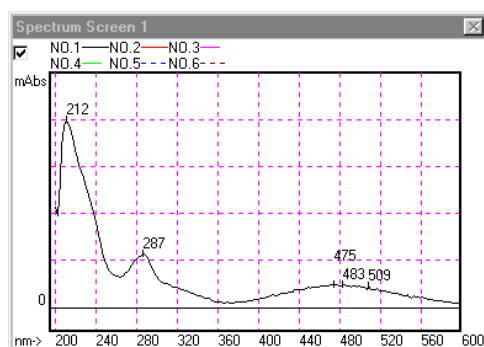
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	10'2	2237440
2	d,l-racémico	14'1	2923610
	<b>Total</b>	--	<b>5161050</b>
3	--	9'3	424179
4	--	13'4	448701



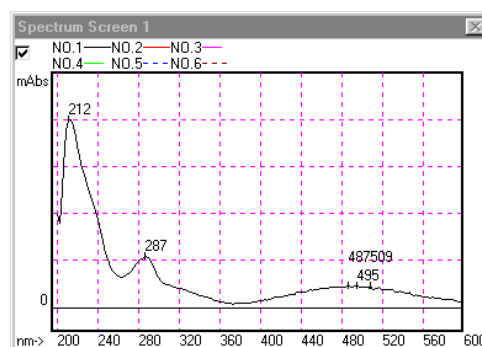
**Pico 1**



**Pico 2**



**Pico 3**



**Pico 4**

**Fig.IV.10. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al quelato FeEDDHMA comercial ( $1'79 \cdot 10^{-3}$  M).**

**Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**

**Determinación del contenido de Fe, Cu, Mn y Zn total y de Fe quelado**

En la Tabla.IV.1 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del porcentaje de Fe total y quelado y de la concentración de los diferentes micronutrientes que los dos quelatos comerciales seleccionados para este estudio presentan en su formulación. A partir de estos resultados se deduce que el porcentaje de hierro (o-EDDHA) que contiene el FeEDDHA comercial es inferior al indicado en la etiqueta, lo que confirma los resultados obtenidos por Hernández-Apaolaza (1997), Bermúdez et al. (1999) y Álvarez-Fernández (2000). Este hecho ha dado lugar a que la concentración de Fe (o-EDDHA) en la disolución sea  $9'83 \cdot 10^{-4}$  M en lugar de  $1'79 \cdot 10^{-3}$  M (concentración a la que se preparó la disolución teniendo en cuenta que el contenido de Fe quelado declarado era del 6%).

**Tabla.IV.1. % de Fe total y de Fe quelado (FeQ) y contenidos totales de Mn, Cu y Zn en los quelatos comerciales.**

	<b>FeEDDHA</b>	<b>FeEDDHMA</b>
<b>%Fe total</b>	5'6	6'7
<b>%FeQ</b>	3'2	--
<b>Concentración Cu Total (µg/g)</b>	155	367
<b>Concentración Mn Total (µg/g)</b>	756	250
<b>Concentración Zn Total (µg/g)</b>	412	80

En cuanto al porcentaje de hierro total (definiendo el hierro total como la cantidad de Fe en forma (o-EDDHA/MA) más el Fe en forma no (o-EDDHA/MA), el quelato FeEDDHA presenta un contenido inferior al declarado (6'0 %). Por el contrario para el FeEDDHMA, este porcentaje coincide con el del hierro quelado indicado en la etiqueta (6'5 %). Estos datos demuestran que en el FeEDDHA comercial y muy probablemente en el FeEDDHMA, existe una cantidad de hierro que se no se encuentra en forma de (o-EDDHA/MA) y cuya naturaleza y estabilidad son desconocidas.

Cabe señalar que estudios realizados por Álvarez-Fernández (2000) ponen de manifiesto que el Fe no (o-EDDHA) presente en el quelato FeEDDHA comercial no se encuentra asociado a los agentes quelantes o-p-EDDHA y p-EDDHA que este producto contiene en su formulación, ya que no existen una relación directa en el comportamiento de ambos.

Por otro lado, destacar que ambos productos comerciales contienen otros nutrientes como son Cu, Mn y Zn (Tabla.IV.1), cuyas concentraciones coinciden con las establecidas por Bermúdez et al. (1999) para estos mismos quelatos.





## **IV.2. ENSAYO 1: REACCIONES DE LOS QUELATOS FeEDDHA Y FeEDDHMA CON IONES COMPETIDORES.**

El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto que tienen sobre la estabilidad de los isómeros de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA, el que se lleven cabo procesos de descomposición-recomposición en presencia de distintos iones que puedan competir con el Fe por el agente quelante y viceversa.

### **IV.2.1. Materiales y métodos.**

El ensayo se llevó a cabo con los dos quelatos comerciales que se han caracterizado en el Ensayo O y con FeEDDHA estándar.

Para los tres quelatos en estudio se prepararon disoluciones de concentración  $1,79 \cdot 10^{-3}$  M de Fe, las cuales se utilizaron como blanco. Del mismo modo, se elaboraron disoluciones de estos mismos quelatos a las que se les había adicionado un ión competidor. Los iones empleados en este ensayo fueron Cu, Zn, P y Ni, que según los resultados obtenidos por Bermúdez et al. (1999), son los que producen mayores pérdidas de quelato cuando tienen lugar procesos de descomposición-recomposición. El Cu, Ni y Zn se añadieron como cloruros y el P como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , todos ellos de Panreac (purísimo).

Las proporciones en las que se adicionó el ión con respecto al quelato (NQ) fueron superiores a las indicadas por Bermúdez et al. (1999) como las que ejercen un mayor efecto sobre la estabilidad del quelato (Tabla. IV.2).

Tabla.IV.2.Relación entre nutrientes

Elemento	Concentración (M)	NQ FeEDDHA estándar	NQ FeEDDHA comercial
FeEDDHA estándar	$1'79 \cdot 10^{-3}$	1'0	--
FeEDDHA comercial	$9'83 \cdot 10^{-4}$	--	1'0
FeEDDHMA comercial	$1'79 \cdot 10^{-3}$	--	--
Cu	$5 \cdot 10^{-3}$	2'8	5'1
Ni	$1 \cdot 10^{-2}$	5'6	10'2
Zn	$1'79 \cdot 10^{-3}$	1'0	1'8
P	$5 \cdot 10^{-2}$	27'9	50'7

Cada disolución se sometió a procesos de descomposición del quelato. Para ello las disoluciones se llevaron a pH 1 mediante adición de HCl (para análisis-ACS-ISO, Panreac), y se mantuvieron a ese pH durante una hora y en oscuridad. Pasado este tiempo, se procedió a la recomposición del quelato, aumentado el pH con la adición de NaOH (para análisis-ACS-ISO, Panreac) hasta el valor en estudio. Estos valores fueron:

- **pH 6'0**, se analizó el efecto de los iones Cu, Ni y Zn sobre los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA, ya que este valor de pH es el de máxima estabilidad tanto para los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA como para los quelatos de los iones competidores presentes en la disolución. Además, se encuentra dentro del intervalo recomendado para la disoluciones nutritivas empleadas en fertirrigación (Cadahía, 1998a).
- **pH 4'5**, se determinó el efecto que el ión fosfato produce sobre los isómeros de los quelatos en estudio, debido a que la competencia de dicho anión con el agente quelante para formar fosfatos de Fe es mayor a este valor de pH (Bermúdez et al., 1999).

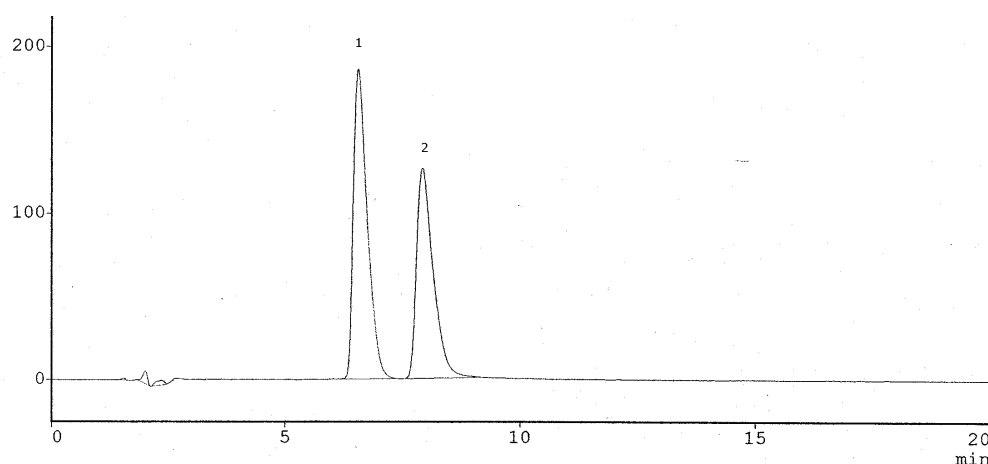
Todas las disoluciones en estudio se prepararon con agua ultrapura, y se filtraron a través de filtros de 0'22  $\mu\text{m}$  (Osmonics) antes de ser sometidas a análisis.

En las muestras se determinó mediante HPLC, la concentración de Fe quelado y de cada uno de los isómeros que componen los quelatos así como la posible formación de los quelatos de los iones competidores presentes en el medio.

## IV.2.2. Resultados y discusión.

### IV.2.2.1. Procesos de descomposición-recomposición de los quelatos FeEDDHA en presencia de iones competidores.

Cuando el valor de pH de las disoluciones de FeEDDHA estándar y comercial desciende hasta 1, los isómeros que constituyen estos quelatos se destruyen totalmente, independientemente de la presencia de iones competidores. La posterior recomposición del FeEDDHA estándar hasta pH 6'0 en ausencia de dichos iones (Fig.IV.11) es prácticamente completa (99'6%), siendo las concentraciones recuperadas de los isómeros meso y d,l-racémico (Fig.IV.11) similares a las que contenía el quelato antes de someterse al proceso de descomposición-recomposición (Fig.IV.1)



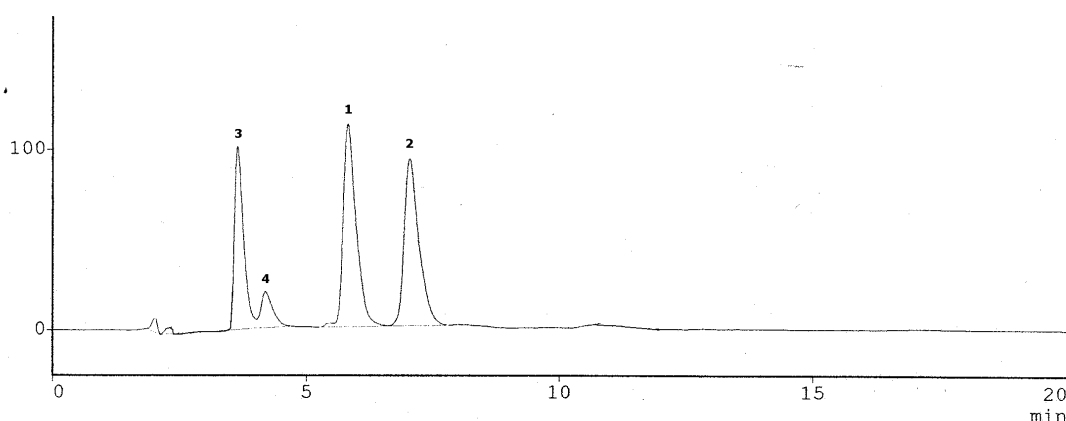
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	6'6	3741257	$9'6 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'9	3161096	$8'1 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>6902353</b>	<b><math>1'77 \cdot 10^{-3}</math></b>

**Fig.IV.11. Cromatograma de HPLC correspondiente al quelato FeEDDHA estándar recompuesto a pH 6'0 en ausencia de iones competidores.**

**Pico 1: isómero d,l-racémico. Pico 2: isómero meso.**

Con respecto quelato comercial (Fig.IV.12), la recomposición hasta pH 6'0 en ausencia de iones competidores es ligeramente inferior (94'5%) a la del FeEDDHA estándar (Tabla.IV.3). Como se observa en la Tabla.IV.3 las pérdidas de d,l-racémico son del mismo orden que las de meso y en ambos casos, no superan el 6%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bermúdez et al. (1999).

Cuando se comparan las áreas de los picos correspondientes a los agentes quelantes no (o-EDDHA) que contiene el producto comercial (picos 3 y 4) (Fig.IV.12) con las del patrón (Fig.IV.9), se encuentra que el proceso de recomposición no ha afectado a la estabilidad del compuesto que da lugar al pico 3. Sin embargo, el pico 4 ha sufrido una reducción del 9'2%.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'8	1850245	$4'73 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'0	1787948	$4'56 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3638193</b>	<b><math>9'29 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'6	1270536	--
4	--	4'2	297556	--

**Fig.IV.12. Cromatograma de HPLC correspondiente al quelato FeEDDHA comercial recompuesto a pH 6'0 en ausencia de iones competidores.**

**Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso.**

**Tabla.IV.3.Porcentaje de recomposición de los isómeros que componen el quelato FeEDDHA.**

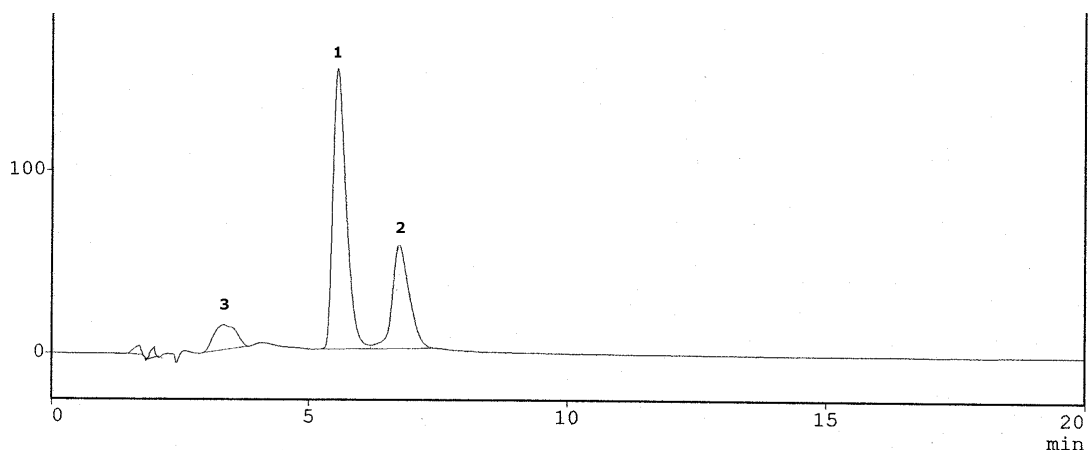
	<b>Isómero</b>	<b>% recomposición FeEDDHA estándar</b>	<b>% recomposición FeEDDHA comercial</b>
<b>Recompuesto pH 6'0</b>	Racémico	99'2	94'1
	Meso	100'0	95'0
	<b>Total</b>	<b>99'6</b>	<b>94'5</b>
<b>Recompuesto pH 6'0 + Zn</b>	Racémico	73'3	105'6
	Meso	40'8	88'4
	<b>Total</b>	<b>58'5</b>	<b>97'2</b>
<b>Recompuesto pH 6'0 + Cu</b>	Racémico	86'9	86'1
	Meso	24'3	18'6
	<b>Total</b>	<b>58'4</b>	<b>52'8</b>
<b>Recompuesto pH 6'0 + Ni</b>	Racémico	96'4	91'0
	Meso	99'9	83'8
	<b>Total</b>	<b>98'0</b>	<b>87'5</b>
<b>Recompuesto pH 4'5 +P</b>	Racémico	84'2	89'2
	Meso	23'1	33'6
	<b>Total</b>	<b>56'3</b>	<b>61'8</b>

**Efecto de la presencia del ión Zn en la disolución**

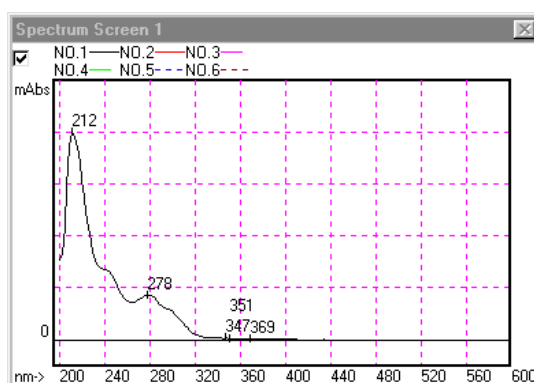
En la Fig.IV.13 se muestra el cromatograma de HPLC del Fe (o-EDDHA) estándar recompuesto en presencia de Zn. En él se observan los dos picos de los isómeros que componen el quelato, a 5'5 min el isómero d,l-racémico (pico 1) y a 6'7 min el meso (pico 2), los cuales se han visto fuertemente afectados por el proceso de descomposición-recomposición. De los dos isómeros, el que sufre mayores pérdidas es el meso, recuperándose únicamente un 40'8% frente al 73'3% del d,l-racémico (Fig.IV.13).

En este cromatograma (Fig.IV.13), también se ha encontrado un pico a 3'6 min (pico 3) que no aparece en la Fig.IV.11 correspondiente a un

ensayo similar pero en ausencia de Zn. Tras cotejar su tiempo de retención y espectro UV-Vis (Fig.IV.13) con los del patrón de ZnEDDHA (Fig.IV.3) se concluye que la presencia de agente quelante (o-EDDHA) libre en la disolución ha dado lugar a la formación del quelato ZnEDDHA.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'5	2766074	$7'1 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'7	1291337	$3'3 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>4057411</b>	<b><math>1'04 \cdot 10^{-3}</math></b>
3	--	3'6	412763	--

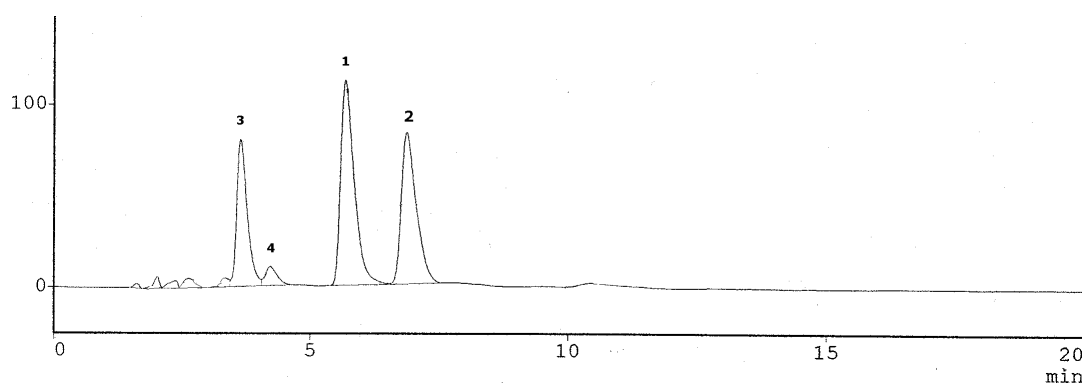


Pico 3

**Fig.IV.13. Cromatograma HPLC y espectros UV-Vis correspondiente al quelato FeEDDHA estándar recompuesto a pH 6'0 en presencia de Zn ( $1'05 \cdot 10^{-3}$  M).  
Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso, Pico 3: ZnEDDHA.**



Por otro lado, en la Fig.IV.14 se muestran las concentraciones de quelato y de los isómeros d,l-racémico y meso recuperadas tras la recomposición del FeEDDHA comercial en presencia de Zn. De ellas se deduce que a diferencia de lo observado para el quelato estándar, la recomposición del producto comercial es prácticamente total (Fig.IV.14 y Tabla.IV.3), siendo la pérdida de Fe quelado inferior al 3%. Además, cabe señalar que dicha pérdida es producida por la descomposición del isómero meso mientras que el d,l-racémico, permanece totalmente estable (Tabla.IV.3).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'7	2076281	$5'30 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'9	1663772	$4'25 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3740053</b>	<b><math>9'55 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'6	1166645	--
4	--	4'2	168955	--

**Fig.IV.14. Cromatograma HPLC correspondiente al quelato FeEDDHA comercial recompuesto a pH 6'0 en presencia de Zn.**

**Pico 1: isómero d,l-racémico. Pico 2: isómero meso.**

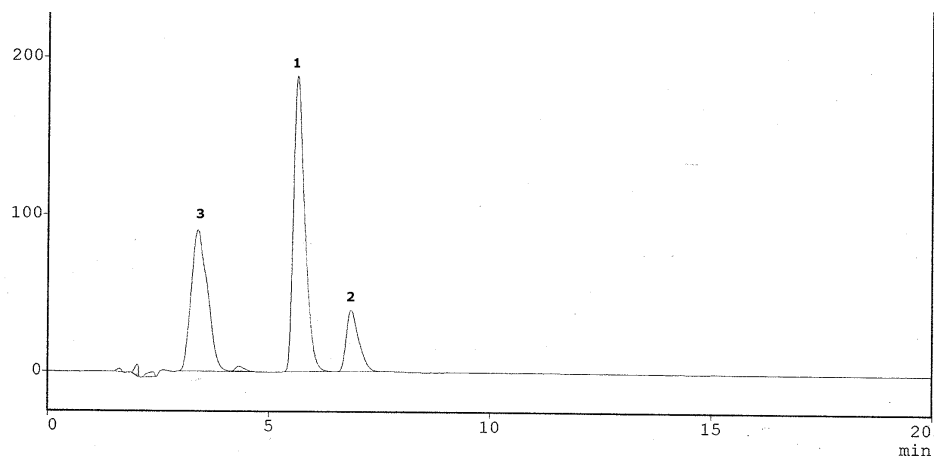
En el cromatograma de HPLC de la disolución de FeEDDHA comercial recompuesta en presencia de Zn, además de los picos de los isómeros d,l-racémico y meso (picos 1 y 2 respectivamente), también aparecen los picos de los agentes quelantes no (o-EDDHA) que este producto contiene en su

formulación (pico 3 y 4) (Fig.IV.14). Tras comparar el área de los picos 3 y 4 (Fig.IV.14) con las que presentan en el cromatograma de la disolución que se ha sometido a un proceso de descomposición-recomposición en ausencia de iones competidores (Fig.IV.12), se observa que la presencia de Zn en el medio ha incrementado ligeramente las pérdidas de estos dos compuestos con respecto a las que se producen por el efecto de las recomposición, siendo el compuesto que da lugar al pico 4 el más afectado.

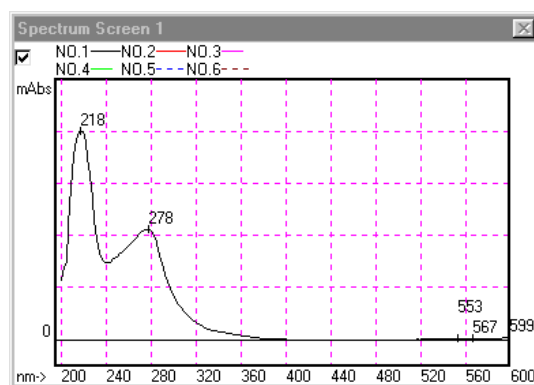
De acuerdo con los datos recogidos en la Tabla.IV.3 la estabilidad del FeEDDHA comercial frente al ión Zn es muy superior a la del estándar, ya que a pesar de que contiene Zn en su formulación y de que el NQ de ésta disolución es el doble que la del quelato estándar (lo que debería producir una mayor pérdida de Fe quelado (Bermúdez et al., 1999)), la recomposición del quelato comercial es 1'7 veces superior. El menor efecto del Zn en la recomposición del producto comercial puede ser debido a que el exceso de Fe no (o-EDDHA) que contiene ese quelato contribuya a disminuir los efectos que el ión produce sobre la estabilidad del quelato e incluso que los agentes quelantes no (o-EDDHA) hayan reaccionado con el Zn evitando la competencia entre este ión y el  $\text{Fe}^{3+}$  por el quelante (o-EDDHA).

### **Efecto de la presencia del ión Cu en la disolución**

Del análisis del cromatograma de HPLC correspondiente al quelato estándar recompuesto en presencia de Cu (Fig.IV.15) se deduce que la concentración de los isómeros d,l-racémico y meso ( $8'4 \cdot 10^{-4}$  M y  $2'0 \cdot 10^{-4}$  M respectivamente) se ha reducido considerablemente con respecto a la que presentan en la disolución de FeEDDHA estándar que no se ha sometido a recomposición ( $9'7 \cdot 10^{-4}$  M para el d,l-racémico y  $8'2 \cdot 10^{-4}$  M para el meso) (Fig.IV.1), así como con respecto a la disolución recompuesta en ausencia de Cu ( $9'6 \cdot 10^{-4}$  M para el d,l-racémico y  $8'1 \cdot 10^{-4}$  M para el meso) (Fig.IV.11), siendo las pérdidas provocadas fundamentalmente por la descomposición del isómero de menor estabilidad.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	3279417	$8'4 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'8	769107	$2'0 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>4048524</b>	<b><math>1'04 \cdot 10^{-3}</math></b>
3	--	3'4	2288320	--



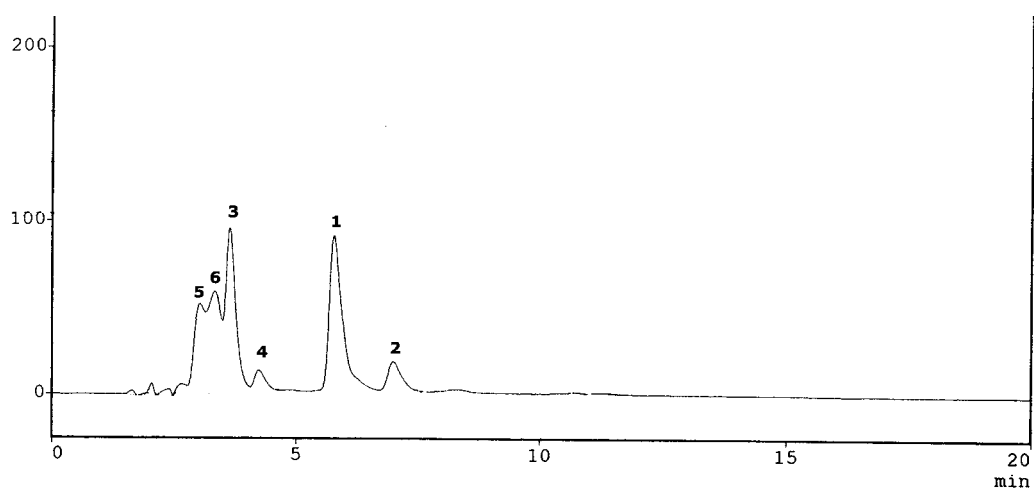
Pico 3

**Fig.IV.15. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis correspondientes al quelato FeEDDHA estándar recompuesto a pH 6'0 en presencia de Cu.  
Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso, Pico 3: CuEDDHA.**

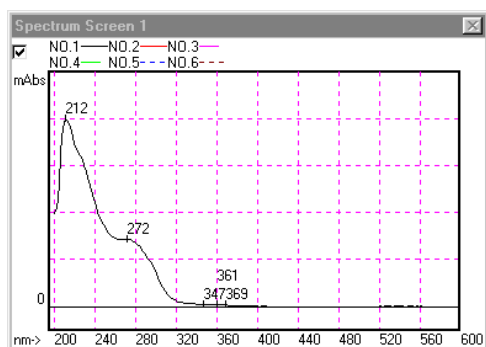
En la Fig.IV.15, además de los picos de los isómeros (picos 1 y 2) también aparece un tercer pico con un tiempo de elución de 3'4 min y cuyo espectro UV-Vis coincide con el del patrón de CuEDDHA (Fig.IV.2). Como la recomposición del isómero meso (24'3%) ha sido inferior a la del d,l-racémico (86'9%), es lógico pensar el quelato de Cu se formará principalmente con la forma meso del agente quelate (o-EDDHA) libre. Por tanto, una vez descompuesto el FeEDDHA (pH 1) la unión  $\text{Cu}^{2+}$  con el isómero meso (o-EDDHA) debe ser más rápida que con el hierro.

En la Fig.IV.16 se estudia el comportamiento del FeEDDHA comercial cuando se somete a recomposición hasta pH 6'0 en presencia de Cu. Como se puede observar, la concentración de quelato ( $5'19 \cdot 10^{-4}$  M) se ha reducido considerablemente con respecto a la que existía inicialmente en la disolución ( $9'83 \cdot 10^{-4}$  M) (Fig.IV.9) e incluso con respecto a la obtenida tras la recomposición del quelato en ausencia de iones competidores ( $9'55 \cdot 10^{-4}$  M) (Fig.IV.12). Es de destacar que aunque ambos isómeros se ven afectados por la presencia de este ión competidor, es el menos estable, es decir el meso, el que sufre mayores pérdidas recomponiéndose únicamente un 18'6% frente al 86'1% del d,l-racémico (Tabla.IV.3).

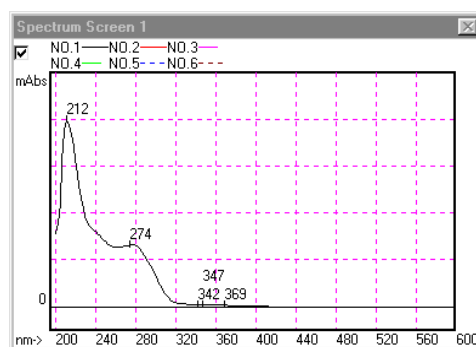
Al comparar el cromatograma de la Fig.IV.16 con el obtenido para la disolución de FeEDDHA comercial que no ha sufrido variaciones de pH (Fig.IV.9), se observan que el proceso de descomposición-recomposición de quelato en presencia de Cu ha dado lugar a la formación de dos nuevos picos, uno a 3'0 min (pico 5) y otro a 3'3 min (pico 6) cuyos espectros UV-Vis (Fig.IV.16) coinciden con el del patrón de CuEDDHA (Fig.IV.2). También aparecen los picos 3 y 4 correspondientes a los agentes quelates no (o-EDDHA). El proceso de recomposición en presencia de Cu ha provocado que sus áreas se reduzcan considerablemente, sobre todo en el caso del pico 4.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'7	1693804	$4'30 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'0	349849	$0'89 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>2043653</b>	<b><math>5'19 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'6	1425378	--
4	--	4'2	193917	--
5	--	3'0	818024	--
6	--	3'3	1101495	--



Pico 5



Pico 6

**Fig.IV.16. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes al FeEDDHA comercial recompuesto a pH 6'0 en presencia de Cu.**

**Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso; Pico 5 y 6: CuEDDHA.**

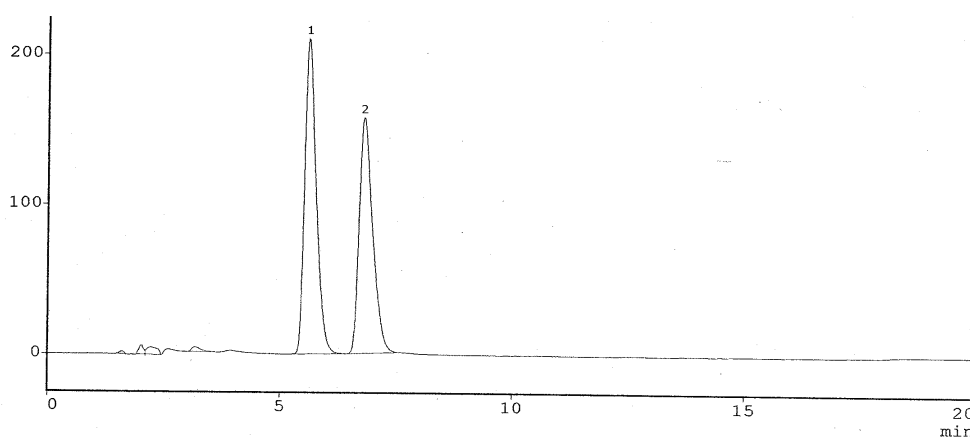
A pesar de que el quelato comercial contiene Cu en su formulación y de que el NQ es prácticamente el doble que el de la disolución de FeEDDHA estándar, el comportamiento de ambos quelatos frente al Cu es bastante similar (Tabla.IV.3). En los estudios realizados por Bermúdez et al. (1999) se determinó que la relación entre la pérdida de quelato y el valor de NQ se ajustaba a una función hiperbólica que a valores de NQ muy altos, sigue una trayectoria asintótica cuyo límite superior es el porcentaje máximo de quelato que puede destruirse en presencia de algún ión competidor. De acuerdo con estos resultados, si los valores de NQ de esta experiencia estuvieran próximos a ese máximo de descomposición del quelato, se podría explicar que aunque los NQ de las disoluciones de estos dos quelatos fuesen distintos, no existan grandes diferencias en su comportamiento.

### **Efecto de la presencia del ión Ni en la disolución**

En el cromatograma de HPLC correspondiente al FeEDDHA estándar recompuesto en presencia de Ni (Fig.IV.17), sólo aparecen los picos de los isómeros que componen el quelato. Al comparar las áreas dichos picos con las obtenidas para el FeEDDHA estándar que no se ha sometido a un proceso de descomposición-recomposición (Fig.IV.1), se deduce que ambos isómeros presentan una elevada estabilidad frente a este ión competidor. De hecho, el Ni es el catión que menos pérdidas de FeEDDHA estándar ha producido, recuperándose un 98'2% del quelato que se había adicionado inicialmente en la disolución.

Por otro lado, en el cromatograma de HPLC del quelato comercial recompuesto en presencia de Ni (Fig.IV.18) aparecen los picos de los isómeros que componen este quelato (picos 1 y 2), los cuales se han visto afectados en mayor medida que los del FeEDDHA estándar. Como se observa en la Tabla.IV.3 y en la Fig.IV.18, es de nuevo el isómero menos estable el que sufre una mayor descomposición. En este cromatograma (Fig.IV.18) también se observan los dos picos característicos del producto

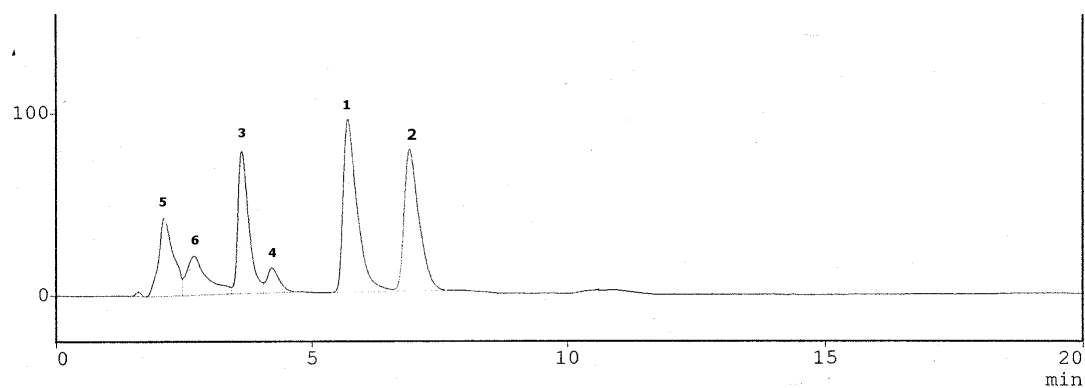
comercial (picos 3 y 4), un pico a 2'1 min (pico 5) y otro a 2'7 min. (pico 6). Tras comparar los espectros UV-Vis de los picos 5 y 6 (Fig.IV.18) con los del patrón NiEDDHA (Fig.IV.4) se deduce que el pico 6 es debido a la formación del quelato de Ni en la disolución. Con respecto al pico 5, su tiempo de elución y espectro UV-Vis también coinciden con el del pico 1 del cromatograma del NiEDDHA (Fig.IV.4) el cual, como se mencionó en el Ensayo 0, puede ser debido a la presencia de algún compuesto de Ni no (o-EDDHA) en disolución.



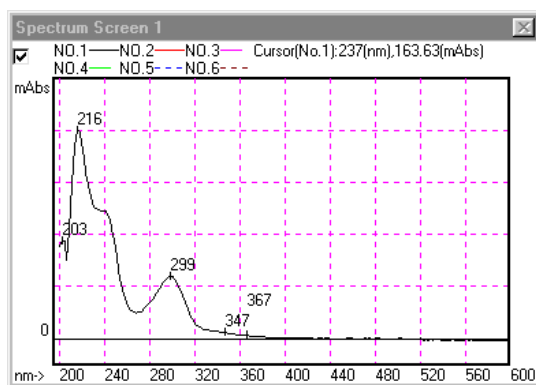
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	3635510	$9'3 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'8	3158407	$8'1 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>6793917</b>	<b><math>1'74 \cdot 10^{-3}</math></b>

**Fig.IV.17. Cromatograma de HPLC correspondiente a FeEDDHA estándar recompuesto a pH 6'0 en presencia de Ni.**

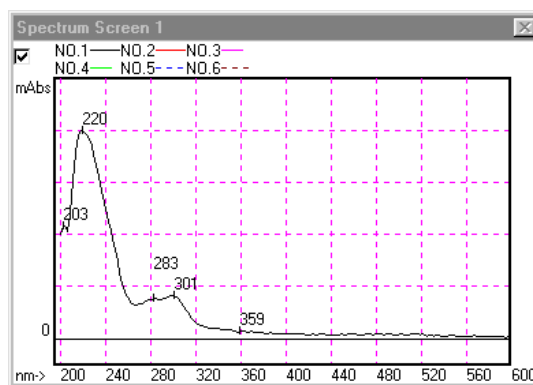
**Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso.**



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'7	1789268	$4'56 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'9	1578189	$4'03 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3367457</b>	<b><math>8'59 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'6	1168046	--
4	--	4'2	226728	--
5	--	2'1	853269	--
6	--	2'7	605854	--



Pico 5



Pico 6

Fig.IV.18. Cromatograma de HPLC y Espectros UV-Vis correspondientes al FeEDDHA comercial recompuesto a pH 6'0 en presencia de Ni.

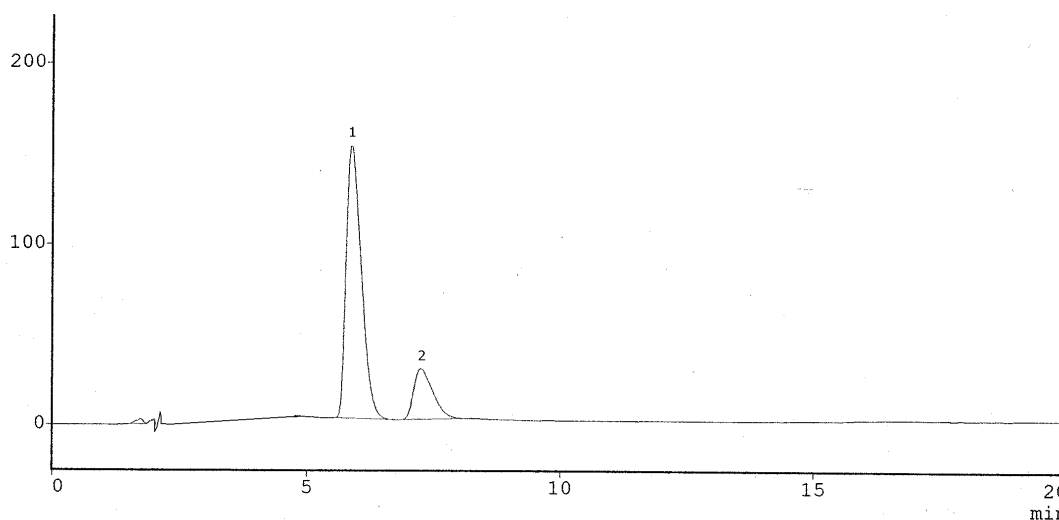
Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso, Picos 5 y 6: NiEDDHA.



**Efecto de la presencia del ión fosfato en la disolución**

En la Fig.IV.19 se analiza el comportamiento del FeEDDHA estándar cuando se recompone hasta pH 4'5 en presencia del ión fosfato. En ella destaca la importante reducción que ha sufrido el isómero meso con respecto a la concentración que presentaba en la disolución inicial de quelato (Fig.IV.1). En lo referente al isómero d,l-racémico, también se ha visto afectado por el proceso de recomposición aunque en menor medida que el meso (Fig.IV.19 y Tabla.IV.3).

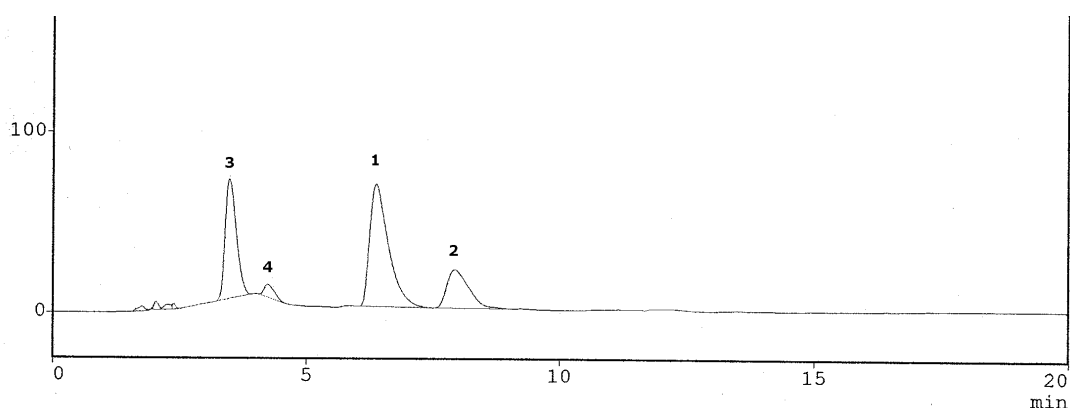
De acuerdo con los resultados mostrados en la Fig.IV.19 y en la Tabla.IV.3, se podría decir que la influencia que el ión fosfato tiene sobre el FeEDDHA estándar a pH 4'5 es similar a la que produce el Cu o el Zn a pH 6'0 (Fig.IV.13 y IV.15 y Tabla.IV.3).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'9	3173811	$8'10 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'2	730890	$1'87 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3904701</b>	<b><math>9'97 \cdot 10^{-4}</math></b>

**Fig.IV.19. Cromatograma HPLC correspondiente a FeEDDHA estándar recompuesto a pH 4'5 en presencia de P. Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso.**

Respecto al quelato comercial, cuando se somete a un proceso de recomposición en presencia del ión fosfato, se obtiene un cromatograma de HPLC en el que aparecen los dos picos de los isómeros d,l-racémico y meso (picos 1 y 2) y aquellos correspondientes a los agentes quelantes no (o-EDDHA) que contiene este producto (picos 3 y 4) (Fig.IV.20). Cabe señalar que las áreas de los picos 1 y 2 se han reducido considerablemente con respecto a las encontradas en la disolución de quelato que no se ha sometido a procesos de descomposición-recomposición (Fig.IV.9). Al igual que en los casos anteriores, el isómero más afectado es el meso (Fig.IV.20) es decir, el de menor constante de estabilidad, con un porcentaje de recomposición del 33'6% frente al 89'2% del d,l-racémico (Tabla.IV.3)



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	6'3	1754000	$4'46 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'9	633180	$1'61 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>2387180</b>	<b><math>6'07 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'4	1024743	--
4	--	4'2	98821	--

**Fig.IV.20. Cromatograma HPLC correspondiente al FeEDDHA comercial recompuesto a pH 4,5 en presencia de P.**

**Pico 1: isómero d,l-racémico. Pico 2: isómero meso.**

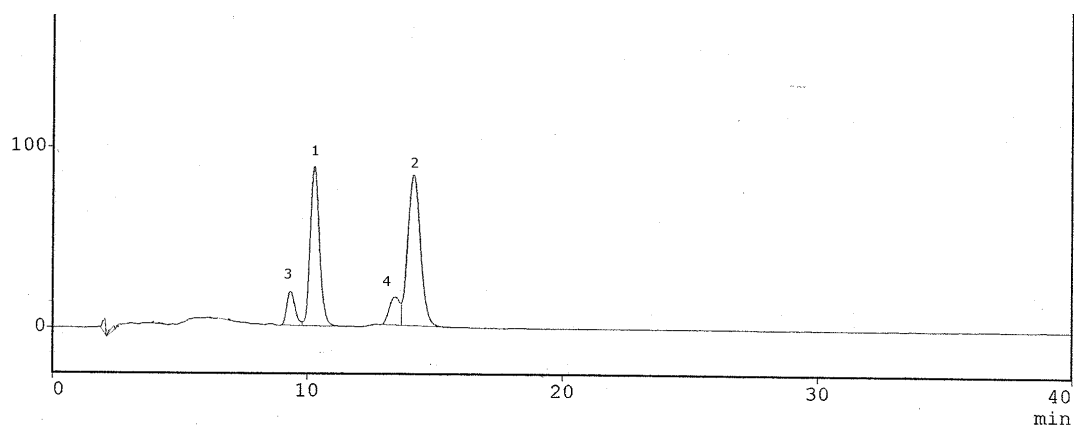
Es de destacar que aunque en la disolución con FeEDDHA comercial el valor de NQ en presencia de P es 1'8 veces mayor que en la disolución con FeEDDHA estándar (Tabla.IV.2), el porcentaje de recomposición del producto comercial (62'0%) es superior al del quelato estándar (56'3%) (Tabla.IV.3), lo que indica que el primero es más estable a la presencia de P. Este hecho puede deberse a que en el caso del quelato comercial, el ión fosfato haya reaccionado con el hierro no (o-EDDHA) o con el resto de iones metálicos solubles presentes en la disolución, disminuyendo así la competencia entre este anión y el agente quelante (o-EDDHA) por el Fe y por tanto, reduciendo las pérdidas de quelato.

De los datos expuestos hasta el momento se deduce que la recomposición de ambos quelatos se ve afectada por la presencia de Cu, Ni, Zn y P, siendo mayor el efecto sobre el isómero meso, ya que es el menos estable.

### **IV.2.2.2. Procesos de descomposición-recomposición del FeEDDHMA comercial en presencia de iones competidores.**

En el cromatograma correspondiente a la disolución de FeEDDHMA comercial recompuesto hasta pH 6'0 en ausencia de iones interferentes (Fig.IV.21), aparecen los dos picos de los isómeros del FeEDDHMA (picos 1 y 2) y los del quelato FeEDDH<sub>4,6</sub>MA presente este producto comercial (picos 3 y 4) (Álvarez-Fernández et al., 2002), con iguales tiempos de retención y espectros UV-Vis que los del FeEDDHMA que no se ha sometido a un proceso de descomposición-recomposición (Fig.IV.10).

A diferencia de lo observado para el FeEDDHA comercial, la estabilidad del FeEDDHMA que se ha sometido a recomposición hasta pH 6'0 no parece verse afectada, ya que el porcentaje de quelato recuperado es del 100% (Tabla.IV.4). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bermúdez et al. (1999).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	10'2	2238988
2	d,l-racémico	14'1	2986874
	<b>Total</b>	--	<b>5225862</b>
3	--	9'3	426783
4	--	13'4	452928

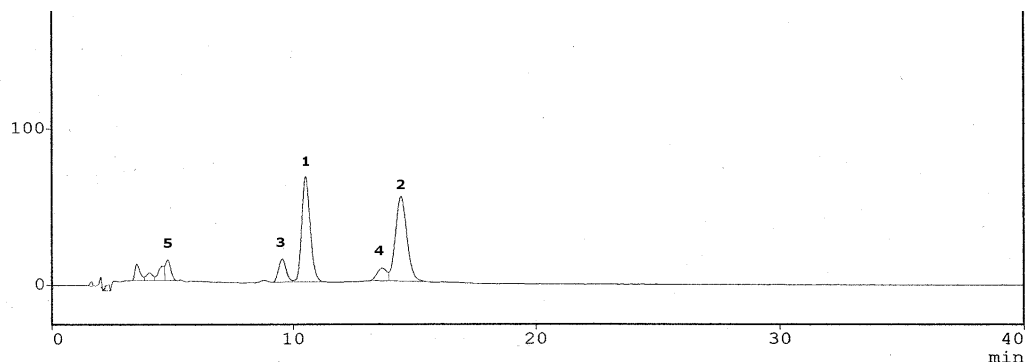
**Fig.IV.21. Cromatograma de HPLC correspondiente al quelato FeEDDHMA comercial recompuesto a pH 6'0. Pico 1: isómero meso; Pico 2 : isómero d,l-racémico.**

### **Efecto de la presencia del ión Zn en la disolución**

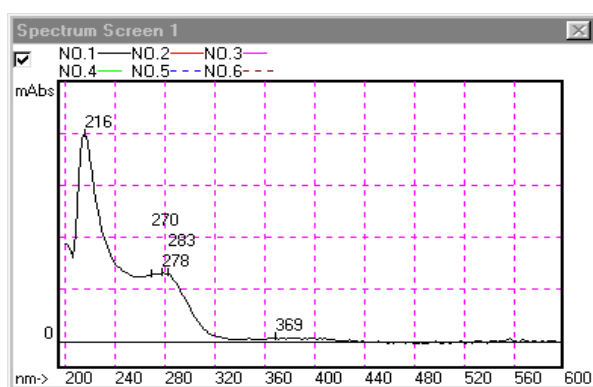
Cuando el FeEDDHMA comercial se recompone en presencia de Zn, se obtiene un cromatograma de HPLC (Fig.IV.22) en el que se observa una importante reducción del área de los picos de los isómeros de este quelato (picos 1 y 2). Es de destacar que aunque ambos isómeros se ven afectados, es el d,l-racémico, el menos estable, el que sufre una mayor descomposición, recuperándose únicamente un 60'7% frente al 72'7% del meso (Tabla.IV.4).

En la Fig.IV.22 se observa que la recomposición de quelato comercial cuando el ión Zn está en la disolución, ha provocado una reducción en los picos correspondientes al EDDH4,6MA (picos 3 y 4). Así, el pico 3 se ha

reducido en un 24'7% mientras que el 4 lo ha hecho en un 48'9% con respecto a los de la disolución inicial (Fig.IV.10). Además, también se ha formado un nuevo pico a 4'8 min el cual, por su espectro UV-Vis, podría corresponder a la presencia de ZnEDDHMA en disolución (Fig.IV.22 y Fig.IV.7)



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	10'5	1626079
2	d,l-racémico	14'4	1775511
	<b>Total</b>	--	<b>3401590</b>
3	--	9'5	319517
4	--	13'7	229399
5	--	4'8	209899



Pico 5

**Fig.IV.22. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis correspondientes al FeEDDHMA comercial recompuesto a pH 6'0 en presencia de Zn. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico; Pico 5: ZnEDDHMA.**

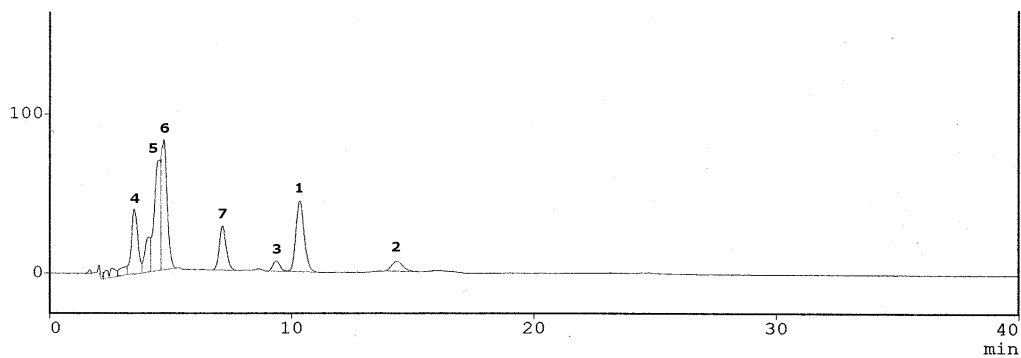
**Efecto de la presencia del ión Cu en la disolución**

En la Fig.IV.23 se muestra la recomposición de FeEDDHMA comercial en presencia de Cu. En ella aparecen los picos correspondientes a los isómeros del quelato de Fe (pico 1 a 10'3 min y pico 2 a 14'4 min), los cuales se han visto fuertemente afectados, presentando unos porcentajes de recomposición del 47'9% para el meso y del 7'0% para el d,l-racémico (Tabla.IV.4). También se observa un conjunto de picos a tiempos de elución entre 3 y 7 min. que por sus espectros UV-Vis (Fig.IV.23), podrían corresponder a la formación del CuEDDHMA en la disolución (Fig.IV.6). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bermúdez et al. (1999) para este mismo quelato comercial en presencia de Cu.

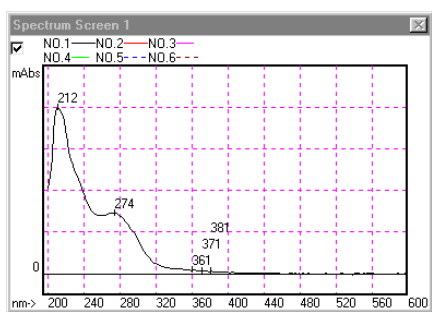
De la comparación del cromatograma de HPLC de la disolución del quelato comercial que no se ha sometido a variaciones de pH (Fig.IV.10) con el de la Fig.IV.23, se deduce que las áreas de los picos de EDDH4,6MA se han visto seriamente afectadas. De esta forma, el pico 4 (Fig.IV.10) ha desaparecido tras la recomposición en presencia de Cu (Fig.IV.23) y el pico 3 ha sufrido una reducción del 68'5%.

**Efecto de la presencia del ión Ni en la disolución**

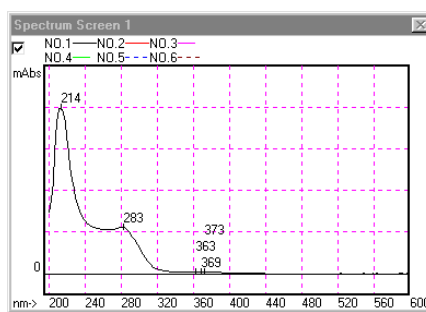
En la Fig.IV.24 se muestra el comportamiento del quelato FeEDDHMA cuando se recompone en presencia de Ni. Del análisis de los datos expuestos en dicha figura se concluye que las pérdidas de Fe quelato producidas por este proceso de recomposición son pequeñas, recuperándose el 90'0% del quelato que se había adicionado inicialmente a la disolución (Tabla.IV.4). De los dos isómeros, el que ha sufrido una mayor descomposición es el menos estable, es decir, el d,l-racémico (Fig.IV.24 y Tabla.IV.4).



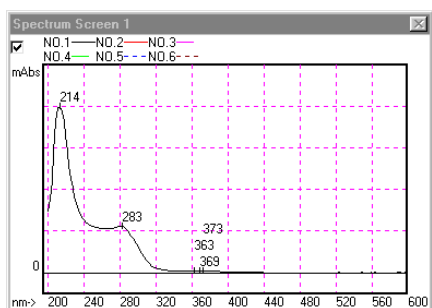
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	10'3	1072615
2	d,l-racémico	14'4	204293
	<b>Total</b>	--	<b>1276908</b>
3	--	9'3	133583
4	--	3'5	767726
5	--	4'5	1243463
6	--	4'7	1338418
7	--	7'1	549189



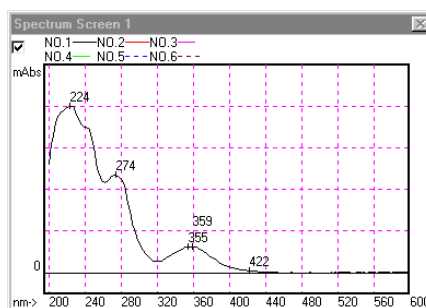
Pico 4



Pico 5

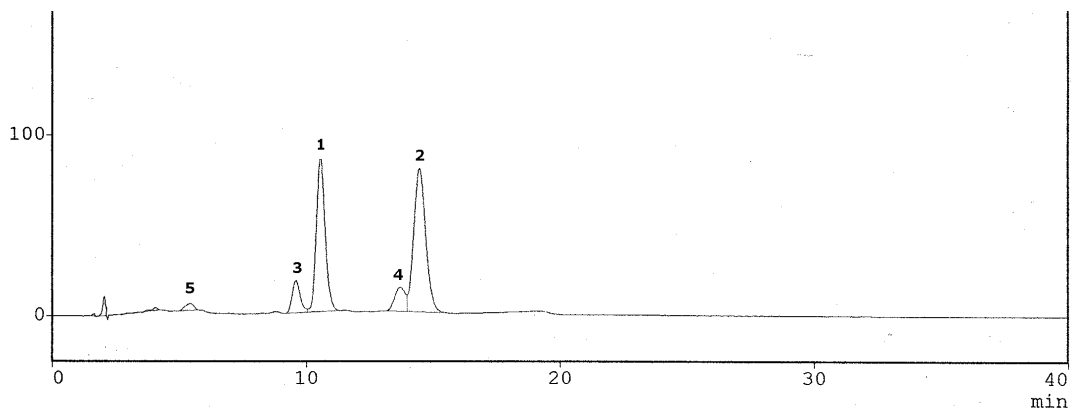


Pico 6

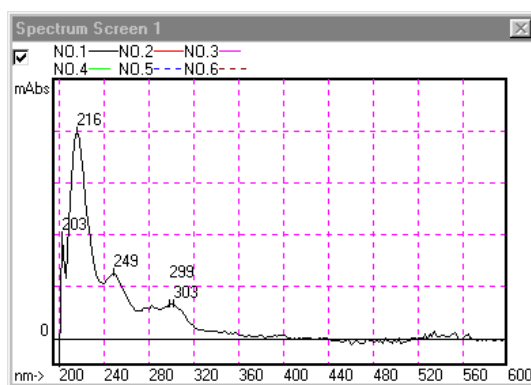


Pico 7

Fig.IV.23. Cromatograma HPLC correspondiente a FeEDDHMA comercial recompuesto a pH 6'0 en presencia de Cu. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	10'5	2060592
2	d,l-racémico	14'5	2582989
	<b>Total</b>	--	<b>4643581</b>
3	--	9'5	392299
4	--	13'7	379829
5	--	5'4	90730



Pico 5

**Fig.IV.24. Cromatograma HPLC y Espectro UV-Vis correspondientes a FeEDDHMA comercial recompuesto a pH 6'0 en presencia de Ni. Pico 1:isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico, Pico 5: NiEDDHMA.**



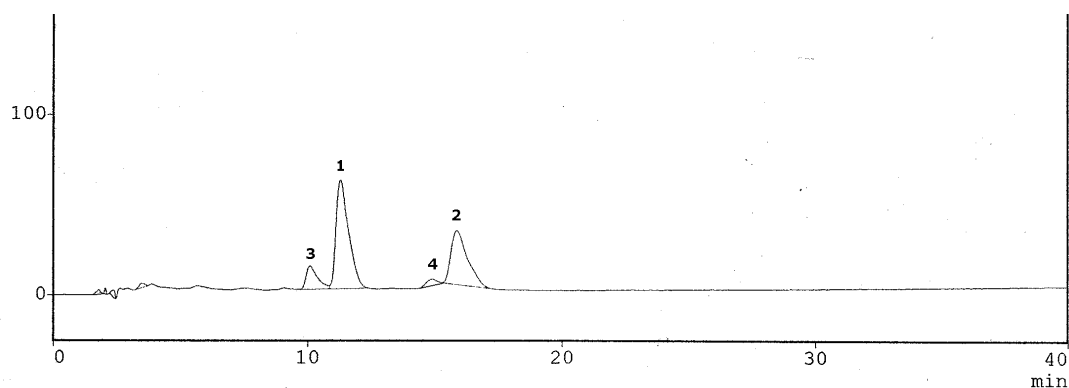
Es de destacar que a pesar de que las pérdidas de FeEDDHMA son mínimas, en el cromatograma de HPLC se detecta un pequeño pico a 5'4 min. (pico 5) que por su tiempo de elución y su espectro UV-Vis (Fig.IV.24) se ha identificado como NiEDDHMA (Fig.IV.8).

En relación al EDDH4,6MA que este producto contiene en su formulación (picos 3 y 4) (Fig.IV.24) prácticamente no se han visto afectados por la presencia de Ni en la disolución ya que, el área de los picos 3 y 4 (Fig.IV.24) únicamente se ha reducido un 7'5 y un 8'5% con respecto a la de estos mismos picos en la Fig.IV.10

### **Efecto de la presencia del ión fosfato en la disolución**

En el cromatograma de HPLC del FeEDDHMA comercial recompuesto cuando el ión fosfato está en la disolución (Fig.IV.25), se observan que los picos de los isómeros que componen este quelato (picos 1 y 2) han reducido su área con respecto a la que presentaban en la disolución inicial (Fig.IV.10). Cabe señalar, que las pérdidas de Fe quelado son debidas principalmente a la descomposición del isómero d,l-racémico puesto que sólo se recupera el 45'2% frente al 93'1% del meso (Tabla.IV.4).

En cuanto a los picos correspondientes al EDDHA4,6MA (pico 3 y 4 Fig.IV.25) también se han visto afectados por la presencia del ión fosfato, siendo el compuesto que da lugar al pico 4 (Fig.IV.25) el que ha sufrido una mayor descomposición (94'4%). Por el contrario, el pico 3 únicamente ha reducido su área en un 6'1%.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	11'3	2081963
2	d,l-racémico	15'8	1321105
	<b>Total</b>	--	<b>3403068</b>
3	--	10'1	397896
4	--	14'7	25845

**Fig.IV.25. Cromatograma HPLC correspondiente al FeEDDHMA comercial recompuesto a pH 4'5 en presencia de P. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**

**Tabla.IV.4.Porcentajes de recomposición de los isómeros d,l-racémico y meso del quelato de FeEDDHMA.**

FeEDDHMA comercial	isómero	% recomposición	FeEDDHMA comercial	isómero	% recomposición
FeEDDHMA recompuesto pH 6'0	Meso	100'1	FeEDDHMA recompuesto pH 6'0 + Cu	Meso	47'9
	Racémico	102'2		Racémico	7'0
	<b>Total</b>	<b>101'3</b>		<b>Total</b>	<b>24'7</b>
FeEDDHMA recompuesto pH 4'5	Meso	95'8	FeEDDHMA recompuesto pH6'0 + Zn	Meso	72'7
	Racémico	93'9		Racémico	60'7
	<b>Total</b>	<b>94'8</b>		<b>Total</b>	<b>65'9</b>
FeEDDHMA recompuesto pH 4'5 + P	Meso	93'1	FeEDDHMA recompuesto pH 6'0 + Ni	Meso	92'1
	Racémico	45'2		Racémico	88'3
	<b>Total</b>	<b>65'9</b>		<b>Total</b>	<b>90'0</b>

## **Conclusiones**

Una vez analizado el comportamiento de los tres quelatos en estudio frente a las condiciones del ensayo, se llega a las siguientes conclusiones:

- El proceso de descomposición-recomposición cuando no están presentes iones competidores no afecta prácticamente a los isómeros de FeEDDHA y FeEDDHMA.
- De los dos isómeros que componen los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA, el que se ve más afectado por la recomposición en presencia de iones competidores es el de menor estabilidad, es decir, el meso para FeEDDHA y el d,l-racémico para FeEDDHMA, siendo el Cu el ión que produce mayores pérdidas en todos los casos.
- Únicamente se ha observado la formación de los quelatos de los iones competidores Cu, Zn, y Ni en aquellos casos en los que el proceso de descomposición-recomposición de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA ha implicado importante pérdida de Fe (o-EDDHA/MA).

### **IV.3. ENSAYO 2: EFECTO DE LA PRESENCIA CONJUNTA DE LOS IONES COMPETIDORES EN LA ESTABILIDAD DE LOS ISÓMEROS DE FeEDDHA Y FeEDDHMA .**

Una vez establecido el efecto que cada ión por separado tiene sobre la estabilidad de los isómeros de FeEDDHA y FeEDDHMA, se estudió como afecta la presencia conjunta de todos los iones que constituyen una disolución nutritiva, y si el porcentaje de quelato recompuesto, además de depender de la proporción entre nutrientes (NQ) y del valor de pH (Bermúdez et al., 1999), también se ve influenciado por la concentración a la que se prepare esta disolución.

#### **IV.3.1. Materiales y métodos.**

La experiencia se llevó a cabo con los mismos quelatos (FeEDDHA estándar y comercial y FeEDDHMA comercial) y a los mismos valores de pH (pH 6'0 y 4'5) con los que se trabajó en el Ensayo 1.

En la Tabla.IV.5 se muestra la composición y la fuerza iónica ( $\mu$ ) de las tres disoluciones que se emplearon en el estudio (Martínez y García, 1993). En ellas se mantuvo la proporción entre nutrientes (NQ) aunque se variaron las concentraciones a las que se adicionaron los distintos iones que las componen. De esta forma, la disolución **A** es 5 veces más concentrada que la **B** y 33 veces más que la **C**.

Como se indica en la Tabla.IV.5, los cationes se añadieron como cloruros, y el P en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , todos ellos de la firma comercial Panreac (purísimo).

Las disoluciones nutritivas se prepararon mezclando volúmenes adecuados de disoluciones de cada uno de los compuestos recogidos en la Tabla.IV.5, siendo los quelatos los últimos en adicionarse y ajustando posteriormente, el pH a los valores en estudio (6'0 y 4'5).

Alícuotas de estas disoluciones se sometieron a un proceso de descomposición-recomposición. Para ello, las disoluciones se llevaron a pH 1 con HCl (para análisis-ACS-ISO, Panreac), y se dejaron reaccionar durante una hora en oscuridad. Pasado este tiempo, se llevaron de nuevo hasta los valores de pH en estudio (pH 6'0 y 4'5) con NaOH (para análisis-ACS-ISO, Panreac).

**Tabla IV.5. Composición de las disoluciones nutritivas**

<b>Compuestos</b>	<b>Conc. A (M) <math>\mu=1'582</math></b>	<b>Conc. B (M) <math>\mu=0'316</math></b>	<b>Conc. C (M) <math>\mu=0'047</math></b>	<b>NQ</b>
<b>FeEDDHA estándar</b>	$1'79 \cdot 10^{-3}$	$3'58 \cdot 10^{-4}$	$5'37 \cdot 10^{-5}$	1'00
<b>FeEDDHA comercial</b>	$1'79 \cdot 10^{-3}$	$3'58 \cdot 10^{-4}$	$5'37 \cdot 10^{-5}$	1'00
<b>FeEDDHMA comercial</b>	$1'79 \cdot 10^{-3}$	$1'79 \cdot 10^{-3}$	$1'79 \cdot 10^{-3}$	1'00
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0'375	$7'50 \cdot 10^{-2}$	$1'12 \cdot 10^{-2}$	209'5
<b>MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	0'135	$2'70 \cdot 10^{-2}$	$4'05 \cdot 10^{-3}$	75'42
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0'05	0'01	$1'50 \cdot 10^{-3}$	27'93
<b>CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	$5'37 \cdot 10^{-5}$	$1'07 \cdot 10^{-5}$	$1'61 \cdot 10^{-6}$	0'03
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	$6'09 \cdot 10^{-4}$	$1'22 \cdot 10^{-4}$	$1'83 \cdot 10^{-5}$	0'34
<b>MnCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O</b>	$5'37 \cdot 10^{-5}$	$1'07 \cdot 10^{-5}$	$1'61 \cdot 10^{-6}$	0'03

En las disoluciones se determinaron, mediante HPLC, la concentración de hierro quelado y de cada uno de los isómeros presentes en las mismas así como, la posible formación de los quelatos de los iones competidores.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el método estadístico del análisis de la variancia de una vía y los tests de Tukey y Duncan para lo cual se empleó el programa informático SPSS (versión 10.0.6). Cabe destacar que tras el tratamiento estadístico se consideraron que dos valores eran estadísticamente diferentes a un nivel de significación del 5%.

### IV.3.2. Resultados y discusión.

#### IV.3.2.1. Comportamiento del FeEDDHA estándar en disolución nutritiva.

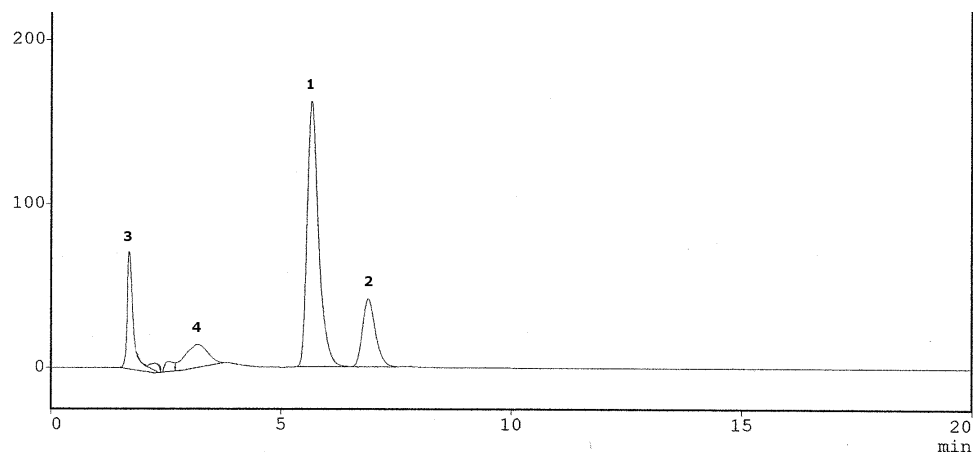
##### Disoluciones a pH 6'0

El estudio cromatográfico del comportamiento del FeEDDHA estándar en la disolución **A** a pH 6 se muestra en la Fig.IV.26. En ella se observa que la concentración de Fe (o-EDDHA) que permanece en la disolución ( $9'2 \cdot 10^{-4}$  M) es prácticamente la mitad de la que se había adicionado inicialmente ( $1'79 \cdot 10^{-3}$  M). Cabe señalar que aunque ambos isómeros se han visto afectados por la presencia de los iones competidores, las pérdidas son debidas principalmente a la descomposición del isómero meso (Fig.IV.26 y Tabla.IV.6)

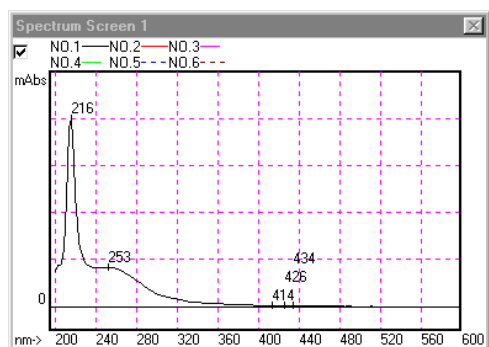
En el cromatograma de la Fig.IV.26, además de los picos de los isómeros (picos 1 y 2) se ha encontrado un pico a 3'2 min (pico 4) que tras comparar su espectro UV-Vis (Fig.IV.26) con los obtenidos para los distintos patrones (Ensayo 0) se deduce que es debido a la formación de CuEDDHA en el medio (Fig.IV.2). También se observa un pico a 1'7 min. (pico 3) el cual, presenta un tiempo de retención y un espectro UV-Vis que no coincide con ninguno de los patrones (Ensayo 0), por lo que no fue posible su identificación.

Por otro lado, cuando se comparan los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B** y **C** a pH 6'0 (Fig.IV.27 y Fig.IX.3 del Anexo.IX.1) con los obtenidos a partir los patrones de FeEDDHA estándar (Fig.IX.1 y IX.2 del Anexo.IX.1 respectivamente), se encuentra que la estabilidad de los isómeros d,l-racémico y meso no se ha visto afectada por la presencia de los iones que componen dichas disoluciones. Este hecho ha dado lugar a que el porcentaje de Fe quelado que permanece en disolución sea, en ambos casos, superior al 90% (Tabla.IV.7).

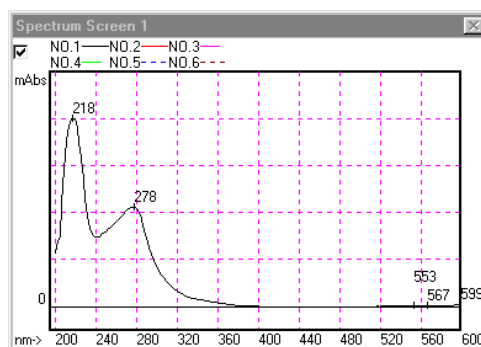
Es de destacar que aunque la disolución **B** es 6'7 veces más concentrada que la **C**, no se han encontrado diferencias significativas en la cantidad de quelato que existe en cada una de ellas (Tabla.IV.7).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	2815954	$7'2 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'9	802654	$2'0 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3618608</b>	<b><math>9'2 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	1'7	690663	--
4	--	3'2	496304	--



Pico 3



Pico 4

Fig.IV.26. Cromatograma HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución **A** a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso. Pico 4: CuEDDHA

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla.IV.7) se llega a la conclusión de que aunque en las 3 disoluciones nutritivas se mantiene el pH y los NQ, el porcentaje de Fe quelado que permanece en disolución depende de la fuerza iónica de las mismas. Así en la disolución nutritiva de mayor concentración (**A**) las pérdidas de Fe (o-EDDHA) son prácticamente el doble de las que presentan las disoluciones **B** y **C**.

**Tabla.IV.6. Comparación de la estabilidad de los isómeros que componen el quelato FeEDDHA en las disoluciones nutritivas a cada valor de pH . Datos porcentaje de Fe quelado.**

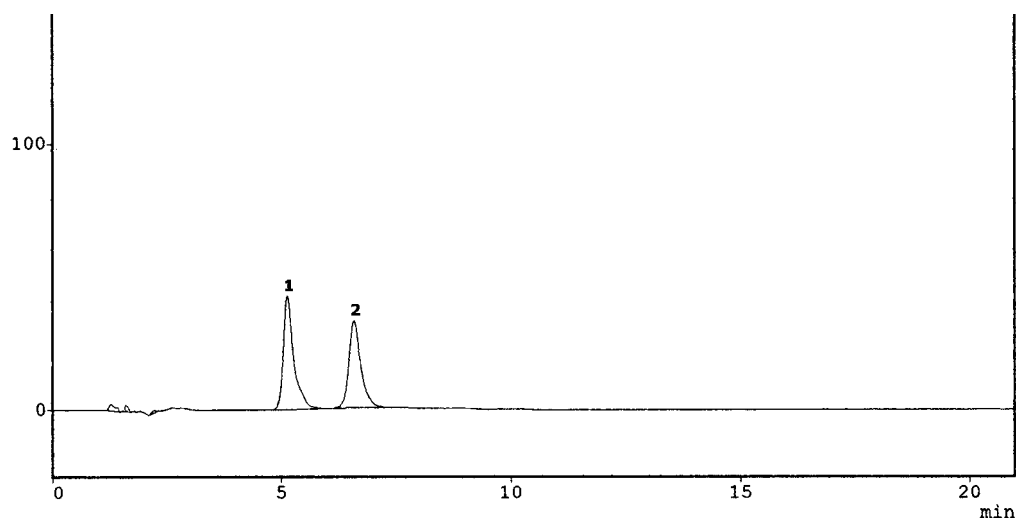
	Isómeros	D.N. A			D.N. B			D.N. C		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	racémico	74'0	19163	0'000	93'2	0'214	0'667	94'2	0'138	0'729
	meso	25'2			93'7			96'9		
pH 6'0 (R)	racémico	24'7	3691	0'000	68'8	26'70	0'007	86'2	0'052	0'832
	meso	8'0			47'8			85'4		
pH 4'5	racémico	93'0	153'9	0'000	98'2	16'420	0'015	95'3	0'139	0'728
	meso	56'6			92'7			94'3		
pH 4'5 (R)	racémico	29'1	345'2	0'000	88'8	124'67	0'000	95'6	121'68	0'000
	meso	4'6			79'5			87'8		

**Tabla.IV.7. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar en las distintas disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos Porcentaje de Fe quelado**

Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamientos	pH 6'0	pH 6'0 (R)	pH 4'5	pH 4'5 (R)
D.N. A	52'2 b	17'1 c	75'1 b	16'8 c
D.N. B	93'5 a	59'0 b	95'5 a	84'3 b
D.N. C	95'4 a	85'8 a	94'8 a	92'1 a
% FeEDDHA estándar en H <sub>2</sub> O	100'0	99'6	100'0	100'0





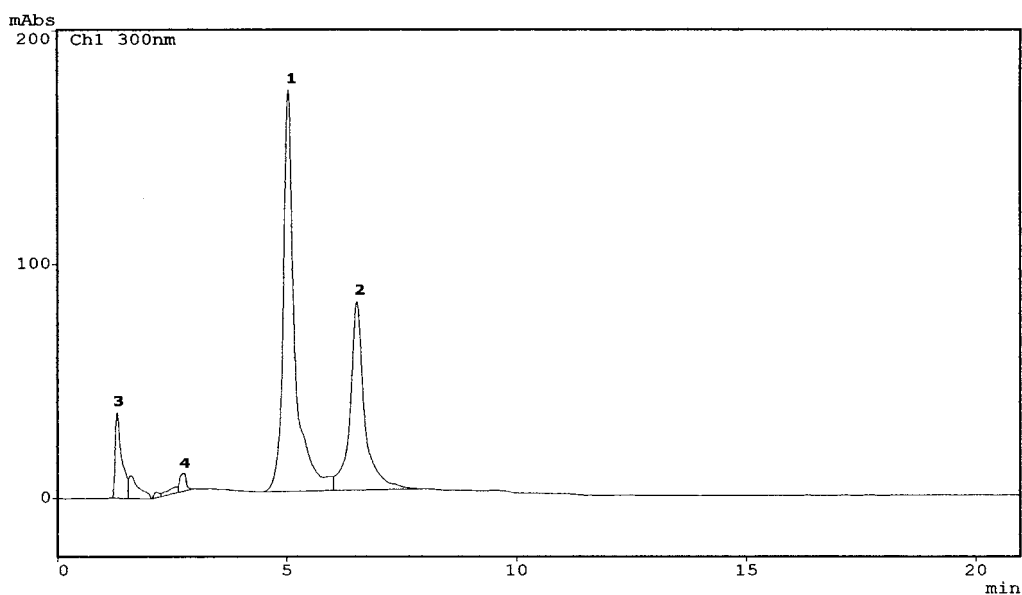
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'1	671546	$1'80 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'6	594925	$1'55 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1266471</b>	<b><math>3'35 \cdot 10^{-4}</math></b>

**Fig.IV.27. Cromatograma HPLC correspondiente a la disolución problema B a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.**

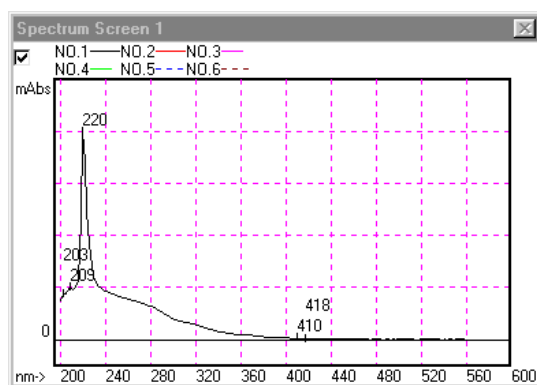
### Disoluciones a pH 4'5

En el cromatograma correspondiente a la disolución nutritiva **A** a pH 4'5 (Fig.IV.28), se observa que el área de los picos de los isómeros d,l-racémico y meso (picos 1 y 2) se ha reducido de forma importante con respecto a la que presentaban en la Fig.IV.1, siendo las pérdidas de meso (43'4%) superiores a las de d,l-racémico (7'0%) (Tabla.IV.6).

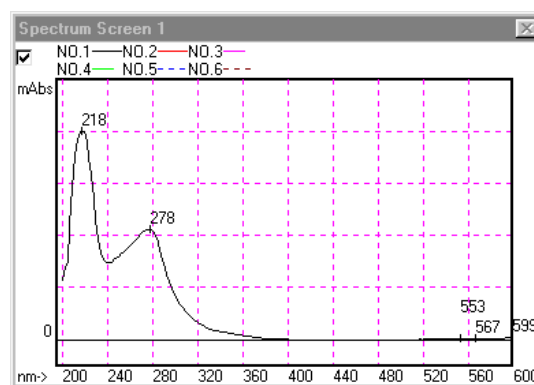
Del mismo modo, también se encuentra un conjunto de pequeños picos a tiempos de elución bajos (Fig.IV.28) de los cuales, el pico 4 por su espectro UV-Vis se ha identificado como CuEDDHA (Fig.VI.2). Como la pérdida de quelato de Fe es debida en gran parte a la descomposición del isómero de menor estabilidad, el CuEDDHA se formará principalmente de la forma meso del agente quelante (o-EDDHA) que ha quedado libre en la disolución.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'0	3204149	$8'7 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'5	1932996	$5'3 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>5137145</b>	<b><math>1'4 \cdot 10^{-3}</math></b>
3	--	1'3	31499	--
4	--	2'7	367296	--



Pico 3



Pico 4

Fig.IV.28. Cromatograma HPLC y-Espectros UV-Vis correspondientes a la disolución A a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso; Pico 4: CuEDDHA

Cabe señalar que la pequeña diferencia en los tiempos de elución encontrada entre la disolución **A** a pH 4'5 y el patrón CuEDDHA (Fig.IV.2) es debida a que se emplearon distintas columna cromatográficas.

Con respecto al pico 3, su tiempo de elución y espectro UV-Vis coinciden con los del pico 3 de la disolución **A** a pH 6'0 (Fig.IV.26), cuya identificación no ha sido posible.

Tras comparar la pérdida de quelato en la disolución de mayor concentración a los dos valores de pH en estudio, se encuentra que a pH 6'0 la descomposición es 1'5 veces mayor que a pH 4'5 (Tabla.IV.8). Por consiguiente, la estabilidad del FeEDDHA estándar en la disolución **A** que no se ha sometido un proceso de descomposición-recomposición es superior a pH 4'5 que a pH 6'0. Este hecho podría ser debido a que aunque ambos valores de pH están dentro del rango de estabilidad de los quelatos FeEDDHA (Halvorson y Lindsay, 1972), a pH 6'0 se produce la competencia de todos los cationes metálicos con el Fe por el agente quelante mientras que a pH 4'5, el ión que ejerce una mayor competencia es el fosfato (Bermúdez et al., 1999).

**Tabla.IV.8. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar a los diferentes valores de pH en las distintas disoluciones problema. Datos de concentración (M).** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Concentración de Fe quelado (M)	D.N.A	D.N. B	D.N. C
<b>pH 6'0</b>	9'24·10 <sup>-4</sup> <b>b</b>	3'35·10 <sup>-4</sup> <b>a</b>	4'95·10 <sup>-5</sup> <b>a</b>
<b>pH 6'0 recompuesto</b>	3'03·10 <sup>-4</sup> <b>c</b>	2'08·10 <sup>-4</sup> <b>c</b>	4'62·10 <sup>-5</sup> <b>a</b>
<b>pH 4'5</b>	1'40·10 <sup>-3</sup> <b>a</b>	3'42·10 <sup>-4</sup> <b>a</b>	5'45·10 <sup>-5</sup> <b>a</b>
<b>pH 4'5 recompuesto</b>	3'24·10 <sup>-4</sup> <b>c</b>	3'01·10 <sup>-4</sup> <b>b</b>	4'93·10 <sup>-5</sup> <b>a</b>

En relación al comportamiento del quelato FeEDDHA estándar en la disoluciones **B** y **C** a pH 4'5, decir que como ocurría a pH 6'0, la presencia conjunta de los diferentes iones competidores no parece afectar a la estabilidad de dicho quelato ya que en ambos casos, las pérdidas de Fe (o-EDDHA) son inferiores al 5% (Tabla.IV.7).

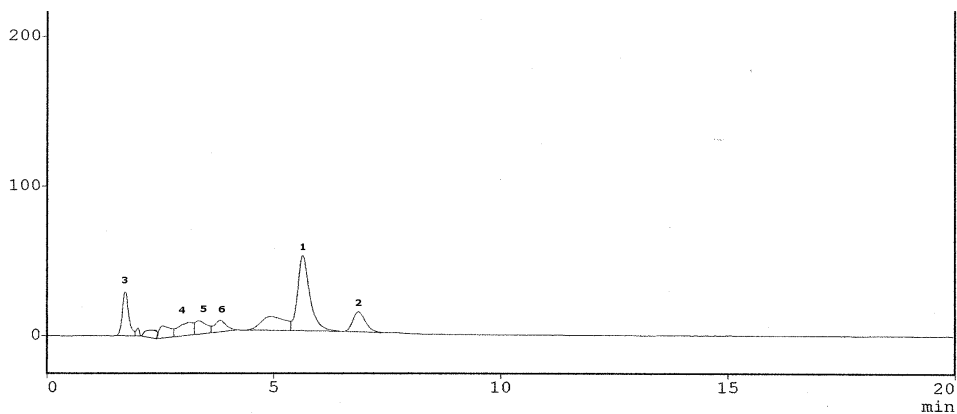
A la vista de los resultados expuestos en la Tabla.IV.7, no se han observado diferencias significativas entre el porcentaje de Fe quelado que permanece en la disolución de concentración intermedia y el obtenido para la más diluida. En consecuencia, la estabilidad del quelato en estas disoluciones será elevada, independiente de la concentración de las mismas.

De la comparación de la cantidad de FeEDDHA que presentan las disoluciones **B** y **C** a pH 4'5 con las obtenidas a pH 6'0 se encuentra que no existen diferencias significativas en el comportamiento de este quelato a los dos valores de pH en estudio (Tabla.IV.8).

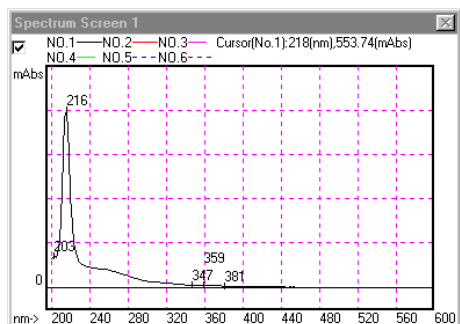
### **Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 6'0 del quelato FeEDDHA estándar en disolución nutritiva.**

Cuando el FeEDDHA estándar forma parte de la disolución nutritiva **A** y se somete a un proceso de descomposición-recomposición hasta pH 6'0, se obtiene una cromatograma de HPLC (Fig.IV.29) en el que destaca la gran descomposición que han sufrido los isómeros d,l-racémico y meso con respecto al patrón de FeEDDHA estándar (Fig.IV.1). Cabe señalar que la pérdida de quelato es tan elevada que únicamente se ha recompuesto un 17'1% del Fe (o-EDDHA) que había inicialmente en la disolución (Tabla.IV.7).

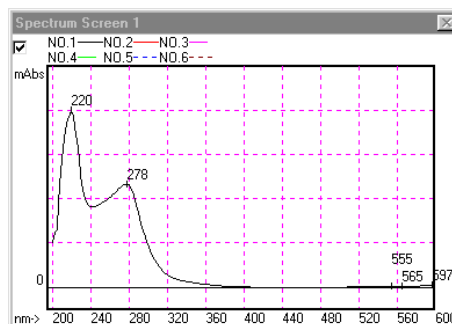
Esta gran descomposición ha dado lugar a que en la disolución exista una elevada concentración de agente quelante (o-EDDHA) libre, lo que se manifiesta con la formación de los quelatos CuEDDHA (pico 4), ZnEDDHA (pico 5) y MnEDDHA (pico 6) (Fig.IV.29).



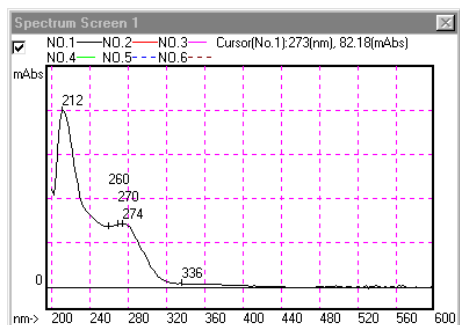
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	945412	$2'4 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'8	256319	$0'6 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1201731</b>	<b><math>3'0 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	1'7	290503	--
4	--	3'1	205628	--
5	--	3'3	156038	--
6	--	3'8	146532	--



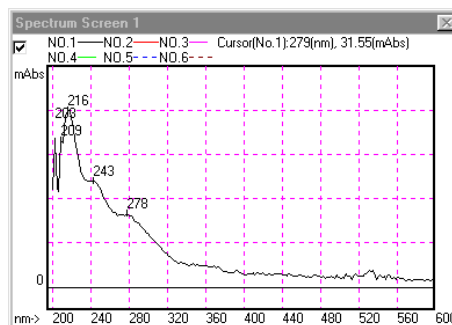
Pico 3



Pico 4



Pico 5



Pico 6

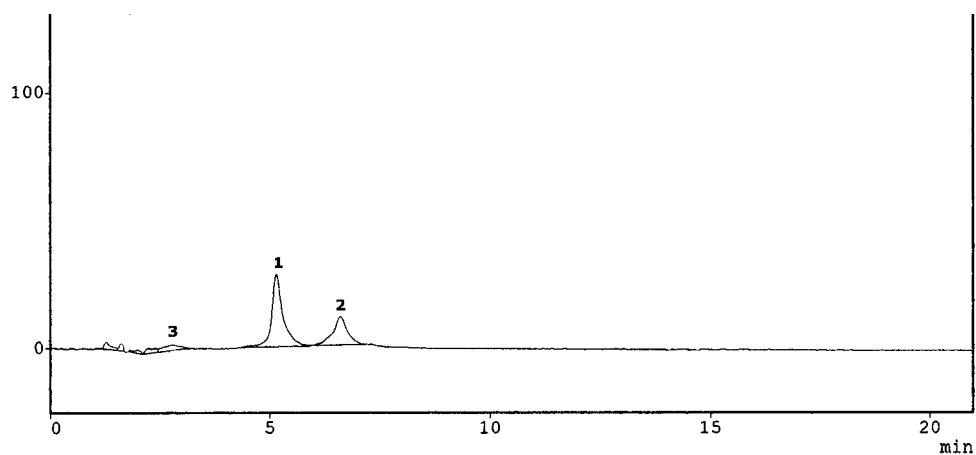
**Fig.IV.29. Cromatograma HPLC y Espectros UV-Vis correspondientes la disolución nutritiva A recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso; Pico 4: CuEDDHA; Pico 5: ZnEDDHA, Pico 6: MnEDDHA.**

Como ocurría en la disoluciones nutritivas que no se han sometido a recomposición, en el cromatograma de HPLC de la Fig.IV.29, también aparece un pico con un tiempo de elución de 1'7min (pico 3) el cual, no ha podido ser identificado.

Cuando la disolución de concentración intermedia (**B**) se recompone hasta pH 6'0, la estabilidad del quelato se ve afectada aunque en menor medida que en la disolución de mayor concentración, ya que se recompone el 59'0% del Fe (o-EDDHA) que se adicionó inicialmente (Tabla.IV.7). Aunque esta reducción es consecuencia de la descomposición de ambos isómeros (Fig.IV.30), las pérdidas en forma de isómero meso son estadísticamente superiores (Tabla.IV.6).

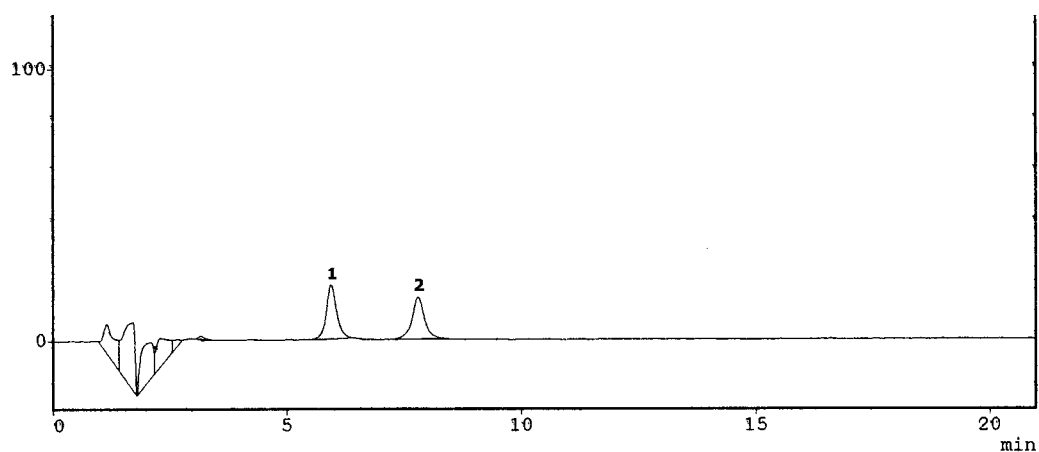
En el cromatograma de HPLC obtenido para la disolución **B** recompuesta hasta pH 6 (Fig.IV.30) se observa que además de los picos de los isómeros (Picos 1 y 2), también aparecen una serie de pequeños picos entre 1 y 3 min. La realización de un espectro UV-Vis a cada uno de ellos ha permitido determinar que el pico 3 corresponde a la formación CuEDDHA en la disolución.

En relación a la disolución nutritiva **C**, en el cromatograma (Fig.IV.31) aparecen los picos de los isómeros d,l-racémico y meso (picos 1 y 2). Tras comparar sus áreas con las obtenidas para el patrón de FeEDDHA estándar (Fig.IX.2 del Anexo.IX.1) se deduce que la descomposición que ha sufrido el quelato ha sido mínima, ya que se ha recuperado el 85'5% del Fe (o-EDDHA) que se había adicionado inicialmente (Tabla.IV.7). Cabe señalar que las pérdidas de isómero d,l-racémico son iguales a la del meso, obteniéndose en ambos casos, un porcentaje de recomposición en torno al 85% (Tabla.IV.6).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'1	515241	$1'3 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'6	298929	$0'8 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>814170</b>	<b><math>2'1 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	2'7	64411	--

Fig.IV.30. Cromatograma HPLC y Espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva B recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso; Pico 3 CuEDDHA



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'9	325752	$2'5 \cdot 10^{-5}$
2	meso	7'8	271452	$2'1 \cdot 10^{-5}$
	<b>Total</b>	--	<b>597204</b>	<b><math>4'6 \cdot 10^{-5}</math></b>

Fig.IV.31. Cromatograma HPLC correspondiente la disolución nutritiva C recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso

A la vista de los resultados recogidos en la Tabla.IV.7, el porcentaje de FeEDDHA estándar recuperado tras el proceso de recomposición hasta pH 6'0 disminuye a medida que aumenta la fuerza iónica de la disolución. En base a estos datos se llega a la conclusión de que la estabilidad del quelato recompuesto en una disolución nutritiva no va a depender únicamente de la proporción entre nutrientes (NQ) y del valor de pH, sino también de la concentración a la que se prepare la disolución madre.

Por otro lado, a medida que aumenta la concentración de los iones en la disolución, las diferencias en los porcentajes de recomposición entre los isómeros d,l-racémico y meso se acentúan. De acuerdo con los resultados recogidos en la Tabla.IV.6, en la disolución más concentrada (**A**) el porcentaje de isómero d,l-racémico es 3 veces superior al del meso, sin embargo en la disolución de concentración intermedia (**B**) solamente es 1'5 veces mayor y en la más diluida (**C**) no existen diferencias significativas ya que no hay descomposición del quelato. Por tanto, el aumento de la concentración de la disolución nutritiva también incrementará la descomposición del isómero meso frente al d,l-racémico.

### **Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 4'5 del quelato FeEDDHA estándar en disolución nutritiva.**

Del análisis del comportamiento del FeEDDHA estándar cuando forma parte de la disolución nutritiva **A** recompuesta hasta pH 4'5 (Fig.IV.32) se deduce que como ocurría a pH 6'0, la recomposición en presencia de iones competidores produce importantes pérdidas de Fe quelado. De los dos isómeros, el que se ha visto más afectado ha sido el meso, recuperándose únicamente un 4'6% frente al 29'1% del isómero d,l-racémico (Tabla.IV.6).

En el cromatograma de la disolución nutritiva **A** (Fig.IV.32) se ha identificado un conjunto de picos entre 1 y 5 min (picos 4 y 5) que por su espectro UV-Vis (Fig.IV.32) podrían corresponder con la formación de una mezcla de los quelatos CuEDDHA (Fig.IV.2) y ZnEDDHA (Fig.IV.3). Además



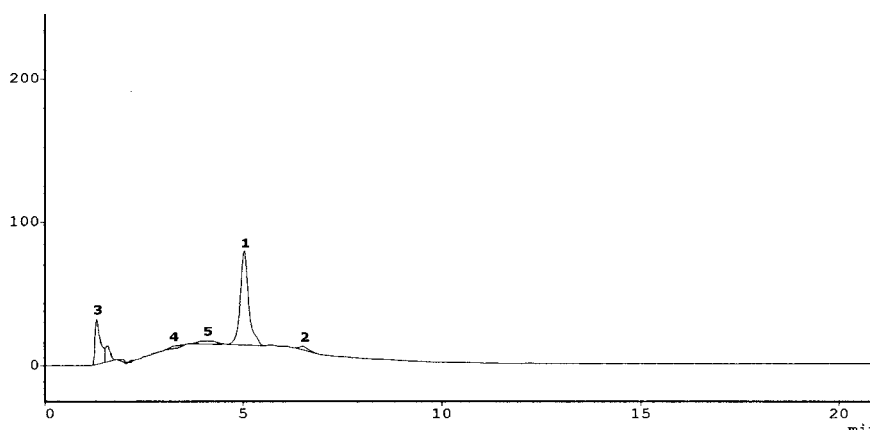
vuelve a aparecer el pico a 1'3 min (pico 3) que no había sido posible su identificación.

A partir de las concentraciones de Fe quelado recogidas en la Fig.IV.29 y IV.32 se observa que para la disolución **A**, la concentración de quelato recompuesta a pH 4'5 es estadísticamente igual a la obtenida cuando esta misma disolución se recompone hasta pH 6'0 (Tabla.IV.8).

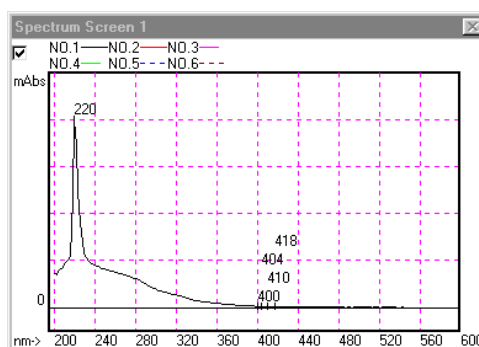
Por otro lado, en las disoluciones **B** y **C** recompuestas hasta pH 4'5, la estabilidad del quelato prácticamente no se ha visto afectada por este proceso ya que en la disolución permanece el 84'3% y el 92'1% del Fe (o-EDDHA) que se había adicionado inicialmente (Tabla.IV.7).

Es de destacar que en la disolución de menor fuerza iónica (**C**) no existen diferencias significativas en la concentración de quelato recuperado a los dos valores de pH en estudio ya que en ambos casos la estabilidad del FeEDDHA estándar es completa. Por el contrario, en la disolución **B** la recomposición a pH 4'5 es superior que a pH 6'0 (Tabla.IV.8).

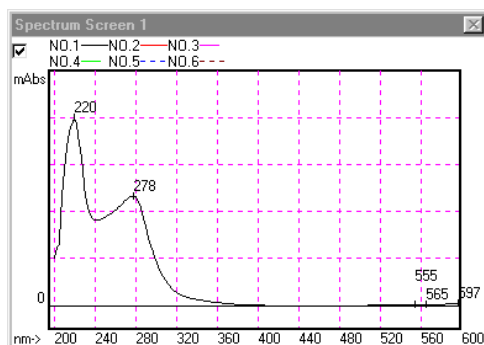
Del mismo modo que en las disoluciones que se habían sometido a un proceso de descomposición-recomposición del quelato hasta pH 6'0, los porcentajes de FeEDDHA estándar recompuesto hasta pH 4'5 aumentan a medida que la fuerza iónica de la disolución disminuye (Tabla.IV.7), a pesar de que los NQ y el valor de pH se han mantenido constantes.



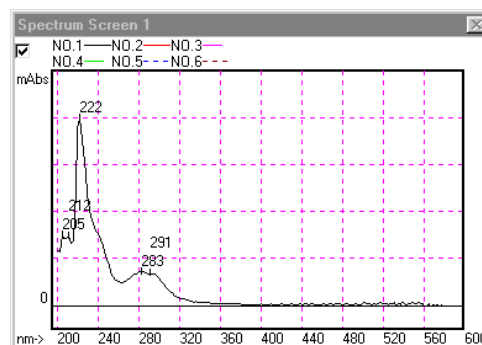
Picos	Isómero	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'0	1056522	$2'8 \cdot 10^{-4}$
2	meso	6'5	1681670	$0'4 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1224692</b>	<b><math>3'2 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	1'3	311915	--
4	--	3'4	11587	--
5	--	4'0	49183	--



Pico 3



Pico 4



Pico 5

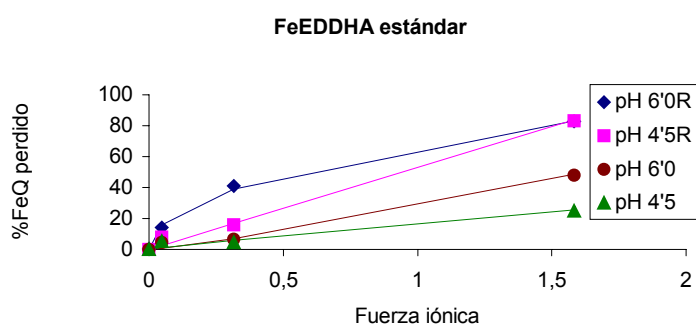
**Fig.IV.32. Cromatograma HPLC y Espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva A recompuesta a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso. Pico 4: CuEDDHA; Pico 5: ZnEDDHA.**

**Relación entre el porcentaje de Fe quelado descompuesto y la concentración de la disolución nutritiva.**

De acuerdo con los resultados obtenidos a lo largo de este ensayo y recopilados en la Fig.IV.33, en el quelato FeEDDHA estándar existe una clara tendencia a que las pérdidas de Fe quelado se incrementen a medida que aumenta la concentración de la disolución nutritiva, independientemente del valor de pH de las mismas. Por este motivo, se ha intentado encontrar una ecuación que permita relacionar el porcentaje de FeEDDHA estándar descompuesto y la fuerza iónica de la disolución nutritiva en la que está presente dicho quelato, para ello los datos experimentales se ajustaron mediante el programa SPSS a una ecuación potencial de la forma:

$$(\%FeQ)_{des} = a \cdot \mu^b \quad (IV.1)$$

donde  $(\%FeQ)_{des}$  es el porcentaje de quelato descompuesto durante la reacción y  $\mu$  es la fuerza iónica de la disolución nutritiva.



**Fig.IV.33. Evolución del porcentaje de quelato perdido durante los procesos de recomposición en función de la fuerza iónica de la disolución nutritiva.**

**Tabla.IV.9. Parámetros correspondientes a la ecuación (IV.1) a los dos valores de pH en estudio.**

D.N.	a	b	R <sup>2</sup>
pH 6'0	28 ± 3	1'2 ± 0'2	0'9898
pH 6'0 (R)	67 ± 1	0'47 ± 0'03	0'9980
pH 4'5	17 ± 3	0'9 ± 0'3	0'9489
pH 4'5 (R)	53 ± 3	1'0 ± 0'1	0'9935

En la Tabla.IV.9 se recogen los valores de los parámetros a y b obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (IV.1). En ella se observa que en las disoluciones que no se han sometido a variaciones de pH (tanto a pH 6'0 como a pH 4'5) y en aquella que ha sufrido un proceso de descomposición-recomposición del quelato hasta pH 4'5, el valor de b es prácticamente 1 y por tanto, el porcentaje de FeEDDHA descompuesto será directamente proporcional a la fuerza iónica de la disolución nutritiva. Sin embargo, cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 6'0 el valor de b es 0'47 (Tabla.VI.9) y en consecuencia, la dependencia entre  $\%(\text{FeQ})_{\text{des}}$  y  $\mu$  se reduce.

Cuando la fuerza iónica de la disolución sea 1, el porcentaje de quelato descompuesto coincidirá con el valor de a y que en tal caso, las pérdidas de FeEDDHA estándar a pH 6'0 serán superiores a las obtenidas a pH 4'5 (Tabla.IV.9). Además, es de destacar que el porcentaje de quelato descompuesto en aquellas disoluciones que se han sometido a un proceso de recomposición es tres veces mayor que el obtenido en las disoluciones que no han sufrido variaciones de pH. Estos resultados confirman el comportamiento que este quelato ha mostrado a lo largo del Ensayo 2.

## **Conclusiones**

A partir de los resultados expuestos hasta el momento se concluye que:

- El porcentaje de FeEDDHA que permanece en las disoluciones nutritivas que no se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición del quelato, depende de los NQ, del pH y de la concentración a la que se prepare la disolución madre de forma que, en la disolución de mayor concentración las pérdidas son importantes mientras que en las disoluciones diluidas, la estabilidad del quelato prácticamente no se ve afectada.
- En aquellas disoluciones nutritivas en las que ha habido una importante descomposición del FeEDDHA, se ha producido la formación de los quelatos EDDHA de algunos de los iones competidores que están presentes en dichas disoluciones.
- Cuando la disolución nutritiva se somete a un proceso de descomposición-recomposición del quelato a los dos valores pH en estudio, el porcentaje de quelato recompuesto aumenta a medida que disminuye la concentración de la disolución nutritiva. Por tanto, la estabilidad del quelato no se ve afectada únicamente por los NQ y el valor de pH, si no también por la concentración a la que se prepare la disolución madre.
- De los dos isómeros que componen el Fe (o-EDDHA), el que sufre mayores pérdidas en los procesos de descomposición-recomposición del quelato es el menos estable es decir, el meso.

**IV.3.2.2. Comportamiento del FeEDDHA comercial en disolución nutritiva.**

**Disoluciones a pH 6'0**

De la comparación de las concentraciones de Fe (o-EDDHA) que contienen las disoluciones nutritivas **A** (Fig.IV.34), **B** (Fig.IX.7 del Anexo.IX.1) y **C** (Fig.IX.8 del Anexo.IX.1) a pH 6'0 con las sus respectivos patrones de FeEDDHA comercial a este mismo valor de pH (Fig.IX.4, IX.5 y IX.6 del Anexo.IX.1 respectivamente) (Tabla.IV.10), se deduce que la estabilidad del quelato no se ha visto afectada por la presencia de los distintos iones competidores que componen las disoluciones nutritivas, independientemente de la concentración a la que se preparen las mismas (Tabla.IV.10 y IV.11).

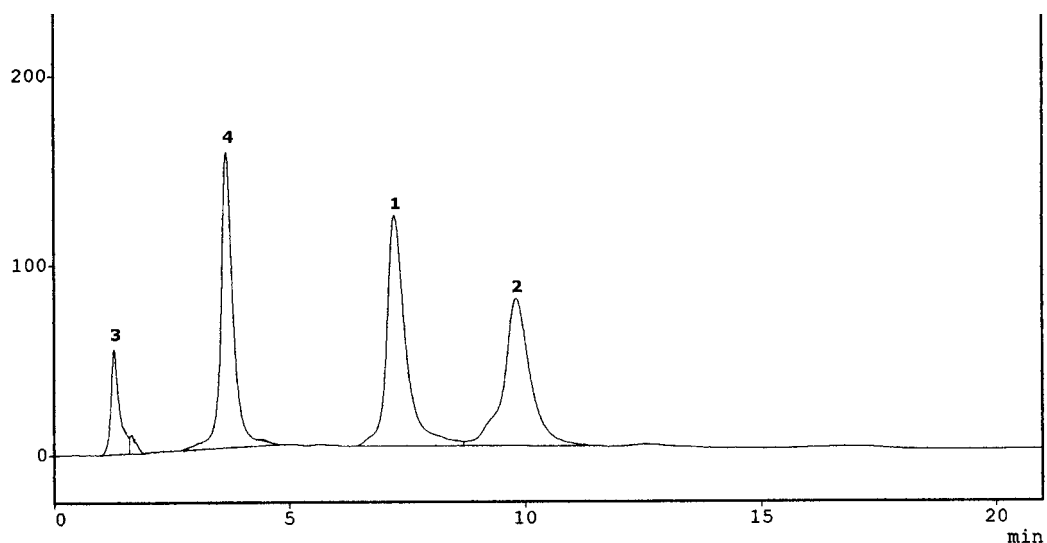
**Tabla.IV.10. Comparación de la estabilidad del FeEDDHA comercial en disolución nutritiva con respecto a los patrones a los diferentes valores de pH. Datos Concentración de Fe quelado (M).**

Conc. de FeEDDHA comercial en disolución nutritiva		D.N. A (1'79·10 <sup>-3</sup> M)			D.N. B (3'58·10 <sup>-4</sup> M)			D.N. C (5'35·10 <sup>-5</sup> M)		
		Conc (M) x10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc (M) x10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc (M) x10 <sup>5</sup>	F	Sig
pH 6'0	D.N. Patrón	17'5 17'9	2'522	0'187	3'20 3'58	5'243	0'084	5'28 5'35	0'329	0'597
pH 6'0 (R)	D.N. Patrón	5'92 17'9	424'8	0'000	2'42 3'58	231'4	0'000	4'98 5'35	8'2266	0'055
pH 4'5	D.N. Patrón	17'0 17'9	2'430	0'194	3'53 3'58	0'423	0'551	5'19 5'35	1'350	0'318
pH 4'5 (R)	D.N. Patrón	8'99 17'9	1122	0'000	3'34 3'58	7'322	0'054	5'17 5'35	2'354	0'200

Como se ha indicado en el Ensayo 0, en los cromatogramas de HPLC del FeEDDHA comercial se observan dos picos a 3'6 y 4'2 min (picos 3 y 4) (Fig.IV.9), los cuales corresponden a agentes quelantes no (o-EDDHA) que este quelato contiene en su formulación. Sin embargo, en los cromatogramas mostrados en la Fig.IV.34 y en las Fig.IX.7 y IX.8 del Anexo.IX.1, no se observa la presencia del pico con un tiempo de elución de 4'2 min. Por tanto, el compuesto que da lugar a este pico debe haber reaccionado con los diferentes iones que existen en las disoluciones nutritivas. En relación al pico con un tiempo de elución de 3'6 min (pico 4) (Fig.IV.34 y Fig.IX.7 y IX.8 del Anexo.IX.1), su área se ha reducido con respecto a la de los patrones (Fig.IX.4, IX.5 y IX.6 del Anexo.IX.1), sobre todo en las disoluciones de mayor concentración (59'4% para **A**, un 20'0% para **B** y un 0'2% para **C**).

Cuando se compara el comportamiento del producto comercial en las disoluciones **B** y **C** a pH 6'0 (Fig.IX.7 y IX.8 del Anexo.IX.1) con el del FeEDDHA estándar (Fig.IV.27 y IX.3 del Anexo IX.1) se observa que no existen diferencias significativas entre ellos, siendo mínimas las pérdidas de Fe (o-EDDHA) para ambos quelatos (Tabla.IV.12).

Por el contrario, la cantidad de FeEDDHA comercial que permanece en la disolución **A** a pH 6'0 ( $1'7 \cdot 10^{-3}$  M) (Fig.IV.34) es muy superior a la encontrada para el quelato estándar ( $9'2 \cdot 10^{-4}$  M) (Fig.IV.26), por lo que la estabilidad del primero frente a las condiciones de la disolución **A** es mayor que la del segundo quizás porque el exceso de Fe no (o-EDDHA) o incluso la reacción de los agentes quelantes no (o-EDDHA) con los componentes de la disolución nutritiva reduzcan los efectos negativos que los iones competidores ejercen sobre el quelato.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	7'2	3495035	9'2·10 <sup>-4</sup>
2	meso	9'8	3120822	8'3·10 <sup>-4</sup>
	<b>Total</b>	--	<b>6615917</b>	<b>1'7·10<sup>-3</sup></b>
3	--	1'3	706435	--
4	--	3'6	2864065	--

**Fig.IV.34. Cromatograma HPLC correspondiente la disolución nutritiva A a pH 6'0. FeEDDHA comercial. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso**

**Tabla.IV.11. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA comercial en las distintas disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos Porcentaje de Fe quelado**  
Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamiento	pH 6'0	pH 6'0 (R)	pH 4'5	pH 4'5 (R)
<b>D.N. A</b>	97'7 <b>a</b>	32'6 <b>c</b>	95'2 <b>a</b>	50'2 <b>b</b>
<b>D.N. B</b>	89'2 <b>a</b>	67'0 <b>b</b>	99'1 <b>ab</b>	93'8 <b>a</b>
<b>D.N. C</b>	98'5 <b>a</b>	92'8 <b>a</b>	96'9 <b>ab</b>	96'3 <b>a</b>
<b>% de FeEDDHA comercial en H<sub>2</sub>O</b>	<b>100'0</b>	<b>94'6</b>	<b>100'0</b>	<b>98'5</b>



**Tabla.IV.12. Comparación de la estabilidad de los quelato FeEDDHA estándar y comercial en las tres disoluciones nutritivas a los diferentes valores de pH. Datos Concentración de Fe quelado (M).**

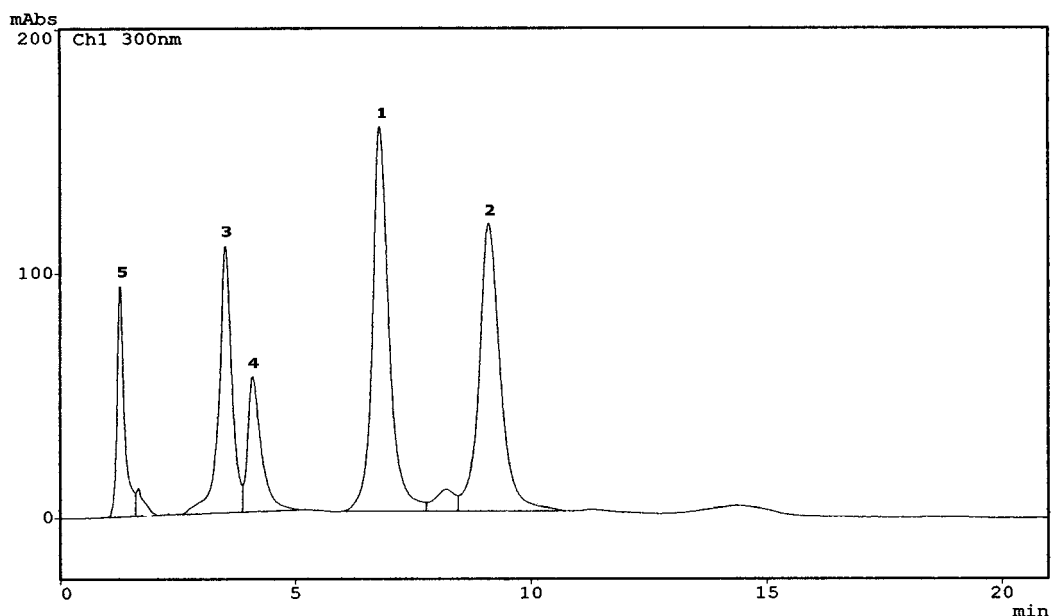
Conc. Quelato (M)	FeEDDHA	D.N. A			D.N. B			D.N. C		
		Conc (M) x10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc (M) x10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc (M) x10 <sup>5</sup>	F	Sig
pH 6'0	Estándar Comercial	9'24 17'5	908'1	0'000	3'35 3'20	1'186	0'337	4'95 5'28	9'143	0'052
pH 6'0 (R)	Estándar Comercial	3'03 5'92	16'78	0'000	2'08 2'42	33'56	0'004	4'62 4'98	14'58	0'019
pH 4'5	Estándar Comercial	14'0 17'0	222'7	0'000	3'42 3'53	15'12	0'018	5'45 5'19	0'300	0'613
pH 4'5 (R)	Estándar Comercial	3'24 8'99	474'4	0'000	3'01 3'34	250'0	0'000	4'93 5'17	126'0	0'000

### Disoluciones a pH 4'5

Cuando las disoluciones nutritivas en estudio se llevan hasta pH 4'5, se obtienen cromatogramas de HPLC (Fig.IV.35, Fig.IX.9 y IX.10 del Anexo.IX.1) en los que las áreas de los picos de los isómeros d,l-racémico y meso (picos 1 y 2) son prácticamente iguales a las de los correspondientes patrones (Fig.IX.4, IX.5 y IX.6 del Anexo.IX.1). Por tanto, la descomposición que ha sufrido el FeEDDHA comercial es mínima, siendo el porcentaje de Fe (o-EDDHA) que permanece en disolución superior al 95% (Tabla.IV.11). De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla.IV.11, el comportamiento de este quelato será igual en las tres disoluciones nutritivas, independientemente de la concentración a la que se preparen las mismas, resultados que coinciden con los encontrados a pH 6'0.

En estos cromatogramas (Fig.IV.35, Fig.IX.9 y IX.10 del Anexo.IX.1) además de los picos de los isómeros (picos 1 y 2), también aparecen los dos picos característicos del producto comercial (picos 3 y 4). Cabe destacar

que el área de los picos producidos por estos compuestos (picos 3 y 4) disminuye en presencia de los iones de la disolución nutritiva, si bien su comportamiento difiere del observado a pH 6'0. Con respecto al pico con un tiempo de elución de 3'6 min (picos 3), su área se ha reducido en mayor medida que en la disolución a pH 6'0. Sin embargo, la estabilidad del pico 4 parece ser superior a pH 4'5 puesto que a diferencia de lo ocurrido a pH 6'0, en estos cromatogramas sí se detecta su presencia (Fig.IV.35, Fig.IX.9 y IX.10 del Anexo.IX.1).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	6'7	4150406	$9'4 \cdot 10^{-4}$
2	meso	9'1	3695572	$8'4 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>7845978</b>	<b><math>1'7 \cdot 10^{-3}</math></b>
3	--	3'5	2075841	--
4	--	4'1	1116607	--
5	--	1'3	1035504	--

Fig.IV.35 Cromatograma HPLC correspondiente la disolución nutritiva A a pH 4'5. FeEDDHA comercial. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso

Es de destacar que en el cromatograma de la disolución **A** a pH 4'5 (Fig.IV.35) vuelve a aparecer el pico con un tiempo de elución de 1'3 min. (pico 5) cuya área ha aumentado considerablemente con respecto a la disolución a pH 6'0 (Fig.IV.34).

De la comparación de la concentración de Fe (o-EDDHA) que existe en las disoluciones nutritivas a pH 4'5 con la obtenida a pH 6'0 (Tabla.IV.13), se encuentra que para las tres disoluciones estudio no hay diferencias significativas en el contenido de FeEDDHA que permanece a los dos valores de pH en estudio.

**Tabla.IV.13. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA comercial a los diferentes valores de pH en las distintas disoluciones nutritivas. Datos de concentración (M).** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Concentración de Fe quelado (M)	D.N.A	D.N. B	D.N. C
pH 6'0	1'75·10 <sup>-3</sup> a	3'20·10 <sup>-4</sup> a	5'28·10 <sup>-5</sup> a
pH 6'0 recompuesto	5'92·10 <sup>-4</sup> c	2'42·10 <sup>-4</sup> c	4'98·10 <sup>-5</sup> b
pH 4'5	1'70·10 <sup>-3</sup> a	3'53·10 <sup>-4</sup> ab	5'19·10 <sup>-5</sup> ab
pH 4'5 recompuesto	8'99·10 <sup>-4</sup> b	3'34·10 <sup>-4</sup> ab	5'17·10 <sup>-5</sup> ab

Por otro lado, la concentración de Fe (o-EDDHA) que existe en las disoluciones **A** y **B** preparadas con FeEDDHA comercial es estadísticamente superior a la encontrada para el quelato estándar (Tabla.IV.12). Sin embargo, no se observan diferencias en el comportamiento de estos dos quelatos en la disolución **C**, lo que es debido a que en la disolución más diluida la descomposición que sufren ambos quelatos es prácticamente despreciable.

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 6'0 del quelato FeEDDHA comercial en disolución nutritiva.**

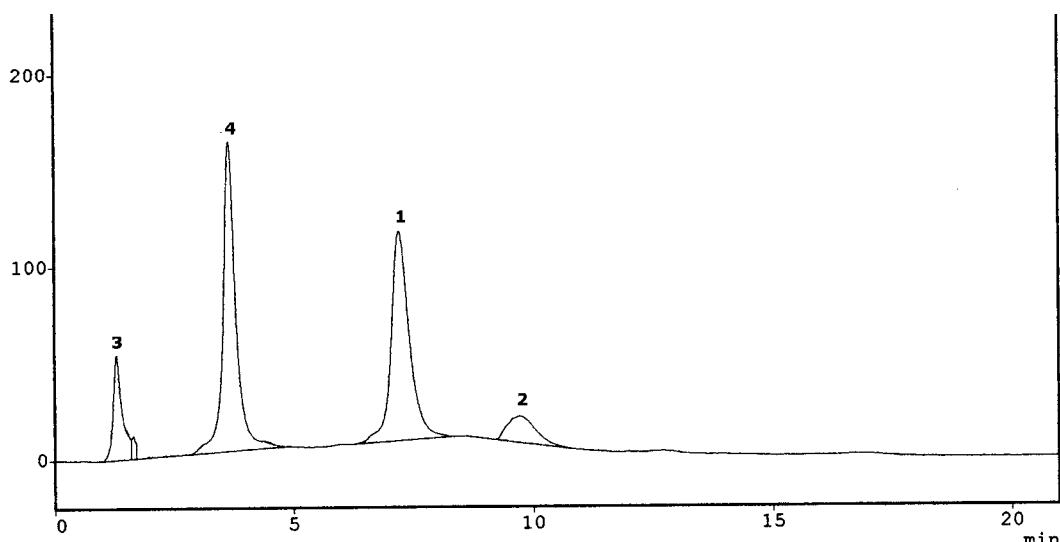
La recomposición del FeEDDHA comercial en presencia de los diferentes iones que componen la disolución **A** ha producido una gran disminución en la concentración de Fe (o-EDDHA) que permanece en la disolución, ya que únicamente se ha recuperado un 32'6% (Tabla.IV.11). Como se observa en la Tabla.IV.14, la pérdida de quelato es debida a la descomposición de ambos isómeros, si bien la reducción en forma de isómero meso es significativamente superior a la de d,l-racémico.

**Tabla.IV.14. Comparación de la estabilidad de los isómeros que componen el quelato FeEDDHA comercial en las disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos porcentaje de Fe quelado.**

	Isómeros	D.N. A			D.N. B			D.N. C		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	racémico meso	101'0	7'429	0'053	89'4	0'010	0'925	99'7	1'661	0'273
		94'9			88'9			97'2		
pH 6'0 (R)	racémico meso	48'7	41'83	0'003	72'4	16'86	0'015	93'0	0'226	0'659
		12'5			61'7			91'7		
pH 4'5	racémico meso	100'8	997'9	0'000	101'8	35'10	0'004	96'3	0'293	0'617
		90'7			96'2			97'6		
pH 4'5 (R)	racémico meso	79'0	816'5	0'000	95'8	12'71	0'023	93'1	72'43	0'001
		15'9			91'7			99'8		

Aunque el proceso de descomposición-recomposición del quelato ha dado lugar a una importante pérdida de FeEDDHA, en el cromatograma de HPLC de esta disolución (Fig.IV.36) no se observa ningún pico que corresponda a la formación de los quelatos de los iones competidores, probablemente porque dichos picos se hayan solapado con el pico 4

característico de este quelato comercial (Fig.IV.36), el cual ha aumentado su área considerablemente con respecto a la de la Fig.IX.4 (Anexo.IX.1).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	7'2	2952725	$4'9 \cdot 10^{-4}$
2	meso	9'7	499966	$1'0 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>3452691</b>	<b><math>5'9 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	1'3	728249	--
4	--	3'6	3020825	--

**Fig.IV.36. Cromatograma HPLC correspondiente la disolución nutritiva A recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso**

Del estudio cromatográfico del comportamiento del FeEDDHA comercial en la disolución **B** recompuesta a pH 6'0 (Fig.IX.12 del Anexo.IX.1) se observa que el proceso de recomposición ha producido una pérdida del 33'0% del Fe (o-EDDHA) que había inicialmente en la disolución (Tabla.IV.11). De nuevo es el isómero menos estable el que sufre una mayor descomposición recomponiéndose un 61'7% frente al 72'4% del isómero d,l-racémico (Tabla.IV.14).

Con respecto a la estabilidad del FeEDDHA comercial en la disolución **C** recompuesta a pH 6'0 decir que es elevada, siendo la pérdida de Fe (o-EDDHA) del 7'2%. Como se observa en la Tabla.IV.14, no se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de recomposición de ambos isómeros.

Del mismo modo que en las disoluciones nutritivas preparadas con FeEDDHA estándar, el porcentaje de quelato recompuesto aumenta a medida que disminuye la concentración la disolución nutritiva (Tabla.IV.11). Así, mientras que para la disolución más concentrada sólo se recompone un 32'6 %, para la más diluida este porcentaje aumenta hasta el 92'8%.

Cabe destacar que la concentración de Fe quelado que permanece en las disoluciones **A**, **B** y **C** tras la recomposición a pH 6'0 es superior a la encontrada para quelato FeEDDHA estándar (Tabla.IV.12). Como se ha mencionado anteriormente, estas diferencias pueden ser debidas a que el exceso de Fe no (o-EDDHA) o la reacción de los agentes quelantes no (o-EDDHA) con los componentes de la disolución nutritiva ,reduzcan el efecto que los iones competidores producen sobre la estabilidad del quelato.

### **Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 4'5 del quelato FeEDDHA comercial en disolución nutritiva.**

Del estudio de los cromatogramas de HPLC de las disoluciones nutritivas recompuestas a pH 4'5 (Fig.IX.14, IX.15 y IX.16 del Anexo.IX.1) se deduce que mientras que en la disolución de mayor concentración el contenido de Fe (o-EDDHA) se ha reducido a la mitad, para las disoluciones **B** y **C** las pérdidas son mínimas no superando en ningún caso el 10% (Tabla.IV.10 y IV.11).

Cabe señalar que las pérdidas que sufre el quelato en la disolución **A** son debidas principalmente a la descomposición del isómero meso, ya que

únicamente se recompone un 15'9% frente al 79'0% del isómero d,l-racémico (Tabla.IV.14).

En el cromatograma de la disolución más concentrada recompuesta a pH 4'5 (Fig.IX.14 del Anexo.IX.1) no se observa la formación de los quelatos de los iones competidores, aunque sí aparecen los picos característicos de este quelato comercial (picos 3 y 4). El proceso de recomposición ha producido una reducción del 38'3% del área del pico 3 mientras que el pico 4 la ha incrementado en un 37'1% con respecto al patrón (Fig.IX.4 del Anexo.IX.1). Este aumento puede ser debido a que haya tenido lugar la formación de algún quelato de los iones competidores y que el pico correspondiente a este compuesto, se haya solapado con el del pico 4.

Cuando la disoluciones **A** y **B** se recomponen hasta pH 4'5, la concentración de Fe (o-EDDHA) recuperada es superior a la obtenida cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 6'0 (Tabla.IV.13). Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en la cantidad de quelato que se recompone en la disolución más diluida a los dos valores de pH en estudio ya que tanto a pH 6'0 como a 4'5, la estabilidad del quelato es elevada (Tabla.IV.10).

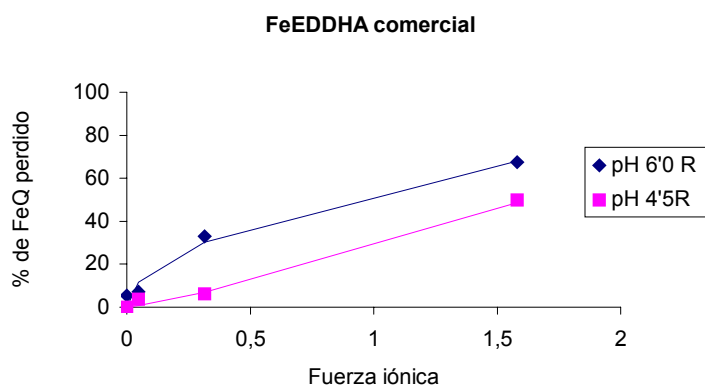
Por otro lado, en estudios realizados por Bermúdez et al. (1999) se han establecido los porcentajes teóricos de recomposición de este quelato comercial cuando forma parte de una disolución nutritiva de las mismas características que la disolución **C** (Tabla.IV.5) y es sometido a procesos de descomposición-recomposición. Los porcentajes de recomposición se obtuvieron como suma del efecto de cada ión por separado. Así, cuando la disolución se recompone hasta pH 6'0, el porcentaje teórico de quelato recuperado es del 46'6% mientras que cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 4'5, el porcentaje teórico de recomposición es de un 63'1%.

De la comparación de los resultados teóricos con los obtenidos experimentalmente (recomposición del 92'8% para pH 6'0 y del 96'3% para pH 4'5), se llega a la conclusión que cuando todos los iones competidores están presentes en una disolución nutritiva, deben producirse interacciones entre ellos que hacen que la descomposición que sufre el quelato se reduzca y por tanto, que los porcentajes de recomposición sean superiores a los esperados teóricamente como suma del efecto de cada ión por separado.

### **Relación entre el porcentaje de Fe quelado descompuesto y la concentración de la disolución nutritiva.**

A diferencia del comportamiento observado para el quelato estándar, la concentración de FeEDDHA comercial que permanece en las disoluciones nutritivas que no se han sometido a variaciones de pH, es estadísticamente igual a la de sus respectivos patrones (Tabla.IV.10), no produciéndose pérdidas de Fe (o-EDDHA) a pesar de que la fuerza iónica de la disolución nutritiva varíe. Por el contrario, cuando el producto comercial forma parte de las disoluciones nutritivas que han sufrido un proceso de descomposición-recomposición hasta los dos valores de pH en estudio, el porcentaje de quelato recompuesto se reduce a medida que aumenta la concentración de la disolución nutritiva. En este caso, los datos experimentales recogidos en la Fig.IV.37 se ajustaron mediante el programa SPSS a la misma ecuación potencial que se empleó para el quelato FeEDDHA estándar (Ecuación IV.1). De esta forma se intentó relacionar las pérdidas de quelato con la fuerza iónica de la disolución.





**Fig.IV.37. Evolución del porcentaje de quelato perdido durante los procesos de recomposición en función de la fuerza iónica de la disolución nutritiva.**

**Tabla.IV.15. Parámetros correspondientes a la ecuación (IV.1) a los dos valores de pH en estudio.**

Quelato presente en la D.N.	Valor de pH de recomposición de la D.N.	a	b	R <sup>2</sup>
FeEDDHA comercial	pH 6'0	54 ± 4	0'5 ± 0'1	0'9967
	pH 4'5	28 ± 3	1'2 ± 0'2	0'9942

De acuerdo con el comportamiento que el producto comercial muestra en la Fig.IV.37, las pérdidas de Fe (o-EDDHA) a pH 6'0 son siempre superiores a las producidas a pH 4'5, independientemente de la fuerza iónica de la disolución nutritiva. Como se ha mencionado anteriormente, cuando la fuerza iónica sea 1, el porcentaje de quelato descompuesto será igual al valor del parámetro a y en tal caso, las pérdidas a pH 6'0 serán aproximadamente el doble de las encontradas a pH 4'5 (Tabla.IV.15).

Cabe señalar que como ocurría para el FeEDDHA estándar, el valor de b en las disoluciones que contiene quelato comercial y que se han

recompuesto hasta pH 4'5 es prácticamente 1, y por tanto el incremento de la pérdida de FeEDDHA será proporcional al aumento de la fuerza iónica de la disolución. Por el contrario, en las disoluciones recompuestas hasta pH 6'0 este valor se reduce a la mitad lo que provocará que cuando  $\mu$  sea inferior a 1, las diferencias en  $\%(\text{FeQ})_{\text{des}}$  a los dos valores de pH, sean superiores que cuando el valor de la fuerza iónica es mayor que la unidad.

### **Conclusiones**

Con base a los datos expuestos hasta ahora se llega a las siguientes conclusiones:

- En las disoluciones nutritivas preparadas con FeEDDHA comercial que no han sufrido variaciones de pH, la estabilidad del quelato no se ve afectada, siendo los resultados similares para los dos isómeros, a los dos valores de pH y en las 3 disoluciones en estudio, independientemente de la concentración de las mismas.
- El porcentaje de quelato recuperado en aquellas disoluciones que se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición aumenta a medida que disminuye la fuerza iónica de la disolución nutritiva, de forma que en las disoluciones más diluidas las pérdidas son mínimas. Este comportamiento se observa cuando la recomposición tiene lugar hasta los dos valores de pH en estudio.
- La concentración de quelato recompuesto en las disoluciones en las que está presente el FeEDDHA comercial son superiores a los encontrados para el FeEDDHA estándar, independientemente del valor de pH de la disolución, lo que puede ser debido a que el exceso de Fe no (o-EDDHA) o la reacción de los agentes quelantes no (o-EDDHA) con los componentes de la disolución nutritiva, reduzcan los efectos negativos que los iones competidores causan sobre la estabilidad del quelato comercial.

- La estabilidad de los isómeros d,l-racémico y meso se ve influenciada significativamente por la concentración de la disolución nutritiva de forma que cuando las disoluciones más concentradas se someten a procesos de descomposición-recomposición, ambos isómeros se ven afectados, si bien, es el isómero meso el sufre una mayor descomposición. Por el contrario, en las disoluciones nutritivas más diluidas las pérdidas de los dos isómeros se hacen mínimas.
- Los porcentajes de recomposición de FeEDDHA comercial en la disolución nutritiva, a los dos valores de pH en estudio, son superiores a los encontrados por Bermúdez et al. (1999) como suma del efecto de cada ión por separado, de lo que se deduce que deben producirse competencias entre los distintos iones que componen la disolución nutritiva, de forma que el efecto que ejercen sobre la estabilidad del quelato es menor que el esperado teóricamente como suma del efecto que cada ión provocaría por separado.

**IV.3.2.3.Comportamiento del FeEDDMHA comercial en disolución nutritiva.**

**Disoluciones a pH 6'0**

En los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **A**, **B** y **C** a pH 6'0 (Fig.IV.38, IV.39, IV.40), se observa que los tiempos de retención de los picos de los isómeros del FeEDDHMA (picos 1 y 2) son mayores que los de los quelatos FeEDDHA, y que el orden de salida de los mismos se ha invertido, confirmando así los resultados obtenidos en el Apartado IV.1.2 (Fig.IV.10). Además, tras comparar las áreas de los picos 1 y 2 con las de los correspondientes patrones de FeEDDHMA comercial (Fig.IV.10, y Fig.IX.17 y IX.18 del Anexo.IX.1), se deduce que la estabilidad del quelato en las disoluciones nutritivas que no se han sometido a variaciones de pH es elevada, siendo los porcentajes de Fe quelado que permanecen en disolución los que aparecen en la Tabla.IV.16.

**Tabla.IV.16. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHMA comercial en las distintas disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos Porcentaje de Fe quelado**

Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamiento	pH 6'0	pH 6'0 (R)	pH 4'5	pH 4'5 (R)
<b>D.N. A</b>	89'8 <b>b</b>	35'6 <b>c</b>	96'8 <b>a</b>	49'4 <b>c</b>
<b>D.N. B</b>	91'3 <b>b</b>	50'9 <b>b</b>	90'2 <b>a</b>	66'4 <b>b</b>
<b>D.N. C</b>	115'1 <b>a</b>	62'1 <b>a</b>	96'8 <b>a</b>	76'3 <b>a</b>
<b>% FeEDDHMA comercial en H<sub>2</sub>O</b>	<b>100'0</b>	<b>100'0</b>	<b>100'0</b>	<b>94'8</b>

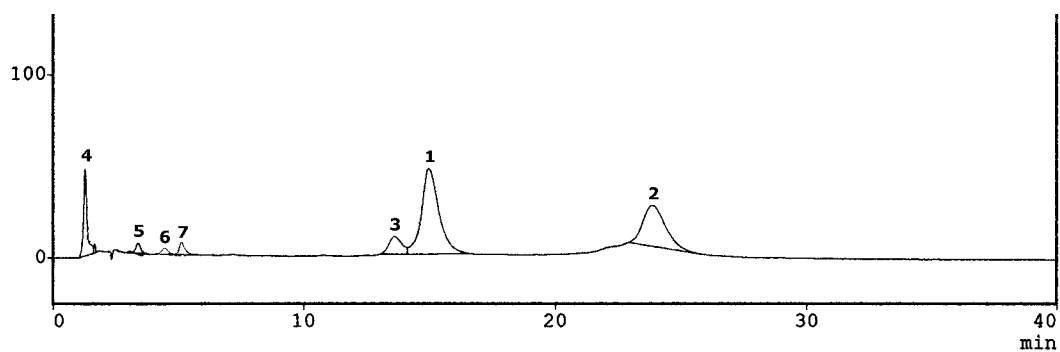
Es de destacar que mientras que en las disoluciones **B** y **C** ambos isómeros presentan el mismo comportamiento (Tabla.IV.17), en la disolución **A** la pérdidas son debidas únicamente a la descomposición del

isómero d,l-racémico mientras que el meso, permanece totalmente estable (Tabla.IV.17).

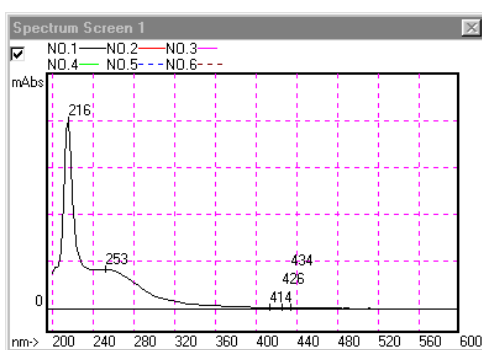
De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla.IV.17, el porcentaje de Fe que permanece en forma de isómero d,l-racémico en la disolución **A** (66'0%) es inferior al de las disoluciones **B** y **C** (92'2% y 113'3% respectivamente) sin embargo, los porcentajes de meso son similares en las tres disoluciones en estudio. Este hecho ha dado lugar a que la concentración de agente quelante EDDHMA libre en **A** sea superior y por tanto, que pueda producirse la formación de los quelatos CuEDDHMA (pico 5 Fig.IV.38) y ZnEDDHMA (pico 6 Fig.IV.38).

En la Fig.IV.38 también aparece un pico con un tiempo de elución de 1'3 min (pico 4) que coincide con los encontrados en los cromatogramas de FeEDDHA estándar y comercial, y que por la información que se tiene hasta el momento no ha podido ser identificado.

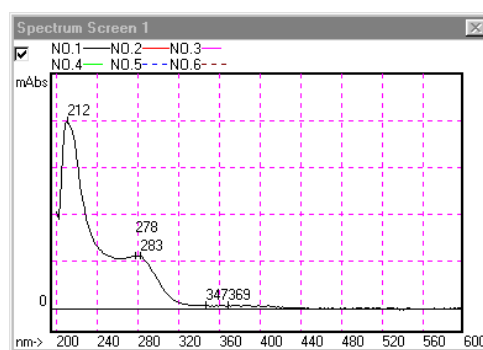
Con respecto al comportamiento del FeEDDH4,6MA presente en el quelato comercial (pico 3), destacar que su estabilidad se ha visto afectada por la presencia de los iones que componen las disoluciones nutritivas de forma que, el área del pico 3 (Fig.IV.38, IV.39 y VI.40) se ha reducido en torno a un 20%. Además, el pequeño pico con un tiempo de elución de 13'4 min que aparecía en el cromatograma del patrón de FeEDDHMA comercial (pico 4) (Fig.IV.10) no se detecta en los cromatogramas de las disoluciones **A**, **B** y **C** (Fig.IV.38, IV.39 y VI.40). Como se mencionó en el Ensayo 0, estos dos picos corresponden a los isómeros del FeEDDH4,6MA (Álvarez-Fernández et al., 2002) y de acuerdo con los resultados obtenidos, se podría decir que de estos dos isómeros, el que tiene una menor estabilidad es aquel que da lugar al pico 4 del cromatograma del patrón de FeEDDHMA comercial (Fig.IV.10).



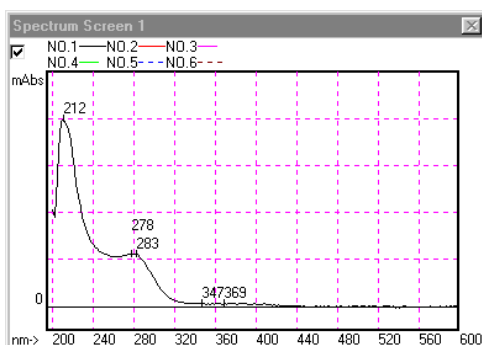
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	15'0	2102852
2	d,l-racémico	23'9	1235860
	<b>Total</b>	--	<b>3338712</b>
3	--	13'6	322376
4	--	1'3	471394
5	--	3'3	50893
6	--	4'4	46972
7	--	5'4	85139



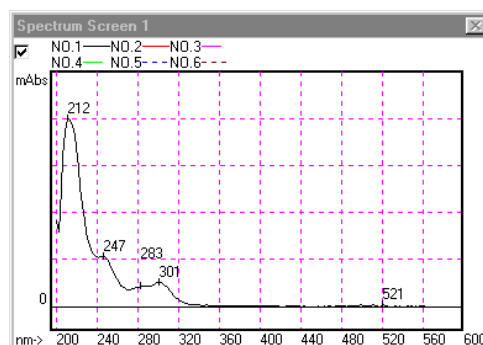
Pico 4



Pico 5



Pico 6



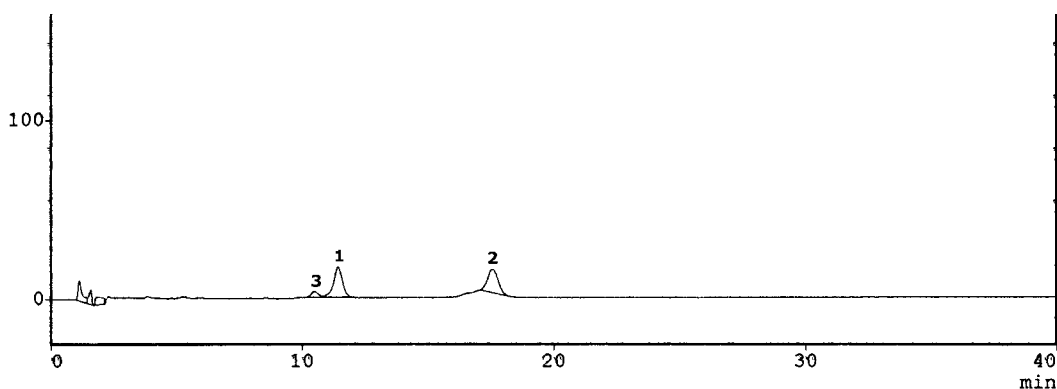
Pico 7

Fig.IV.38. Cromatograma HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva A a pH 6'0. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.

**Tabla.IV.17. Comparación de la estabilidad de los isómeros que componen el quelato FeEDDHMA comercial en las disoluciones nutritivas a cada valor de pH.**

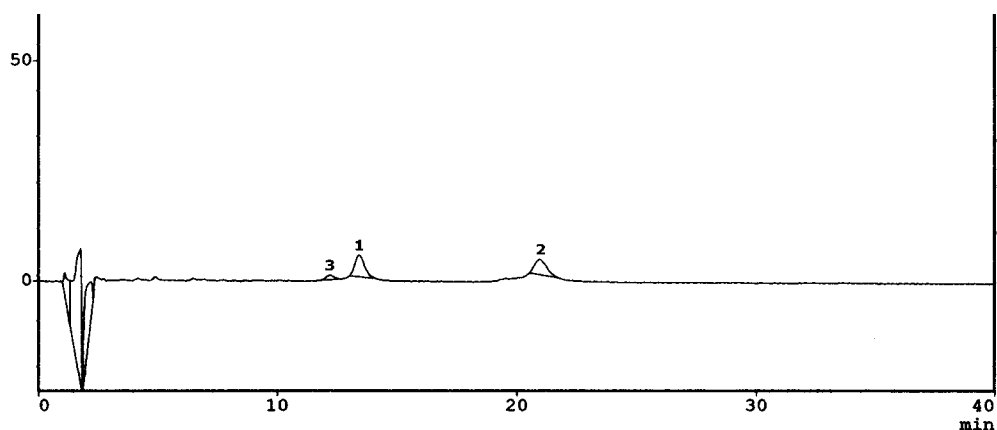
**Datos porcentaje de Fe quelado.**

	Isómeros	D.N. A			D.N. B			D.N. C		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	racémico	66'0	106'9	0'000	92'2	0'346	0'588	117'0	0'265	0'634
	meso	114'7			90'4			113'3		
pH 6'0 (R)	racémico	12'8	1647	0'000	48'4	9'698	0'036	56'5	104'0	0'001
	meso	59'3			53'3			67'8		
pH 4'5	racémico	80'6	33'77	0'004	91'2	0'112	0'755	94'4	1'898	0'240
	meso	113'6			89'3			99'0		
pH 4'5 (R)	racémico	9,8	611'7	0,000	58,6	392,9	0,000	66,6	66,24	0,001
	meso	89,0			73,6			83,6		



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	11'4	412664
2	d,l-racémico	17'6	387643
	<b>Total</b>	--	<b>800307</b>
3	--	10'5	61006

**Fig.IV.39. Cromatograma HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B a pH 6'0. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	13'4	178975
2	d,l-racémico	21'0	173394
	Total	--	<b>3523693</b>
3	3	12'2	21551

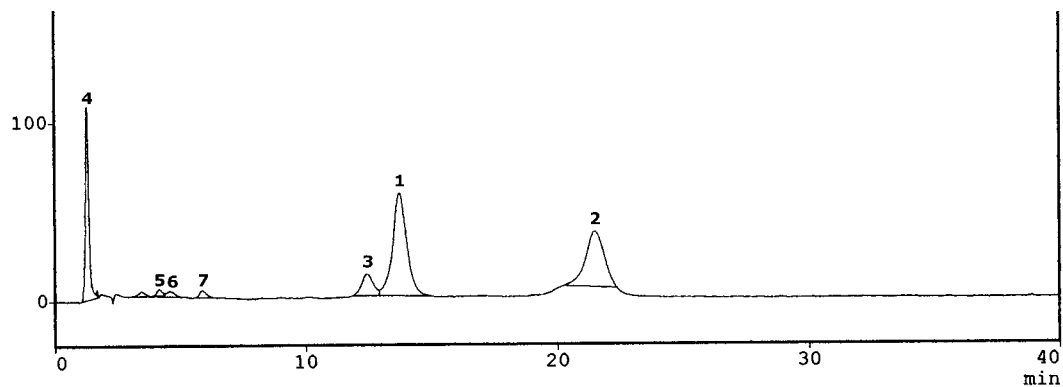
**Fig.IV.40. Cromatograma HPLC correspondiente a la disolución nutritiva C a pH 6'0.**  
**Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**

**Disoluciones a pH 4'5.**

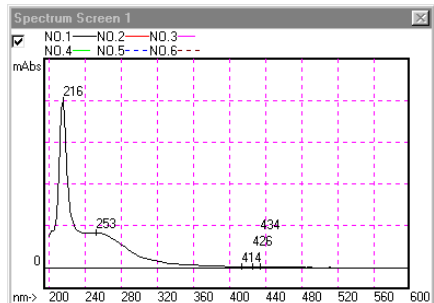
Del estudio cromatográfico del comportamiento del FeEDDHMA comercial en las disoluciones **A** (Fig.IV.41), **B** y **C** (no se incluyen figuras) a pH 4'5, se deduce que el quelato es estable frente al efecto que produce la presencia conjunta de los distintos iones competidores, siendo las pérdidas de Fe quelado inferiores al 10% para las tres disoluciones en estudio (Tabla.IV.16).

Como ocurría a pH 6'0, la reducción en la concentración de FeEDDHMA en la disolución **A** es consecuencia de la descomposición del isómero d,l-racémico mientras que el meso permanece estable (Tabla.IV.17). Por el contrario en **B** y **C**, el porcentaje de d,l-racémico que se mantiene en disolución es igual al del meso, produciéndose en ambos casos una descomposición mínima (Tabla.IV.17).

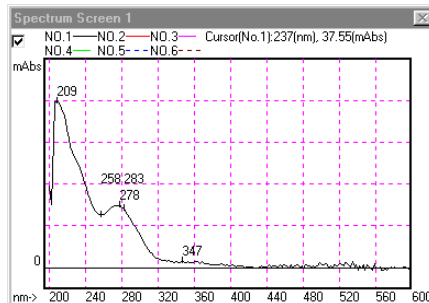




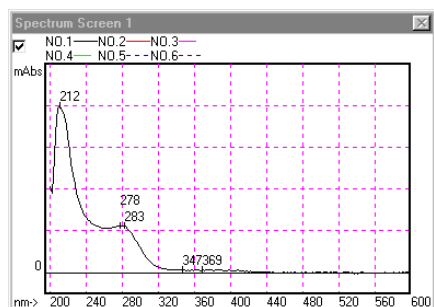
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	13'7	2130839
2	d,l-racémico	21'5	157553
	Total	--	<b>2288392</b>
3	--	12'4	375154
4	--	1'3	1035591
5	--	3'4	49058
6	--	4'4	69893
7	--	5'5	70981



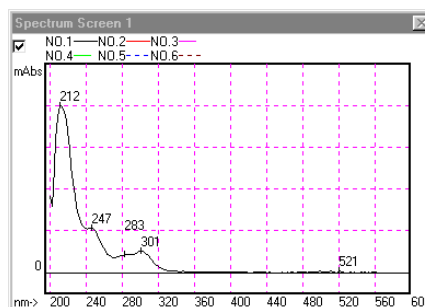
Pico 4



Pico 5



Pico 6



Pico 7

Fig.IV.41. Cromatograma HPLC y espectros UV-Vis de la disolución nutritiva A a pH 4'5. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico, Picos 5 y 6: CuEDDHMA, Pico 7: ZnEDDHMA

No se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de FeEDDHMA que contienen las tres disoluciones en estudio (Tabla.IV.16). Por tanto, la estabilidad del quelato en las disoluciones que no se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición sólo dependerá de los valores de NQ y pH, independientemente de la concentración a la que se preparen las mismas.

Por otro lado, en el cromatograma de la disolución **A** a pH 4'5 (Fig.IV.41) se observa la formación de un conjunto picos de menor área y tiempos de retención que los de los isómeros. La realización de un espectro UV-Vis a cada uno de ellos ha permitido determinar que los picos 5, 6 y 7, son debidos a la presencia de mezclas de CuEDDHMA (Fig.IV.6) y ZnEDDHMA (Fig.IV.7) en la disolución y que el pico 3, corresponde al FeEDDH4,6MA que contiene este quelato. Este pico (pico 3) ha reducido su área con respecto al patrón de FeEDDHMA comercial (Fig.IV.10) en un 11%. En consecuencia, la estabilidad del compuesto que da origen al pico 3 es superior a pH 4'5 que a pH 6'0, ya que a este último valor de pH, la pérdida estaba en torno al 20%. Con respecto al pico 4 (Fig.IV.41), su espectro coincide con el pico 4 de la disolución a pH 6 (Fig.IV.38), si bien su área ha aumentado considerablemente.

Cuando se compara el comportamiento del quelato comercial a pH 4'5 con el observado a pH 6'0, se encuentra que no hay diferencias significativas en los porcentajes de FeEDDHMA que permanecen en las disoluciones **A**, **B** y **C** a los dos valores de pH en estudio (Tabla.IV.18).

**Tabla.IV.18. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHMA comercial a los diferentes valores de pH en las distintas disoluciones problema. Datos de porcentaje de Fe quelado.** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamiento	D.N.A	D.N. B	D.N. C
pH 6'0	89'8 a	91'3 a	115'1 a
pH 6'0 recompuesto	35'6 c	50'9 c	62'1 c
pH 4'5	96'8 a	90'2 a	96'8 a
pH 4'5 recompuesto	49'4 b	66'4 b	77'1 b

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 6'0 del quelato FeEDDHMA comercial en disolución nutritiva**

En los cromatogramas de HPLC de la disolución **A** (Fig.IV.42) recompuesta a pH 6'0, destaca la importante descomposición que ha sufrido el isómero d,l-racémico como consecuencia del efecto que los iones competidores han tenido sobre él. Con respecto al isómero meso, su estabilidad también se ha visto afectada aunque las pérdidas son significativamente menores que las de d,l-racémico (Tabla.IV.17). Este mismo comportamiento también se observa en la disoluciones **B** y **C** (no se incluye figura).

Como se muestra en la Tabla.IV.16, los porcentajes de FeEDDHMA recompuesto disminuyen a medida que aumenta la concentración de la disolución nutritiva, a pesar de que los NQ y el valor de pH se han mantenido constantes. Resultados que coinciden con los de los quelatos FeEDDHA.

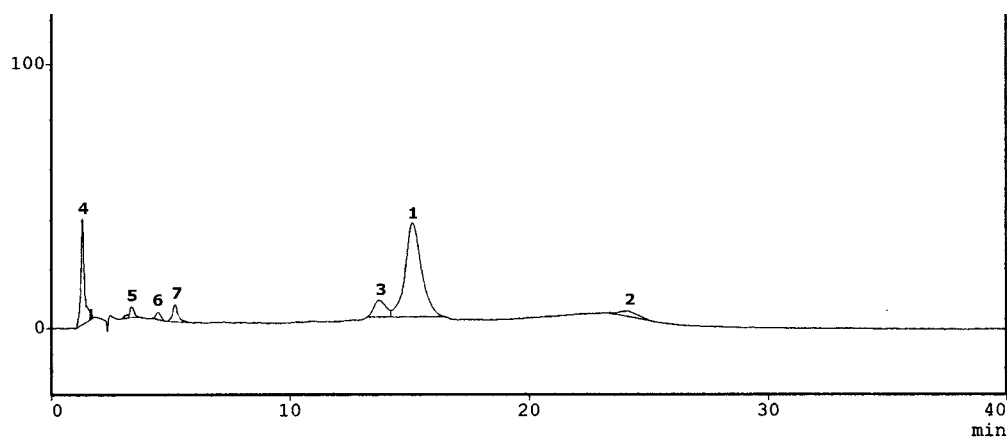
La descomposición del FeEDDHMA en la disolución de mayor concentración ha dado lugar a la formación de los quelatos de CuEDDHMA y ZnEDDHMA en el medio (picos 6 y 7 de la Fig.IV.42). Sin embargo, como el método utilizado es poco sensible para estos quelatos, en los

cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B** y **C** sólo aparecen los picos de los isómeros y del FeEDDH4,6MA que contiene el producto comercial, a pesar de que la pérdida FeEDDHMA ha sido elevada (49'2% para **B** y 37'9% para **C**).

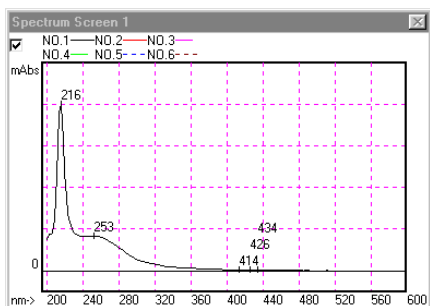
Tras comparar los porcentajes de recomposición del quelato FeEDDHMA con los obtenidos para los quelatos FeEDDHA estándar y comercial se obtiene que en la disolución **A**, el comportamiento del FeEDDHMA es igual al de FeEDDHA comercial (Tabla.IV.19), siendo las pérdidas de Fe quelado en ambos casos inferiores a las del FeEDDHA estándar. Por el contrario, la estabilidad del quelato FeEDDHMA en las disoluciones **B** y **C** es menor a la que presentan los quelatos FeEDDHA en estudio.

**Tabla.IV.19. Comparación de la estabilidad de los quelatos FeEDDHMA comercial, FeEDDHA estándar y FeEDDHA comercial a los diferentes valores de pH en las distintas disoluciones problema. Datos de porcentaje de Fe quelado.** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

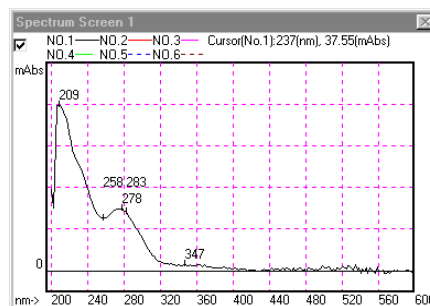
% de Fe quelado	D.N. A		D.N. B		D.N. C	
	pH 6'0 (R)	pH4'5 (R)	pH 6'0 (R)	pH4'5 (R)	pH 6'0 (R)	pH4'5 (R)
<b>FeEDDHA estándar</b>	17'1 <b>b</b>	16,8 <b>b</b>	59'0 <b>b</b>	84'3 <b>b</b>	85'9 <b>b</b>	92'1 <b>a</b>
<b>FeEDDHA comercial</b>	32'6 <b>a</b>	50'2 <b>a</b>	67'0 <b>a</b>	93'8 <b>a</b>	92'8 <b>a</b>	96'3 <b>a</b>
<b>FeEDDHMA comercial</b>	35'6 <b>a</b>	49'4 <b>a</b>	50'9 <b>c</b>	66'4 <b>c</b>	62'1 <b>c</b>	76'3 <b>b</b>



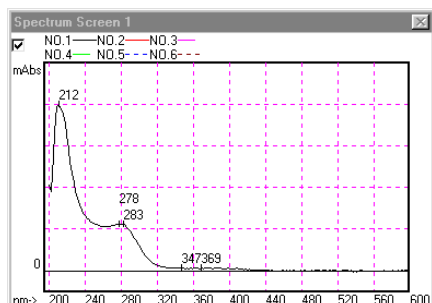
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	15'1	1832144
2	d,l-racémico	24'0	170682
	<b>Total</b>	--	<b>2002826</b>
3	--	13'7	247974
4	--	1'3	410328
5	--	3'4	39509
6	--	4'4	37336
7	--	5'5	88627



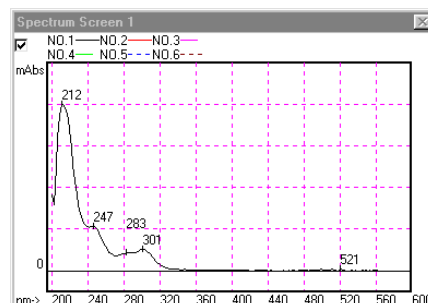
Pico 4



Pico 5



Pico 6



Pico 7

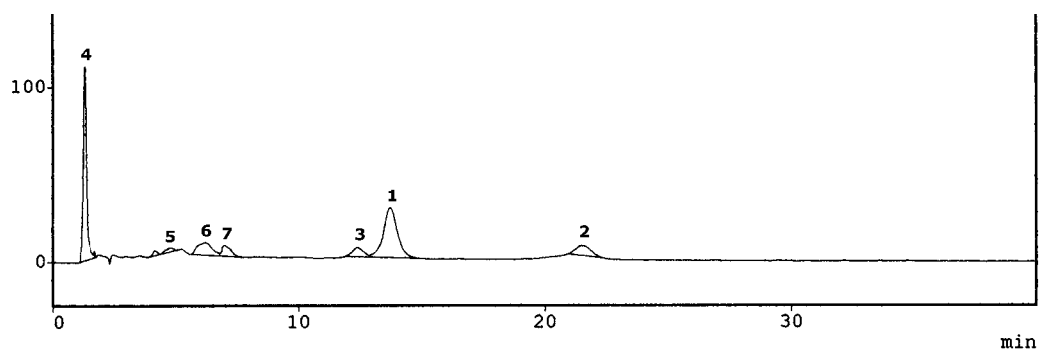
**Fig.IV.42. Cromatograma HPLC y espectros UV-Vis de la disolución nutritiva A recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico, Pico 5 y 6: CuEDDHA y Pico 7: ZnEDDHA**

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 4'5 del quelato FeEDDHMA comercial en disolución nutritiva.**

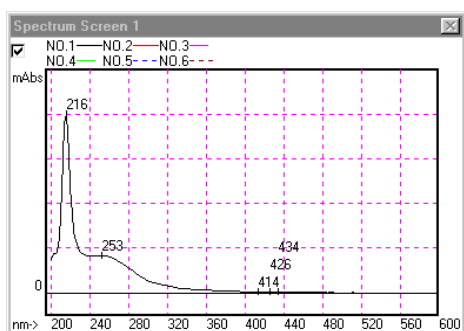
Cuando la disolución **A** se recompone hasta pH 4'5, se obtiene un cromatograma de HPLC (Fig.IV.43) en el que se observa que los picos de los isómeros meso y d,l-racémico se han reducido de forma importante con respecto a los del patrón de FeEDDHMA (Fig.IV.10), sobre todo en el caso del isómero menor estabilidad (d,l-racémico), del que únicamente se ha recompuesto el 9'8% frente al 89'0% del meso (Tabla.IV.17). En este cromatograma también se ha identificado un conjunto de picos entre 4 y 6 min que por sus espectros UV-Vis se deben a la formación de CuEDDHMA y ZnEDDHMA en la disolución.

Como ocurría en las disoluciones recompuestas a pH 6'0, en los cromatogramas de las disoluciones de menor concentración (**B** y **C**) sólo aparecen los picos de los isómeros del quelato, los cuales también se han visto afectados por el proceso de recomposición siendo las pérdidas de FeEDDHMA del 33'6% para **B** y del 22'9% para **C**.

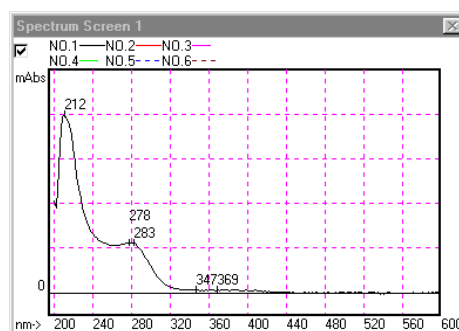
A la vista de los datos mostrados en las Tabla.IV.18, los porcentajes de recomposición a pH 4'5 son superiores a los encontrados a pH 6'0 si bien, para los dos valores de pH en estudio, se observa que a medida que aumenta la concentración de las disoluciones nutritivas se reduce el porcentaje de FeEDDHMA recuperado (Tabla.IV.16). Esta tendencia coincide con la observada para los quelatos FeEDDHA.



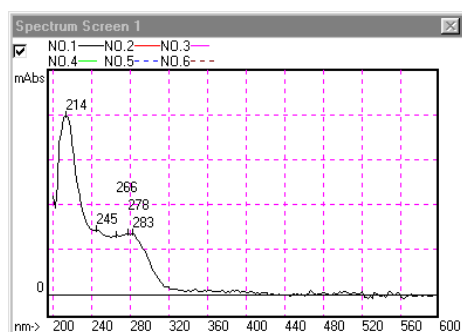
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	13'7	1112461
2	d,l-racémico	21'5	250865
	<b>Total</b>	--	<b>1363326</b>
3	--	12'1	165224'3
4	--	1'3	1064547
5	--	4'3	37133
6	--	4'8	54098
7	--	5'8	295559



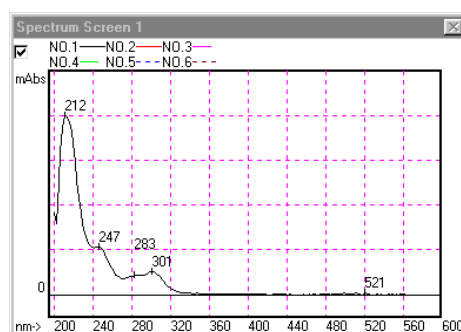
Pico 4



Pico 5



Pico 6



Pico 7

**Fig.IV.43. Cromatograma HPLC y Espectros UV-Vis de la disolución nutritiva A recompuesta a pH 4'5. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico, Pico 5: CuEDDHMA y Picos 6 y 7: ZnEDDHMA.**

De la comparación del comportamiento del FeEDDHMA a pH 4'5 con el de los quelatos FeEDDHA (Tabla.IV.19) se deduce que como ocurría a pH 6'0, las pérdidas de FeEDDHMA comercial en las disoluciones de menor concentración (**B** y **C**) son superiores a la que presentan los quelatos FeEDDHA mientras que para la disolución **A**, no se han encontrado diferencias significativas en el comportamiento de los dos quelatos comerciales, siendo la recomposición en ambos casos, superior a la del FeEDDHA estándar. Por tanto, el quelato FeEDDHMA comercial es el más inestable de los 3 quelatos en estudio frente a los procesos de recomposición en presencia de iones competidores.

Del mismo modo que para los quelatos FeEDDHA, Bermúdez et al. (1999) establecieron los porcentajes teóricos de recomposición que se obtendrían cuando el FeEDDHMA formara parte de una disolución nutritiva con las mismas características que la disolución **C**. Como se ha mencionado anteriormente, el porcentaje de recomposición se obtuvo como suma del efecto que causaría cada ión por separado. De esta forma cuando la disolución se somete a un proceso de descomposición-recomposición hasta pH 6'0, el porcentaje teórico de quelato recompuesto es del 58'5% mientras que, cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 4'5, el porcentaje teórico de FeEDDHMA en disolución es del 55'2%.

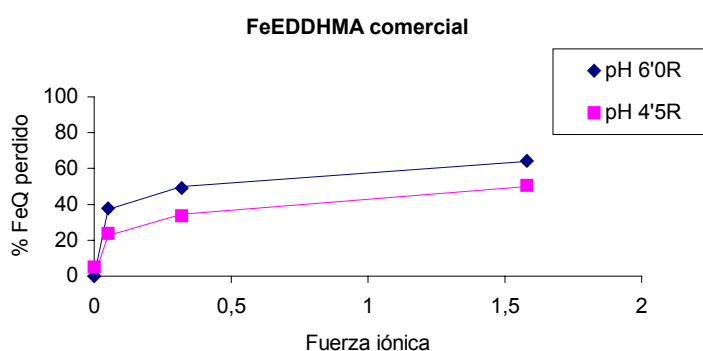
Al comparar los resultados experimentales (62'1% a pH 6'0 y 76'3% a pH 4'5) con los obtenidos teóricamente (Bermúdez, et al. 1999) se llega a la conclusión de que el efecto que causa la presencia conjunta de todos los iones que componen la disolución nutritiva recompuesta a pH 6'0 es similar al esperado como suma del efecto que causa cada uno de ellos por separado. Sin embargo, cuando el proceso de recomposición se lleva a cabo hasta pH 4'5, los porcentajes de FeEDDHMA son algo superiores a los esperados teóricamente. En consecuencia, el comportamiento del FeEDDHMA a pH 4'5 coincide con el observado para los quelatos FeEDDHA a este mismo valor de pH. Por el contrario, la baja estabilidad del FeEDDHMA frente a los procesos de descomposición-recomposición en presencia de



iones competidores hasta pH 6'0 , pueden haber producido que las pérdidas lleguen a ser del mismo orden que las que se encuentran teóricamente como suma del efecto de cada ión por separado, a pesar de que como ocurre a pH 4'5 y para los quelatos FeEDDHA, se puedan producir interacciones entre los diferentes iones competidores.

**Relación entre el porcentaje de Fe quelado descompuesto y la concentración de la disolución nutritiva.**

Como ocurría para el FeEDDHA comercial, la estabilidad del FeEDDHMA comercial en las disoluciones nutritivas que no han sido sometidas a variaciones de pH es completa. Sin embargo, en las disoluciones nutritivas que han sufrido un proceso de descomposición-recomposición, la tendencia general es que a medida que aumenta la fuerza iónica de la disolución nutritiva los porcentajes de quelato recompuesto se reduzcan (Fig.IV.44). Por tanto, tal y como se ha hecho para los quelatos FeEDDHA, se ha encontrado una expresión que permite relacionar estos dos parámetros. Los resultados obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (IV.1) se recogen en la Tabla.IV.20



**Fig.IV.44. Evolución del porcentajes de quelato descompuesto durante los proceso de recomposición en función de la fuerza iónica de la disolución nutritiva.**

Como se observa en la Fig.IV.44, a valores de fuerza iónica bajos, pequeñas variaciones de este parámetro producirán importantes incrementos en el porcentaje de quelato descompuesto. Sin embargo, a medida que el valor de  $\mu$  aumenta, el incremento de dicho porcentaje se hace menor. Este comportamiento se observa a los dos valores de pH en estudio.

**Tabla.IV.20. Parámetros correspondientes a la ecuación (IV.1) a los dos valores de pH en estudio.**

Quelato presente en D.N.	Valor de pH de la recomposición de D.N.	a	b	R <sup>2</sup>
FeEDDHMA comercial	pH 6'0	59'6 ± 0'5	0'156 ± 0'006	0'9995
	pH 4'5	45 ± 3	0'23 ± 0'05	0'9726

En la Tabla.IV.20 se muestran los valores de los parámetros *a* y *b* calculados a partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (IV.1). Como se ha mencionado anteriormente, cuando el valor de la fuerza iónica es 1, el porcentaje de quelato descompuesto es igual al de *a* y de acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla.IV.20, las pérdidas de quelato son superiores a pH 6'0 que a pH 4'5. Estos resultados coinciden con los encontrados para los quelatos FeEDDHA, aunque para el FeEDDHMA comercial las diferencias en los porcentajes de quelato descompuesto a los dos valores de pH son inferiores a las encontradas para los FeEDDHA.

Cuando se comparan los valores de *b* calculados para el FeEDDHMA, se observa que de nuevo en las disoluciones recompuestas a pH 4'5, este valor es prácticamente el doble del obtenido a pH 6'0. Esta tendencia coincide con la de los quelatos FeEDDHA si bien para estos últimos, el valor de este parámetro tanto a pH 6'0 como a pH 4'5, es muy superior a el de FeEDDHMA comercial

### **Conclusiones**

Tras el análisis de los datos experimentales se llega a las siguientes conclusiones:

- Del mismo modo que para el FeEDDHA comercial, la estabilidad de FeEDDHMA comercial en las disoluciones que no se han sometido a variaciones de pH es elevada, independientemente de la concentración y del valor de pH que alcancen dichas disoluciones. Es de destacar que en las disoluciones nutritivas de mayor concentración se observa una ligera pérdida de quelato, la cual es debida a la descomposición del isómero d,l-racémico y se manifiesta con la formación de los quelatos de algunos de los iones competidores presentes en el medio.
- En aquellas disoluciones nutritivas en las que el FeEDDHMA se ha sometido a un proceso de descomposición-recomposición, el porcentaje de quelato recuperado se reduce a medida que la concentración de la disolución nutritiva aumenta, siendo las pérdidas superiores cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 6'0 que hasta pH 4'5. Este comportamiento coincide con el encontrado para los quelatos FeEDDHA.
- La estabilidad del FeEDDHMA en las disoluciones nutritivas que se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición es inferior a la de los quelatos FeEDDHA.
- De los dos isómeros que componen el quelato, el que sufre mayores pérdidas como consecuencia de la recomposición del FeEDDHMA en la disolución nutritiva es el d,l-racémico, es decir el de menor estabilidad.

- Para la disolución **C** recompuesta a pH 6'0, el porcentaje de recomposición obtenido experimentalmente coincide con el establecido teóricamente por Bermúdez et al (1999) como suma del efecto de cada ión por separado. Este comportamiento difiere del observado en la disolución recompuesta hasta pH 4'5 en la que como ocurría para los quelatos FeEDDHA, los porcentajes de recomposición experimentales son superiores a los teóricos.



#### **IV.4. ENSAYO 3: EFECTO DE LOS ANIONES CLORURO, SULFATO Y NITRATO EN LA ESTABILIDAD DE LOS ISÓMEROS DE FeEDDHA Y FeEDDHMA.**

En el Ensayo 2 se ha determinado el efecto que produce sobre los isómeros de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA, la presencia conjunta de todos los cationes metálicos que componen una disolución nutritiva y del anión fosfato. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este caso, los cationes se adicionaron en forma de cloruros mientras que en una disolución nutritiva real, dichos cationes se añaden como sulfatos y nitratos. Este hecho ha planteado la necesidad de determinar si el comportamiento de los quelatos cuando en la disolución estén presentes nitratos y sulfatos será igual al observado con los cloruros o si por el contrario, se reducirán o se incrementarán las pérdidas de Fe quelado.

##### **IV.4.1. Materiales y métodos.**

La experiencia se llevó a cabo con FeEDDHA estándar y con los mismos quelatos comerciales empleados en los Ensayos 1 y 2. Del mismo modo, los valores de pH de estudio fueron los mismos que en los ensayos anteriores (pH 6'0 y pH 4'5).

La composición y la fuerza iónica ( $\mu$ ) de las disoluciones nutritivas que se emplearon en este estudio aparece en la Tabla.IV.21. Como se puede observar, se han mantenido los mismos NQ que en el Ensayo 2. Sin embargo, mientras que en el Ensayo anterior habían tres disoluciones de distinta concentración (disoluciones **A**, **B** y **C**) (Tabla.IV.5) en este caso, sólo ha sido posible realizarlo con las dos más diluidas (disolución **B'** y **C'**), debido a que la elevada concentración de la disolución **A** producía la precipitación de los sulfatos junto al resto de los iones competidores presentes en la misma.

Tabla IV.21. Composición de las disoluciones nutritivas

Compuestos	Conc. B' (M) $\mu=0'316$	Conc. C' (M) $\mu=0'047$	NQ
FeEDDHA estándar	$3'58 \cdot 10^{-4}$	$5'35 \cdot 10^{-5}$	1'00
FeEDDHA comercial	$3'58 \cdot 10^{-4}$	$5'35 \cdot 10^{-5}$	1'00
FeEDDHMA comercial	$3'58 \cdot 10^{-4}$	$5'35 \cdot 10^{-5}$	1'00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	$7'50 \cdot 10^{-2}$	$1'12 \cdot 10^{-2}$	209'5
MgSO <sub>4</sub>	$2'70 \cdot 10^{-2}$	$4'05 \cdot 10^{-3}$	75'42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0'01	$1'50 \cdot 10^{-3}$	27'93
CuSO <sub>4</sub>	$1'07 \cdot 10^{-5}$	$1'61 \cdot 10^{-6}$	0'03
ZnSO <sub>4</sub>	$1'22 \cdot 10^{-4}$	$1'83 \cdot 10^{-5}$	0'34
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	$1'07 \cdot 10^{-5}$	$1'61 \cdot 10^{-6}$	0'03

La sistemática de trabajo fue la misma que en el Ensayo 2. Se prepararon las disoluciones nutritivas mezclando los compuestos que aparecen en la Tabla.IV.21 a las concentraciones indicadas, adicionando el quelato de Fe en último lugar y ajustando posteriormente a los valores de pH en estudio (6'0 y 4'5). Alícuotas de estas disoluciones se sometieron a procesos de descomposición-recomposición del quelato mediante variaciones del pH de la disolución.

A la hora de realizar este ensayo, también se prepararon disoluciones de FeEDDHA estándar y comercial y de FeEDDHMA comercial de concentración  $3'58 \cdot 10^{-4}$  M y  $5'35 \cdot 10^{-5}$  M de Fe quelado, las cuales se utilizaron como blancos que permitieron determinar como afecta la presencia de los diferentes iones competidores en disolución a la estabilidad del quelato.

Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura y seguidamente se filtraron con filtros de 0'22  $\mu$ m (Osmotics). Las muestras se realizaron por triplicado y en todas ellas se determinó mediante HPLC, la

concentración de Fe quelado, el porcentaje de cada uno de los isómeros que constituyen los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA y la posible formación de los quelatos de los iones interferentes.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el método estadístico del análisis de la variancia y los tests de Tukey y Duncan para lo cual, se empleó el programa informático SPSS (versión 10.0.6). Cabe destacar que tras el tratamiento estadístico se consideraron que dos valores eran estadísticamente diferentes a un nivel de significación del 5%.



**IV.4.2. Resultados y discusión.**

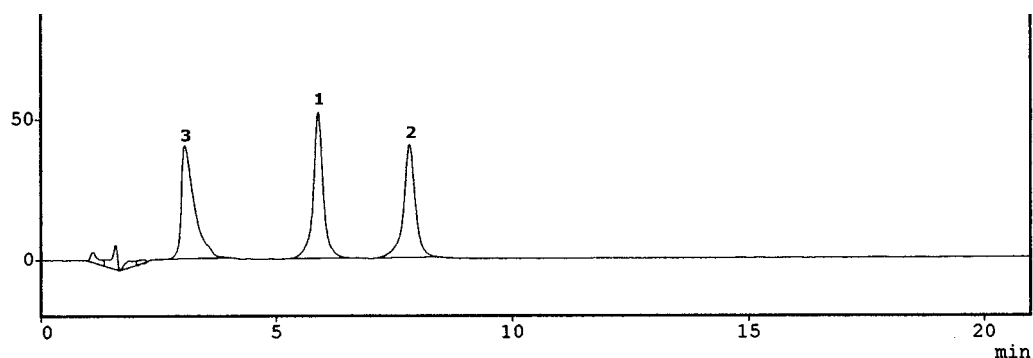
**IV.4.2.1. Comportamiento del FeEDDHA estándar en disolución nutritiva.**

**Disoluciones a pH 6'0.**

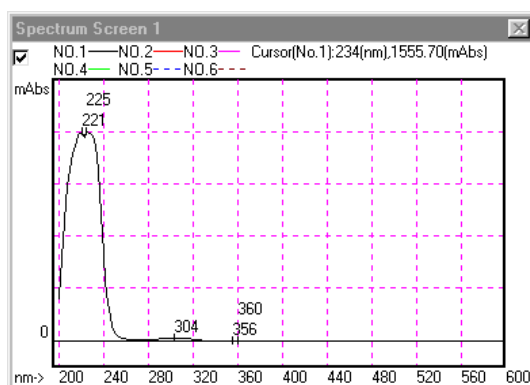
Quando el quelato FeEDDHA estándar forma parte de la disolución **B'** a pH 6'0 (Fig.IV.45), la concentración de Fe quelado que permanece en disolución es estadísticamente igual a la del blanco (Fig.IX.1 del Anexos.IX.1) (Tabla.IV.22). Lo mismo ocurre con la disolución **C'** (no se incluye figura) (Tabla.IV.22). Por tanto, la descomposición que ha sufrido el quelato como consecuencia del efecto que causan los distintos iones competidores ha sido mínima, independientemente de la concentración a la que se prepare la disolución nutritiva (Tabla.IV.22 y IV.23).

**Tabla.IV.22. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar en las disoluciones nutritivas con la disolución patrón a cada valor de pH.**

		D.N. B'			D.N. C'		
		Conc.(M) X10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc.(M) X10 <sup>4</sup>	F	Sig
pH 6'0	D.N. Patrón	3'31	7'013	0'057	5'27	0'226	0'633
		3'58			5'35		
pH 6'0 (R)	D.N. Patrón	1'80	219'67	0'000	3'60	396'0	0'000
		3'58			5'35		
pH 4'5	D.N. Patrón	3'45	1'480	0'291	5'12	4'090	0'113
		3'58			5'35		
pH 4'5 (R)	D.N. Patrón	2'68	74'369	0'001	3'69	279'1	0'000
		3'58			5'35		



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'9	766907	$1'71 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'8	711104	$1'60 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1478011</b>	<b><math>3'31 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'0	781641	--



**Pico 3**

**Fig.IV.45. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva B' a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico, Pico 2: isómero meso**

Por otro lado, no se han encontrado diferencias significativas en la concentración de Fe (o-EDDHA) que existe en las disoluciones preparadas con nitratos y sulfatos y la obtenida cuando dichas disoluciones contienen cloruros (Tabla.IV.24), independientemente de la concentración a la que se preparen las mismas. En consecuencia, la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar en las disoluciones nutritivas que no han sufrido variaciones de pH

es igual, tanto si los cationes competidores se añaden en forma de sulfatos y nitratos, como si se hace en forma de cloruros.

**Tabla.IV.23. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar en las distintas disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos Porcentaje de Fe quelado.**

		% FeQ	F	Sig
pH 6'0	D.N. B'	92'3	4'675	0'097
	D.N. C'	97'9		
pH 6'0 (R)	D.N. B'	50'3	96'180	0'001
	D.N. C'	66'1		
pH 4'5	D.N. B'	96,4	0'986	0'377
	D.N. C'	95'0		
pH 4'5 (R)	D.N. B'	74'0	65'884	0'001
	D.N. C'	68'6		

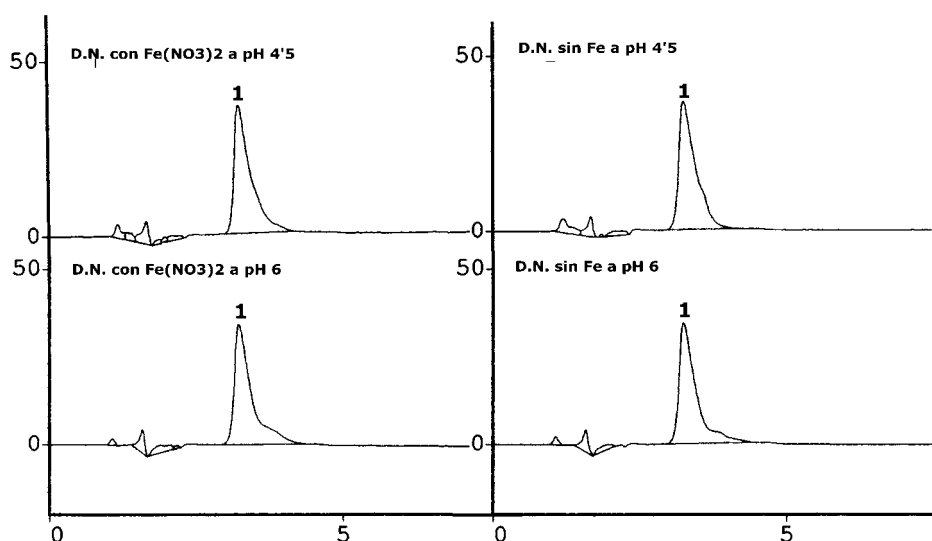
**Tabla.IV.24. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar en las disoluciones nutritivas con nitratos y sulfatos y las disoluciones nutritivas con cloruros a cada valor de pH. Datos concentración de Fe quelado (M).**

Concentración de Fe quelado (M)		D.N. B			D.N. C		
		Conc(M) X10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc(M) X10 <sup>5</sup>	F	Sig
pH 6'0	Cloruros	3'35	2'000	0'230	4'95	5'219	0'084
	Sulfatos	3'31			5'27		
pH 6'0 (R)	Cloruros	2'08	15'940	0'016	4'62	20'868	0'010
	Sulfatos	1'80			3'60		
pH 4'5	Cloruros	3'42	1'493	0'289	5'45	0'493	0'521
	Sulfatos	3'45			5'12		
pH 4'5 (R)	Cloruros	3'01	324'448	0'000	4'93	641'630	0'000
	Sulfatos	2'68			3'69		

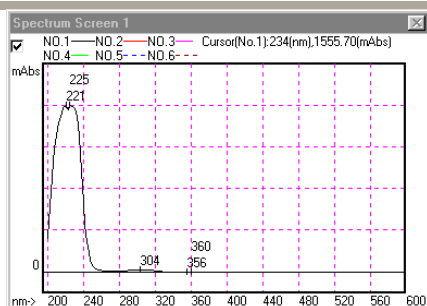
En los cromatogramas de HPLC correspondientes a las disoluciones **B'** (Fig.IV.45) y **C'** (no se incluye figura), además de los picos de los isómeros, también aparece un pico en torno de 3 min. (pico 3), cuya área es superior a la de los isómeros. Dado que apenas ha habido descomposición del FeEDDHA (Tabla.IV.22), este pico no puede atribuirse a la formación de los quelatos de los iones competidores, lo que se confirma a partir el espectro UV-Vis realizado a dicho pico (Fig.IV.45).

Con el fin de determinar el origen del pico 3, se prepararon disoluciones nutritivas iguales que las descritas que el apartado de materiales y métodos (Tabla.IV.21) pero en las que el Fe se adicionó en forma de nitrato ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ), en vez de como quelato. Estas disoluciones se sometieron a un estudio cromatográfico obteniendo que en los cromatogramas de HPLC (Fig.IV.46), de nuevo aparece un pico con un tiempo de elución y espectro UV-Vis (Fig.IV.46) que coincide con los del encontrado en las disoluciones en las que el Fe se había añadido como quelato.

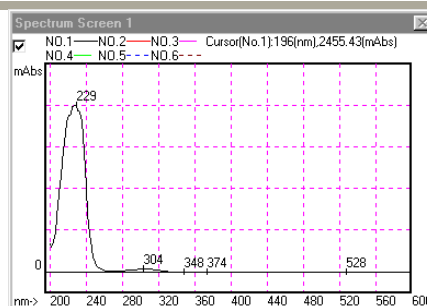
Seguidamente, se prepararon disoluciones nutritivas en las que estaban presentes todos los nutrientes indicados en la Tabla.IV.21 excepto el hierro. Se realizaron los correspondientes cromatogramas de HPLC (Fig.IV.46) y se obtuvo que en todos ellos aparecía un único pico que coincidía con el encontrado en las disoluciones nutritivas en la que el Fe sí estaba presente (tanto en forma de quelato como de nitrato) por lo que se dedujo que este pico no tenía como origen la formación de algún compuesto relacionado con el Fe.



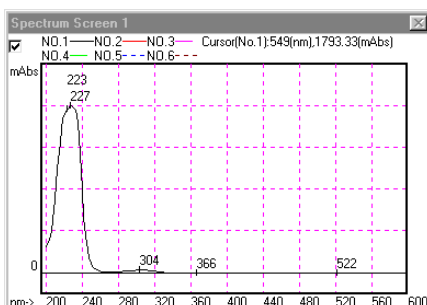
	Pico	Tiempo (min)	Área
<b>D.N. con Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a pH 6</b>	1	3'0	709992
<b>D.N. con Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a pH 4'5</b>	1	3'0	728072
<b>D.N. sin Fe a pH 6</b>	1	3'0	699225
<b>D.N. sin Fe pH 4'5</b>	1	3'0	731752



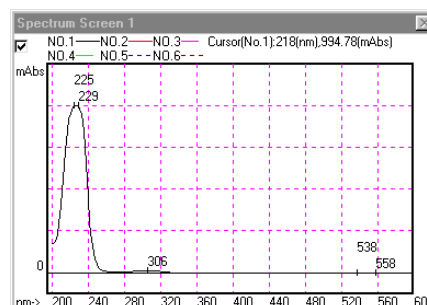
**Pico 1 (D.N. con Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a pH 6)**



**Pico 1 (D.N. con Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a pH 4'5)**



**Pico 1 (D.N. sin Fe a pH 6)**



**Pico 1 (D.N. sin Fe a pH 4'5)**

**Fig.IV.46. Cromatogramas de HPLC y espectros UV-Vis de las disoluciones nutritivas con Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y sin Fe a los dos valores de pH en estudio.**

En último lugar, se prepararon disoluciones de cada uno de los componentes de la disolución nutritiva por separado y se sometieron a análisis por HPLC. En los cromatogramas de cada una de estas muestras no se obtuvo ningún pico, con lo que se llegó a la conclusión de que el pico con un tiempo de elución de 3,0 min encontrado en las disoluciones **B'** y **C'**, debía ser producido por la formación de algún complejo hidratado de sulfato y/o nitrato con el resto de los cationes presentes en la disolución ya que son los únicos iones que han variado con respecto a las disoluciones del Ensayo 2 en las que este pico no aparecía (**B** y **C**).

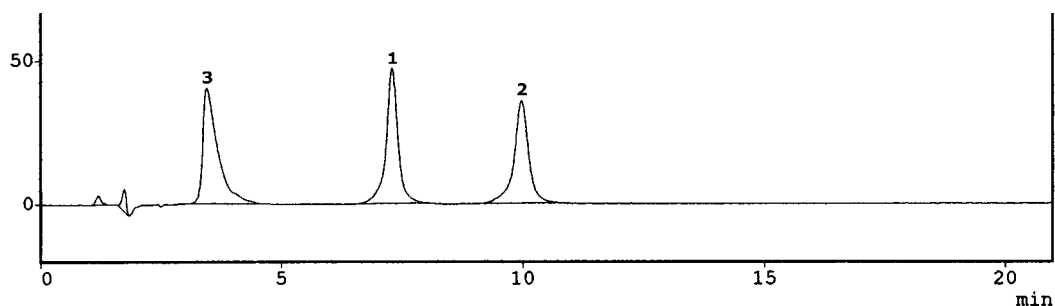
### **Disoluciones a pH 4'5.**

En los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B'** (Fig.IV.47) y **C'** (no se incluye figura) a pH 4'5, aparecen los picos de los isómeros que componen el quelato FeEDDHA estándar (picos 1 y 2), cuyos tiempos de elución han aumentado ligeramente con respecto a los de las disoluciones a pH 6'0 (Fig.IV.45). Cuando se compara el área de los picos 1 y 2 con las obtenidas en los blancos (Fig.IX.1 y IX.2 del Anexo.IX.1) se deduce que la estabilidad de este quelato frente a las condiciones del medio es elevada (Tabla.IV.22), independientemente de la concentración a la que se preparen las disoluciones nutritivas (Tabla.IV.23).

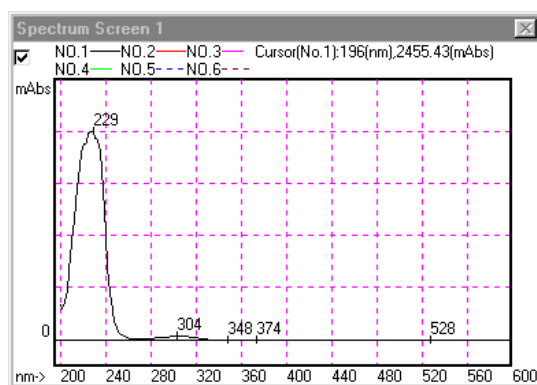
En el cromatograma de la Fig.IV.47 también se observa el pico con un tiempo de retención en torno a 3 min (pico 3) que anteriormente se ha identificado como un complejo hidratado de sulfato y/o nitrato. El área de este pico en las disoluciones a pH 4'5 es superior que a pH 6'0, por lo que la estabilidad del complejo se ve influenciada por el pH final de la disolución.

Con respecto a la estabilidad que el FeEDDHA estándar presenta en la disoluciones **B'** y **C'** a los dos valores de pH en estudio (Tabla.IV.25), no se han encontrado diferencias significativas en la cantidad de Fe (o-EDDHA) que permanece a pH 4'5 y la obtenida a pH 6'0. Este comportamiento coincide con el del Ensayo 2.

Por otro lado, la concentración de Fe quelado en las disoluciones preparadas con nitratos y sulfatos es muy similar a la encontrada cuando estas mismas disoluciones contienen cloruros (Tabla.IV.24), confirmando así los resultados obtenidos a pH 6'0.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	7'3	808716	1'79·10 <sup>-4</sup>
2	meso	9'9	752186	1'66·10 <sup>-4</sup>
	<b>Total</b>	--	<b>1560902</b>	<b>3'45·10<sup>-4</sup></b>
3	--	3'4	877133	--



Pico 3

Fig.IV.47. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva B' a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.

**Tabla.IV.25. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA estándar a los diferentes valores de pH en las distintas disoluciones nutritivas. Datos de concentración (M).** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento (pH 6, pH 6 recompuesto, pH 6'0 y pH 4'5 recompuesto), según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamientos	D.N. B'	D.N. C'
pH 6'0	3'31·10 <sup>-4</sup> a	5'27·10 <sup>-5</sup> a
pH 6'0 recompuesto	1'80·10 <sup>-4</sup> c	3'60·10 <sup>-5</sup> b
pH 4'5	3'45·10 <sup>-4</sup> a	5'12·10 <sup>-5</sup> a
pH 4'5 recompuesto	2'68·10 <sup>-4</sup> b	3'69·10 <sup>-5</sup> b

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 6'0 del quelato FeEDDHA estándar en disolución nutritiva.**

El análisis de los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B'** (Fig.IV.48) y **C'** (no se incluye figura) recompuestas a pH 6'0, pone de manifiesto que el proceso de recomposición del quelato FeEDDHA en presencia de los distintos iones competidores ha dado lugar a una importante descomposición de los isómeros d,l-racémico y meso. Cabe señalar que en la disolución más concentrada, el isómero que sufre mayores pérdidas es el meso, recuperándose un 42'2% frente al 58'3% del d,l-racémico (Tabla.IV.26). Por el contrario, en la disolución **C'**, ambos isómeros se ven afectados en la misma medida (Tabla.IV.26), produciéndose una pérdida en torno al 34%.

En este cromatograma (Fig.IV.48) también se observa el pico correspondiente al complejo de nitrato y/o sulfato (pico 3). Tras comparar su área con la obtenida en la disolución a pH 6'0 que no ha sufrido variaciones de pH (Fig.IV.45) se encuentra que en ambos casos, el valor es similar, por lo que la estabilidad de este complejo no se ve afectada por el proceso de descomposición-recomposición del FeEDDHA.

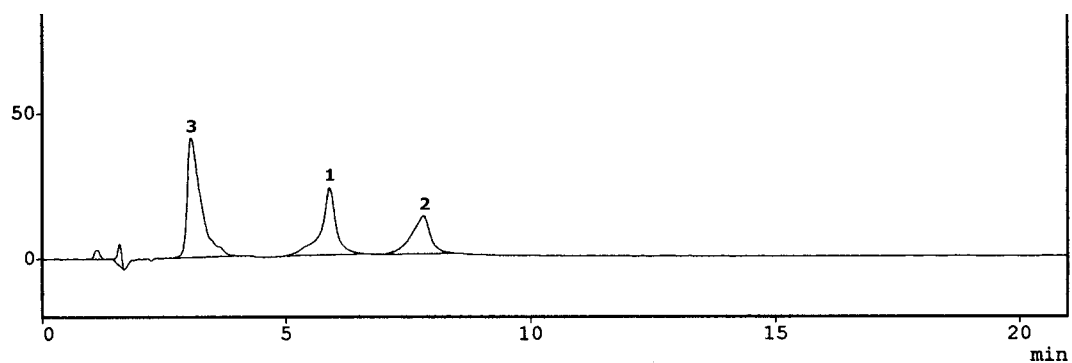


**Tabla.IV.26. Comparación de la estabilidad de los isómeros que componen el quelato FeEDDHA estándar en las disoluciones nutritivas a cada valor de pH.**

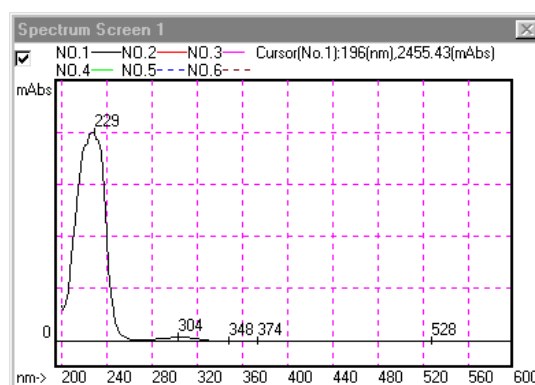
	Isómeros	D.N. B			D.N. C		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	racémico	95'2	113'51	0'000	101'2	1'836	0'247
	meso	88'7			94'6		
pH 6'0 (R)	racémico	58'3	47'305	0'002	66'0	0'196	0'681
	meso	42'2			66'3		
pH 4'5	racémico	98'3	184'47	0'000	96'0	0'961	0'382
	meso	94'5			93'8		
pH 4'5 (R)	racémico	80'7	6242'4	0'000	70'3	6'002	0'070
	meso	67'2			66'5		

De acuerdo con los porcentajes de Fe recuperados en las disoluciones recompuestas hasta pH 6 (Tabla.IV.23) se llega a la conclusión de que como ocurría en el Ensayo 2, la pérdida de FeEDDHA aumenta a medida que lo hace la concentración de la disolución nutritiva, a pesar de que los NQ y el valor de pH se han mantenido constantes.

Cuando en las disoluciones nutritivas **B'** y **C'** se produce la descomposición-recomposición del quelato hasta pH 6'0, la concentración de FeEDDHA estándar que permanece en cada una de estas disoluciones es estadísticamente inferior a las encontradas en el Ensayo 2 (**B** y **C**) (Tabla.IV.24). Este hecho indica que la pérdida de Fe (o-EDDHA) en presencia de nitratos y sulfatos es mayor que cuando los iones cloruros forman parte de las disoluciones nutritivas, lo que puede ser debido a que la competencia entre los aniones sulfato y/o nitrato con el agente quelante (o-EDDHA) por el Fe, sea superior a la que ejercen los iones cloruro.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'9	469186	$1'04 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'8	338999	$0'76 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>808185</b>	<b><math>1'80 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'0	801941	--



Pico 3

**Fig.IV.48. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva B' a recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.**

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 4'5 del quelato FeEDDHA estándar en disolución nutritiva.**

Cuando el FeEDDHA estándar está presente en las disoluciones nutritivas B' y C' (no se incluyen figuras) y se somete a un proceso de descomposición-recomposición hasta pH 4'5, se observa que la

concentración de Fe (o-EDDHA) se reduce con respecto a la de los blancos de FeEDDHA estándar (Fig.IX.1 y IX.2 del Anexo.IX.1) (Tabla.IV.22).

En la disolución más concentrada, el isómero que sufre una mayor descomposición es el meso, recuperándose un 67'2% frente al 80'7% del d,l-racémico (Tabla.IV.26). Sin embargo en la disolución de menor concentración, las pérdidas de meso (33'5%) son similares a las de d,l-racémico (29'7%) (Tabla.IV.26). Este comportamiento coincide con el encontrado en la disoluciones recompuestas hasta pH 6'0.

Tras comparar el porcentaje de Fe (o-EDDHA) recompuesto en las disoluciones **B'** (74'0%) y **C'** (68'6%) (Tabla.IV.23) a pH 4'5 se encuentra que a diferencia del comportamiento observado hasta el momento, la concentración de FeEDDHA estándar en la disolución más diluida es inferior a la de mayor concentración si bien, las diferencias entre ambas son pequeñas.

Cabe señalar que la estabilidad del quelato en la disolución **B'** recompuesta a pH 4'5 ( $2'68 \cdot 10^{-4}$  M) es superior a la encontrada a pH 6'0 ( $1'80 \cdot 10^{-4}$  M) (Tabla.IV.25). Por el contrario, la concentración de quelato recuperado en la disolución **C'** es similar a los dos valores de pH en estudio (Tabla.IV.25).

Por otro lado, cuando las disoluciones **B'** y **C'** se someten a un proceso de recomposición del quelato hasta pH 4'5, la concentración de Fe quelado que permanece en disolución es inferior a la encontrada en el Ensayo 2 (**B** y **C**) (Tabla.IV.24). En consecuencia los procesos de recomposición del FeEDDHA en las disoluciones nutritivas con nitratos y sulfatos producirán mayores pérdidas de Fe (o-EDDHA) que en las disoluciones que contienen cloruros.

## **Conclusiones**

De lo expuesto hasta el momento se llega a las siguientes conclusiones:

- La estabilidad del quelato FeEDDHA estándar cuando forma parte de las disoluciones nutritivas que contienen nitratos y sulfatos y que no se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición, es elevada y similar a la encontrada en presencia de cloruros, independientemente de la concentración y del pH final de la disolución.
- Cuando las disoluciones preparadas con nitratos y sulfatos se someten a procesos de descomposición-recomposición del FeEDDHA estándar hasta los dos valores de pH en estudio, las pérdidas de Fe quelado son superiores a las encontradas en las disoluciones que contienen cloruros. Este hecho indica que la competencia de los aniones sulfato y/o nitrato con el agente quelante (o-EDDHA) por el Fe, es mayor que la que ejercen los iones cloruro.
- Las pérdidas de Fe (o-EDDHA) en las disoluciones recompuestas hasta pH 6 aumentan a medida que lo hace la concentración de la disolución nutritiva, a pesar de que los NQ y el valor de pH se han mantenido constantes. Por el contrario, cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 4,5 el porcentaje de quelato recuperado en la disolución más diluida es ligeramente inferior al de la disolución de mayor concentración.

**IV.4.2.2. Comportamiento del FeEDDHA comercial en disolución nutritiva.**

**Disoluciones a pH 6'0.**

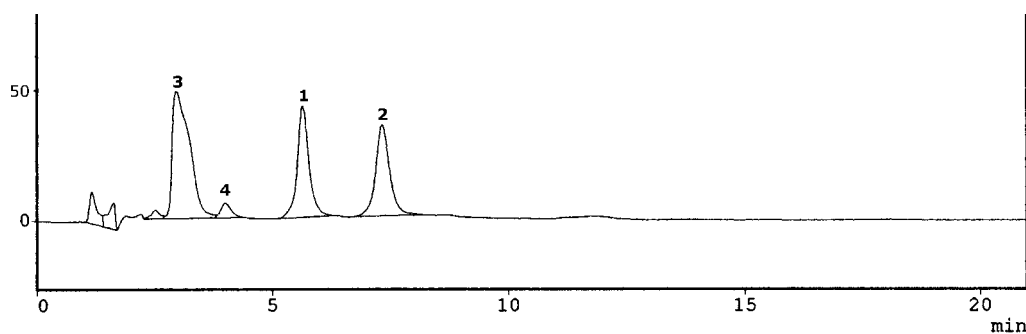
De acuerdo con los resultados recogidos en las Fig.IV.49 y IV.50, las concentraciones de Fe (o-EDDHA) que permanecen en la disoluciones **B'** y **C'** a pH 6'0, son muy similares a las de los correspondientes patrones de FeEDDHA comercial (Fig.IX.5 y IX.6 del Anexo.IX.1) (Tabla.IV.27). En consecuencia, la estabilidad del quelato a este valor de pH, no se ve afectada por la presencia de los diferentes iones competidores que constituyen la disolución nutritiva.

Este comportamiento coincide con el observado para el FeEDDHA estándar, no encontrándose diferencias significativas en el contenido de Fe (o-EDDHA) que ambos quelatos mantienen en las disoluciones en estudio a pH 6'0 (Tabla.IV 28).

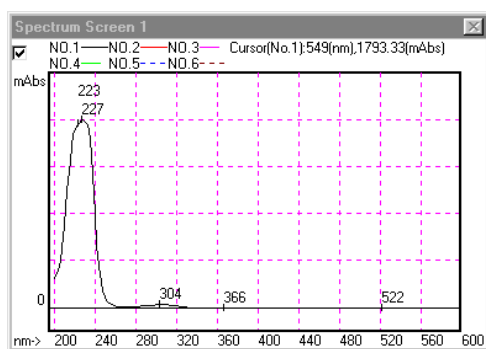
**Tabla.IV.27. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA comercial en las disoluciones nutritivas y con la disolución patrón a cada valor de pH.**

		D.N. B'			D.N. C'		
		Conc.(M) X10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc.(M) X10 <sup>5</sup>	F	Sig
<b>pH 6'0</b>	<b>D.N. Patrón</b>	3'37	2'487	0'190	5'15	3'046	0'156
		3'58			5'35		
<b>pH 6'0 (R)</b>	<b>D.N. Patrón</b>	2'78	41'362	0'003	5'04	8'050	0'049
		3'58			5'35		
<b>pH 4'5</b>	<b>D.N. Patrón</b>	3'37	3'645	0'129	5'23	0'550	0'499
		3'58			5'35		
<b>pH 4'5 (R)</b>	<b>D.N. Patrón</b>	3'28	8'356	0'055	5'05	2'909	0'163
		3'58			5'35		

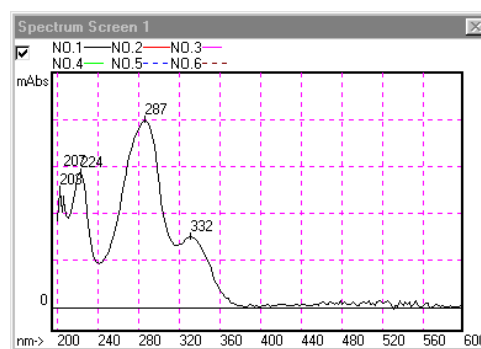
La estabilidad del producto comercial en las disoluciones preparadas con nitratos y sulfatos a pH 6'0, es estadísticamente igual a la observada en presencia de cloruros ya que en ningún caso, ha habido una descomposición notable de quelato (Tabla.IV.29).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	704314	$1'73 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'3	663874	$1'64 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1368188</b>	<b><math>3'37 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	2'9	1185646	--
4	--	4'0	84120	--

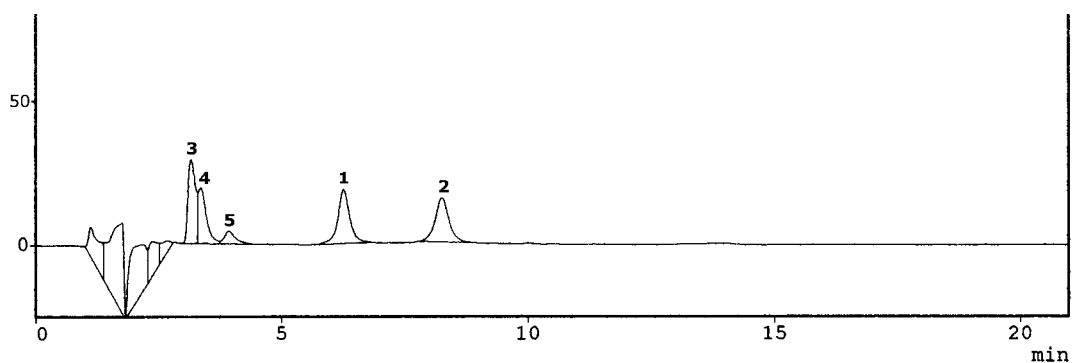


Pico 3

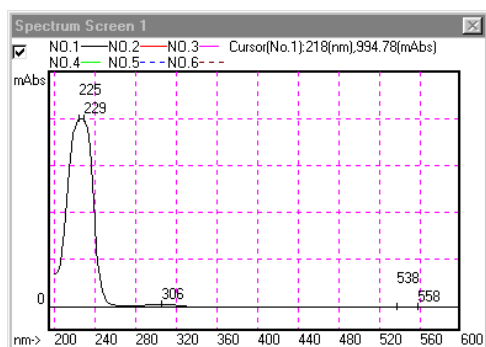


Pico 4

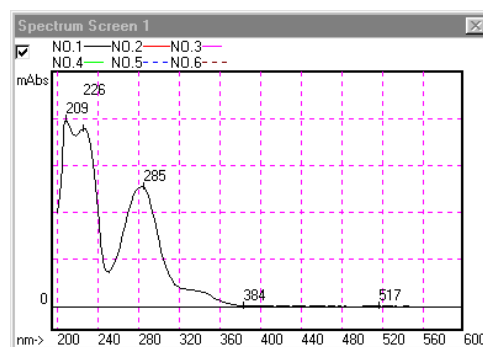
Fig.IV.49. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva B' a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.



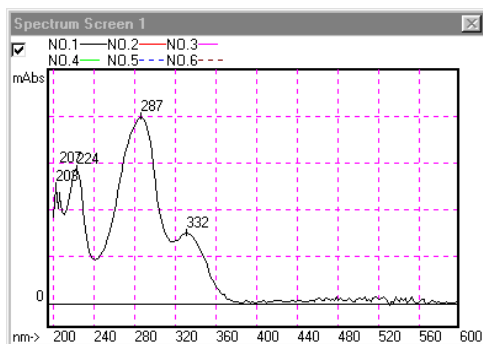
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	6'2	315623	$2'60 \cdot 10^{-5}$
2	meso	8'2	300175	$2'55 \cdot 10^{-5}$
	<b>Total</b>	--	<b>615798</b>	<b><math>5'15 \cdot 10^{-5}</math></b>
3	--	3'1	322153	--
4	--	3'6	218800	--
5	--	3'9	69879	--



**Pico 3**



**Pico 4**



**Pico 5**

**Fig.IV.50. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva C' a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.**

**Tabla.IV.28. Comparación de la estabilidad de los quelatos FeEDDHA comercial y comercial en las dos disoluciones nutritivas para cada valor de pH.**

**Datos Concentración de Fe quelado (M).**

Conc. Quelato (M)	FeEDDHA	D.N. B'			D.N. C'		
		Conc (M) x10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc (M) x10 <sup>5</sup>	F	Sig
pH 6'0	Estándar Comercial	3'31	0'454	0'538	5'27	5'593	0'057
		3'37			5'15		
pH 6'0 (R)	Estándar Comercial	1'80	118'400	0'000	3'60	1674'0	0'000
		2'78			5'04		
pH 4'5	Estándar Comercial	3'45	5'165	0'085	5'12	0'566	0'495
		3'37			5'23		
pH 4'5 (R)	Estándar Comercial	2'68	1584'2	0'000	3'69	71'918	0'001
		3'28			5'05		

**Tabla.IV.29. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA comercial en las disoluciones nutritivas con nitratos y sulfatos y las disoluciones nutritivas con cloruros a cada valor de pH. Datos concentración de Fe quelado (M).**

Concentración de Fe quelado (M)		D.N. B			D.N. C		
		Conc(M) X10 <sup>4</sup>	F	Sig	Conc(M) X10 <sup>5</sup>	F	Sig
pH 6'0	Cloruros Sulfatos	3'20	1'172	0'340	5'28	1'556	0'280
		3'37			5'15		
pH 6'0 (R)	Cloruros Sulfatos	2'42	20'484	0'011	4'98	0'532	0'506
		2'78			5'04		
pH 4'5	Cloruros Sulfatos	3'53	8'286	0'053	5'19	0'072	0'802
		3'37			5'23		
pH 4'5 (R)	Cloruros Sulfatos	3'34	8'123	0'057	5'17	0'603	0'481
		3'28			5'05		



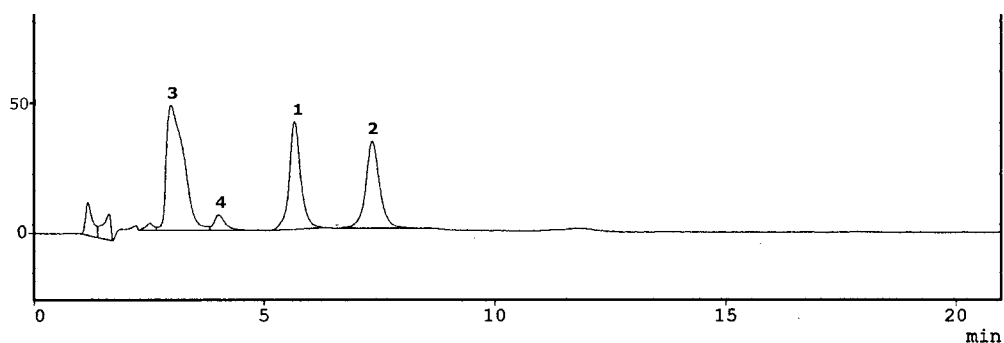
En los cromatogramas de HPLC mostrados en las Fig.IV.49 y IV.50, además de los picos de los isómeros d,l-racémico y meso (picos 1 y 2), también se observan los picos característicos de este quelato comercial (picos 4 y 5) y el pico que anteriormente se ha identificado como un complejo de sulfato y/o nitrato (pico 3). Como se observa en la Fig.IV.50, el área del pico 3 en la disolución **C'** es del orden de la que presentan los isómeros, sin embargo, en la disolución de mayor concentración (**B'**) ha aumentado hasta alcanzar un valor que es prácticamente el doble de la de los isómeros. Este hecho es debido a que el pico 3 se ha solapado con uno de los picos de los agentes quelantes no (o-EDDHA) del quelato comercial.

Con respecto a los agentes quelantes no (o-EDDHA) que contiene el producto comercial, la estabilidad del compuesto que da lugar al pico 4 se ha visto influenciada por la concentración de la disolución nutritiva ya que, en la disolución más concentrada, este pico ha reducido su área en un 76'5% mientras que en la más diluida, únicamente lo ha hecho en un 18'5%.

### **Disoluciones a pH 4'5.**

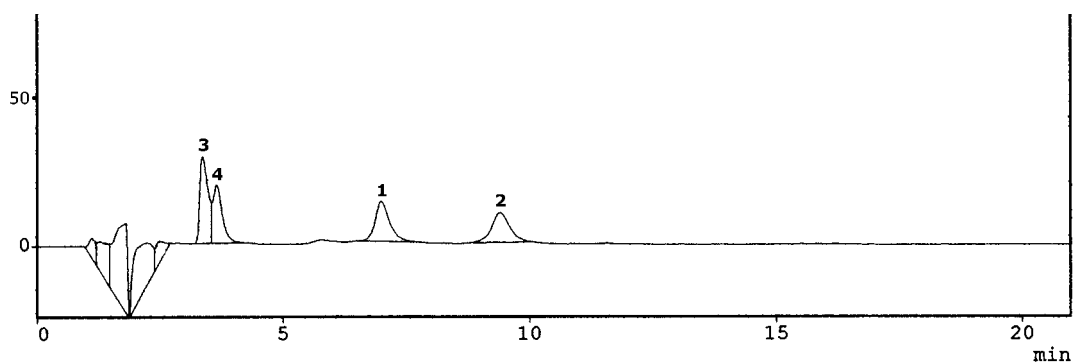
Del análisis del comportamiento del FeEDDHA comercial en las disoluciones nutritivas **B'** (Fig.IV.51) y **C'** (Fig.IV.52) a pH 4'5 se deduce que la presencia de los diferentes iones competidores no afecta a la estabilidad del quelato (Tabla.IV.27), permaneciendo en disolución el 94'1% y el 97'2% del Fe (o-EDDHA) que en un principio se adicionó a la disolución nutritiva respectivamente.

El comportamiento del FeEDDHA comercial en las disoluciones a pH 4'5 es comparable con el observado a pH 6'0, ya que en ningún caso se ha producido la descomposición del quelado (Tabla.IV.30).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	694690'3	$1'74 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'3	668650	$1'63 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1363340'3</b>	<b><math>3'37 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	3'0	1215912	--
4	--	4'0	93962	--

Fig.IV.51. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B' a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	7'0	325566	$2'72 \cdot 10^{-5}$
2	meso	9'4	301022'7	$2'51 \cdot 10^{-5}$
	<b>Total</b>	--	<b>626588'7</b>	<b><math>5'23 \cdot 10^{-5}</math></b>
3	--	3'3	360529	--
4	--	3'6	271280	--

Fig.IV.52. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva C' a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.

Por otro lado, la concentración de Fe (o-EDDHA) que existe en las disoluciones preparada con nitratos y sulfatos a pH 4'5 es similar al obtenida para estas mismas disoluciones en presencia de cloruros (Tabla.IV.29), tendencia que coincide con la observada a pH 6'0.

**Tabla.IV.30. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA comercial a los diferentes valores de pH en cada disolución nutritiva. Datos de concentración (M).**

Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento (pH 6'0, pH 6'0 recompuesto, pH 4'5 y pH 4'5 recompuesto), según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamientos	D.N. B'	D.N. C'
pH 6'0	3'37·10 <sup>-4</sup> a	5'15·10 <sup>-5</sup> a
pH 6'0 recompuesto	2'78·10 <sup>-4</sup> b	5'04·10 <sup>-5</sup> a
pH 4'5	3'37·10 <sup>-4</sup> a	5'23·10 <sup>-5</sup> a
pH 4'5 recompuesto	3'28·10 <sup>-4</sup> a	5'05·10 <sup>-5</sup> a

Cabe señalar que como ocurría a pH 6'0, en los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B'** y **C'** a pH 4'5 (Fig.IV.51 y IV.52) también se observa el pico correspondiente a la formación del complejo de sulfato y/o nitrato (pico 3), cuya área ha aumentado con respecto a la de la disolución a pH 6'0.

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 6'0 del quelato FeEDDHA comercial en disolución nutritiva.**

Del análisis de los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B'** y **C'** recompuestas hasta pH 6'0 (Fig.IV.53 y IV.54) se deduce que la concentración de Fe (o-EDDHA) recuperada, es superior a la obtenida para el quelato estándar (Tabla.IV.28). La explicación a este hecho puede estar en que el exceso de Fe no (o-EDDHA) y/o la reacción de los agentes quelantes no (o-EDDHA) del producto comercial, con los componentes de la

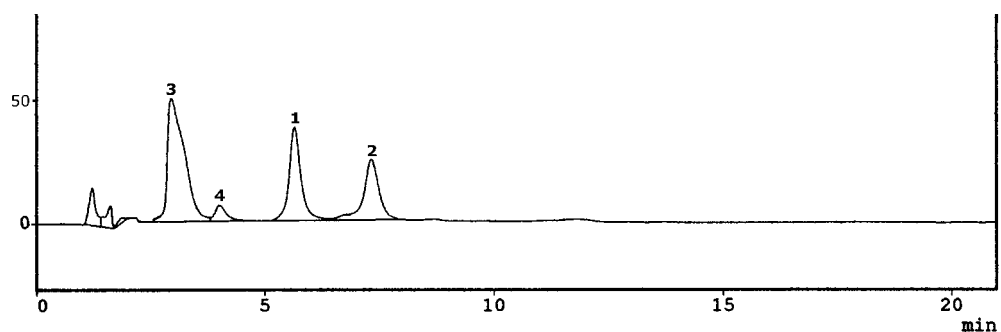
disolución, reduzcan los efectos negativos que los iones competidores ejercen sobre el quelato Fe (o-EDDHA), aumentando así su estabilidad.

Es de destacar que el proceso de recomposición del FeEDDHA comercial en la disolución más concentrada ha afectado ligeramente a la estabilidad de ambos isómeros (Fig.IV.53 y Tabla.IV.31), produciendo una pérdida del 22'4% del quelato que había inicialmente en la disolución. Sin embargo en la disolución más diluida, las pérdidas de Fe (o-EDDHA) se han reducido hasta el 6'4% y en consecuencia, la descomposición que ha sufrido este quelato ha sido mínima (Tabla.IV.27).

A partir de estos resultados se llega a la conclusión de que las pérdidas de FeEDDHA aumentan a medida que lo hace la concentración de las disoluciones nutritivas, aunque los NQ y el valor de pH se mantenga constantes (Tabla.IV.32). Comportamiento similar al mostrado en el Ensayo 2.

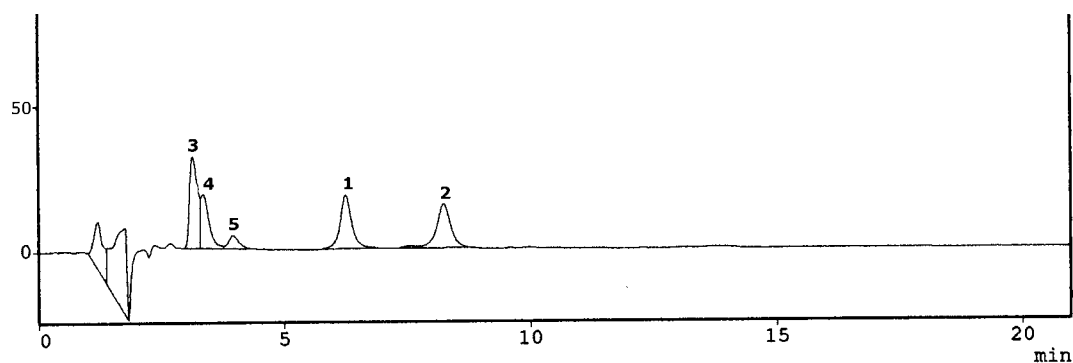
**Tabla.IV.31. Comparación de la estabilidad de los isómeros que componen el quelato FeEDDHA comercial en las disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos porcentaje de Fe quelado.**

	Isómeros	D.N. B'			D.N. C'		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	racémico	93'1	0'206	0'674	95'1	0'121	0'745
	meso	95'0			96'2		
pH 6'0 (R)	racémico	80'1	2'414	0'195	95'0	2'643	0'179
	meso	74'6			92'2		
pH 4'5	racémico	92'6	2'847	0'167	99'6	1'529	0'284
	meso	95'7			94'8		
pH 4'5 (R)	racémico	93'9	44'263	0'003	95'4	0'000	0'996
	meso	89'1			92'1		



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	618323'5	$1'50 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'3	511473'5	$1'28 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1129797</b>	<b><math>2'78 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	2'9	1187021	--
4	--	4'0	106632	--

Fig.IV.53. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B' recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	7'4	306917	$2'59 \cdot 10^{-5}$
2	meso	8'2	296314	$2'45 \cdot 10^{-5}$
	<b>Total</b>	--	<b>603231</b>	<b><math>5'04 \cdot 10^{-5}</math></b>
3	--	3'1	375004	--
4	--	3'6	218647	--
5	--	3'9	68358	--

Fig.IV.54. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva C' recompuesta a pH 6'0. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso

**Tabla.IV.32. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHA comercial en las distintas disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos Porcentaje de Fe quelado**

		% FeQ	F	Sig
pH 6'0	D.N. B'	94'0	0'358	0'582
	D.N. C'	95'7		
pH 6'0 (R)	D.N. B'	77'5	67'921	0'001
	D.N. C'	93'8		
pH 4'5	D.N. B'	94'1	1'347	0'310
	D.N. C'	97'2		
pH 4'5 (R)	D.N. B'	91'5	1'255	0'325
	D.N. C'	93'7		

A diferencia del comportamiento observado para el FeEDDHA estándar, la recomposición del quelato comercial en la disolución de mayor concentración preparada con nitratos y sulfatos ( $2'78 \cdot 10^{-4}$  M), es superior a la obtenida con cloruros ( $2'42 \cdot 10^{-4}$  M) (Tabla.IV.29). Por el contrario, en la disolución más diluida la estabilidad del quelato es completa, independientemente del anión que esté presente en el medio (Tabla.IV.29).

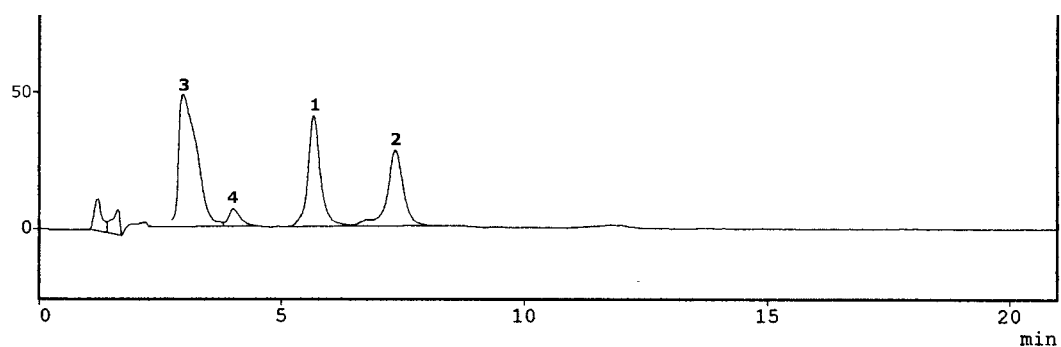
**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 4'5 del quelato FeEDDHA comercial en disolución nutritiva.**

Del análisis del comportamiento del FeEDDHA comercial en las disoluciones recompuestas hasta pH 4'5 (Fig.IV.55 y IV.56), se deduce que el proceso de recomposición en presencia de iones competidores no parece afectar a la estabilidad de este quelato (Tabla.IV.27), ya que se ha recuperado el 91'5% para **B'** y el 93'7% para **C'**. Este comportamiento coincide con el observado en el Ensayo 2 (93'8% para la disolución **B** y 96'6% para la disolución **C**).

Por otro lado, la cantidad de FeEDDHA comercial recompuesto en las disoluciones **B'** y **C'** a pH 4'5 es superior a la obtenida cuando en estas mismas disoluciones está presente el quelato estándar (Tabla.IV.28). En

consecuencia, parece confirmarse que la estabilidad del quelato comercial en las disoluciones nutritivas en estudio, es mayor que la que presenta el FeEDDHA estándar quizás porque, como se ha mencionado anteriormente, el exceso de Fe no (o-EDDHA) y/o los agentes quelantes no (o-EDDHA) reduzcan la competencia entre los diferentes iones de la disolución y el quelato.

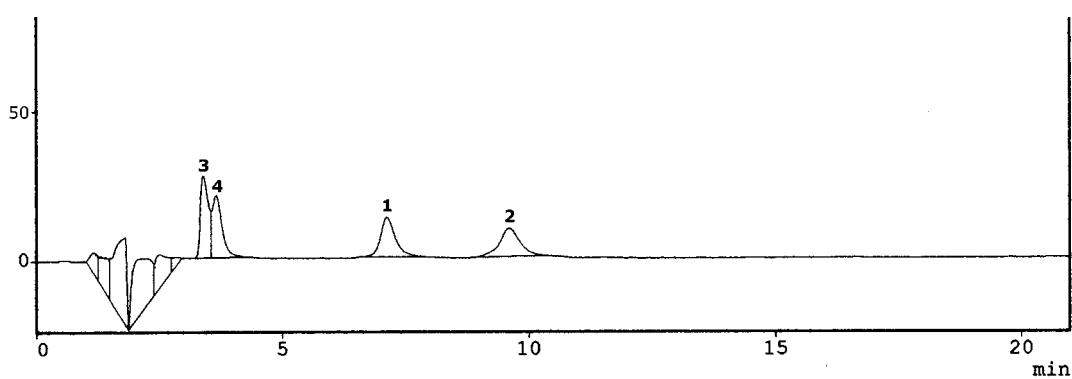
Cabe señalar que no se han encontrado diferencias significativas en la concentración de Fe (o-EDDHA) recuperada en las disoluciones nutritivas que contienen sulfatos y nitratos y la obtenida cuando en estas mismas disoluciones los cationes se han adicionado en forma de cloruros (Tabla.IV.29).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	5'6	704382	$1'74 \cdot 10^{-4}$
2	meso	7'3	622116	$1'54 \cdot 10^{-4}$
	<b>Total</b>	--	<b>1326498</b>	<b><math>3'28 \cdot 10^{-4}</math></b>
3	--	2'9	1213708	--
4	--	4'0	104765	--

**Fig.IV.55. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B' recompuesta a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso**

Tal y como ocurría para el FeEDDHA estándar, la estabilidad del quelato comercial en la disolución **B'** a pH 4,5 ( $3'28 \cdot 10^{-4}$  M) es superior a la obtenida a pH 6'0 ( $2'78 \cdot 10^{-4}$  M) (Tabla.IV.30). Por el contrario en la disolución más diluida (**C'**) no se observan diferencias significativas entre los dos valores de pH en estudio ( $5'04 \cdot 10^{-5}$  M a pH 6'0 y  $5'05 \cdot 10^{-5}$  M a pH 4'5).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. (M)
1	d,l-racémico	7'1	308579	$2'51 \cdot 10^{-5}$
2	meso	9'6	295712	$2'54 \cdot 10^{-5}$
	<b>Total</b>	--	<b>604291</b>	<b><math>5'05 \cdot 10^{-5}</math></b>
3	--	3'3	335425	--
4	--	3'6	295933	--

**Fig.IV.56. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva C' recompuesta a pH 4'5. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso**



## **Conclusiones**

A partir de los resultados expuestos se llega a las siguientes conclusiones:

- En las disoluciones nutritivas que no han sufrido variaciones de pH la estabilidad del quelato es completa tanto a pH 6'0 como a 4'5, independientemente del anión que esté presente en la disolución. Comportamiento que coincide con el del FeEDDHA estándar.
- Cuando las disoluciones se someten a un proceso de recomposición del quelato hasta pH 6'0, las pérdidas de Fe (o-EDDHA) aumentan a medida que lo hace la concentración de la disolución nutritiva. Sin embargo, cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 4'5, el quelato es totalmente estable en las dos disoluciones en estudio.
- Los porcentajes de quelato recompuesto en las disoluciones en las que está presente el FeEDDHA comercial son superiores a los obtenidos para el FeEDDHA estándar. En consecuencia, el exceso de Fe no (o-EDDHA) y/o la reacción de los agentes quelantes no (o-EDDHA) que contiene el producto comercial, con los componentes de la disolución, podría reducir el efecto que los iones competidores ejercen sobre el quelato.
- En general, el comportamiento del quelato FeEDDHA comercial en la disoluciones preparadas con nitratos y sulfatos es muy parecido al observado cuando en la disoluciones nutritivas los cationes se adicionan en forma de iones cloruro.
- En las disoluciones en las que se ha producido la descomposición del quelato, las pérdidas son debidas principalmente a la reducción del contenido de isómero meso.

**IV.4.2.3. Comportamiento del FeEDDHMA comercial en disolución nutritiva.**

**Disoluciones a pH 6'0 y 4'5**

El comportamiento del FeEDDHMA comercial cuando está presente en las disoluciones nutritivas **B'** (Fig.IV.57 y IV.58) y **C'** (no se incluyen figuras) sin sufrir variaciones de pH, coincide con el observado para los quelatos FeEDDHA (Tabla.IV.33), ya que, independientemente de la concentración y del valor de pH que alcance la disolución, las pérdidas de FeEDDHMA son inferiores al 10% en todos los casos (Tabla.IV.34 y IV.35).

**Tabla.IV.33 . Comparación de la estabilidad de los quelatos FeEDDHMA comercial, FeEDDHA estándar y FeEDDHA comercial a los diferentes valores de pH en las distintas disoluciones problema. Datos de porcentaje de Fe quelado.** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento, según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamiento	D.N. B				D.N. C			
	pH 6'0	pH 6'0 (R)	pH4'5	pH4'5 (R)	pH 6'0	pH 6'0 (R)	pH4'5	pH4'5 (R)
<b>FeEDDHA estándar</b>	92'3 a	50'3 b	94'1 a	74'0 b	97'9 a	66'1 b	95'0 a	68'6 c
<b>FeEDDHA comercial</b>	94'0 a	77'5 a	95'4 a	91'5 a	95'7 a	93'8 a	97'2 a	95'5 a
<b>FeEDDHMA comerc.</b>	96'4 a	51'7 b	94'8 a	72'6 b	104 a	50'7 c	91'9 a	84'3 b

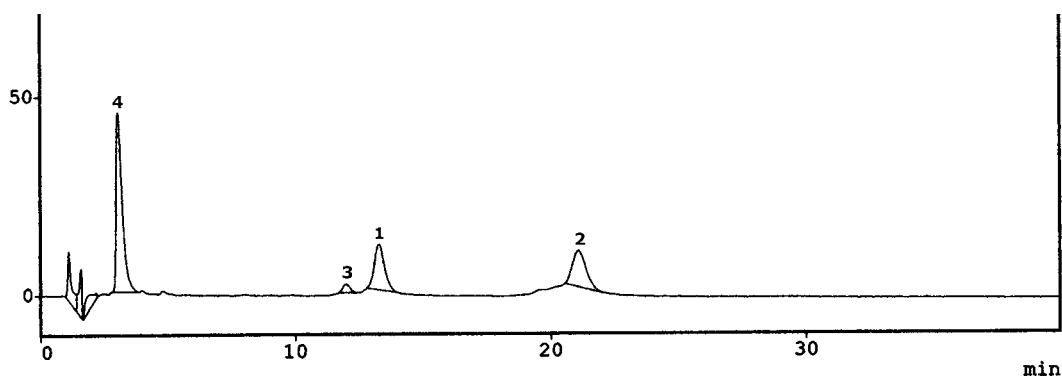
**Tabla.IV.34. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHMA comercial en las distintas disoluciones nutritivas a cada valor de pH. Datos Porcentaje de Fe quelado**

		% FeQ	F	Sig
pH 6'0	D.N. B'	96'4	7'352	0,055
	D.N. C'	104,1		
pH 6'0 (R)	D.N. B'	51'9	0'074	0'798
	D.N. C'	50'7		
pH 4'5	D.N. B'	94'8	0'566	0'494
	D.N. C'	91'9		
pH 4'5 (R)	D.N. B'	72'6	15'421	0'017
	D.N. C'	84'3		

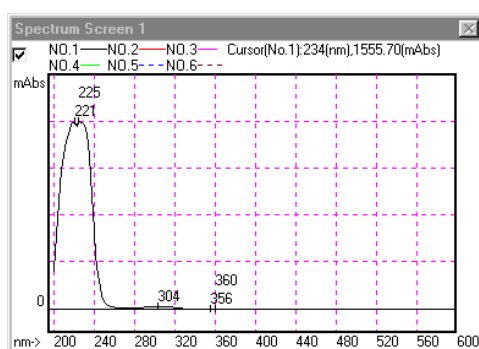
**Tabla.IV.35. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHMA comercial a los diferentes valores de pH. Datos de porcentaje de Fe quelado.** Las diferentes letras en las celdas de una mismas columna indican diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento según el test de Duncan y el de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Tratamientos	D.N. B'	D.N. C'
pH 6'0	96'4 a	104'1 a
pH 6'0 recompuesto	51'9 c	50'7 c
pH 4'5	94'8 a	91'9 ab
pH 4'5 recompuesto	72'6 b	84'3 b

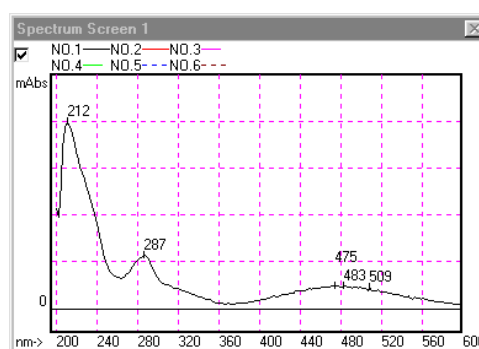
En los cromatogramas de HPLC de las disoluciones **B'** (Fig.IV.57 y IV.58) y **C'** (no se incluyen figuras) a los dos valores de pH en estudio, aparece un pico en torno a 3 min (pico 4), cuya área es muy superior a la de los isómeros meso y d,l-racémico (picos 1 y 2). Tras realizar un espectro UV-Vis se dedujo que este pico era debido a la formación del complejo sulfato y/o nitrato que también se había encontrado en los cromatogramas de los quelatos FeEDDHA. Es de destacar que el área del pico 4 es del mismo orden que la que presenta en los cromatogramas de HPLC de las disoluciones nutritivas preparadas con FeEDDHA estándar (Fig.IV.45)



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	13'2	295788
2	d,l-racémico	21'1	329950'3
	<b>Total</b>	--	<b>625738'3</b>
3	--	12'0	37565
4	--	3'0	745822



Pico 4



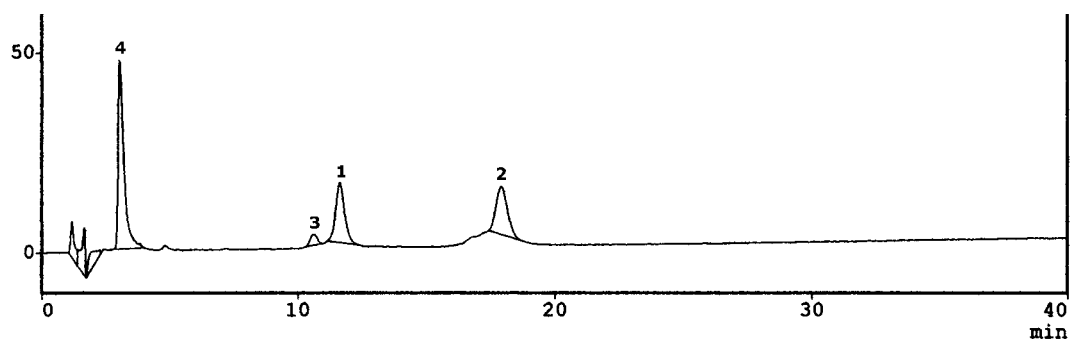
Pico 3

**Fig.IV.57. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva B' a pH 6'0. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**

En relación al pico correspondiente al FeEDDH4,6MA que contiene quelato comercial (pico 3), destacar que la presencia de los iones competidores ha dado lugar a que su área se reduzca en torno al 50% con respecto a la de los patrones.

Por otro lado, no se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de FeEDDHMA que permanecen en las disoluciones preparadas

con nitratos y sulfatos y los obtenidos en presencia de cloruros (Tabla.IV.36).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	11'6	344140
2	d,l-racémico	17'9	360737'8
	<b>Total</b>	--	<b>750628'8</b>
3	--	10'6	45743
4	--	3,0	748902

Fig.IV.58. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B' a pH 4'5. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.

Tabla.IV.36. Comparación de la estabilidad del quelato FeEDDHMA comercial en las disoluciones nutritivas con nitratos y sulfatos y las disoluciones nutritivas con cloruros a cada valor de pH .Datos porcentaje de Fe quelado.

% de Fe quelado		D.N. B			D.N. C		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	Cloruros	89'9	7'413	0'054	113'9	5'210	0'085
	Sulfatos	96'4			104'1		
pH 6'0 (R)	Cloruros	50'2	2'339	0'201	62'6	7'348	0'053
	Sulfatos	51'9			50'7		
pH 4'5	Cloruros	89'5	1'542	0'282	95'0	0'673	0'458
	Sulfatos	94'8			91'9		
pH 4'5 (R)	Cloruros	66'4	5'661	0'076	76'3	2'955	0'161
	Sulfatos	72'6			84'3		

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 6'0 del quelato FeEDDHMA comercial en disolución nutritiva.**

Cuando el quelato FeEDDHMA está presente en las disoluciones **B'** (Fig.IV.59) y **C'** (no se incluye figura) y se someten a recomposición hasta pH 6'0, se obtienen unos cromatogramas de HPLC en los que los picos de los isómeros meso y d,l-racémico han reducido su área en torno al 50% (picos 1 y 2).

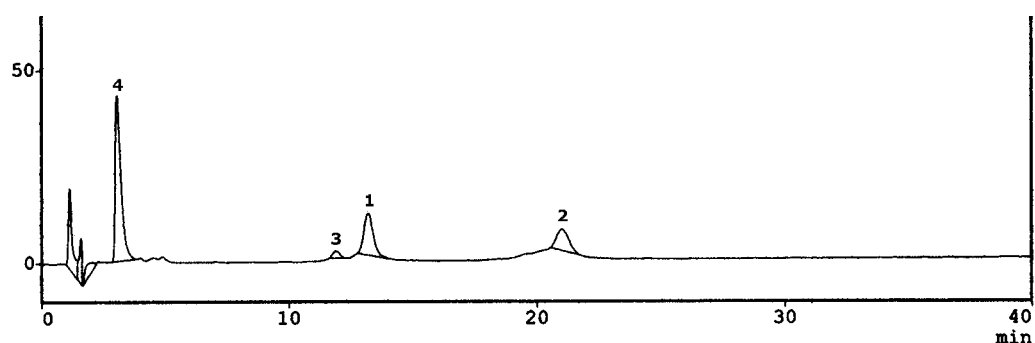
En la disolución **B'**, aunque el proceso de recomposición ha afectado a la estabilidad de los dos isómeros, las pérdidas de quelato se producen en mayor medida por la descomposición del d,l-racémico (Tabla.IV.37). Por el contrario, en la disolución más diluida, no se observan diferencias significativas en las pérdidas que sufren ambos isómeros, de forma que se ha recuperado un 48'8% del d,l-racémico y un 52'5% del meso. (Tabla.IV.37).

**Tabla.IV.37. Comparación de la estabilidad de los isómeros que componen el quelato FeEDDHMA comercial en las disoluciones nutritivas a cada valor de pH**  
**Datos porcentaje de Fe quelado.**

	Isómeros	D.N. B'			D.N. C'		
		% FeQ	F	Sig	% FeQ	F	Sig
pH 6'0	racémico	96'6	0'253	0'641	102'0	0'774	0'429
	meso	96'1			106'2		
pH 6'0 (R)	racémico	29'9	1315'8	0'000	48'8	0'308	0'608
	meso	76'4			52'5		
pH 4'5	racémico	94'3	0'081	0'789	76'2	11'943	0'026
	meso	95'3			103'5		
pH 4'5 (R)	racémico	58'2	61'837	0'001	67'3	116'627	0'000
	meso	87'6			96'8		

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla.IV.34, no se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de quelato recuperados en las disoluciones nutritivas **B'** y **C'** recompuestas hasta pH 6'0 (51'9% y 50'7% respectivamente). En consecuencia, la estabilidad del FeEDDHMA comercial en estas disoluciones nutritivas, no depende de la concentración a la que se preparen las mismas.

Tras comparar los porcentajes de recomposición obtenidos en este ensayo con los del Ensayo 2 se observa que para las dos disoluciones en estudio, el efecto que producen los aniones nitrato y sulfato sobre la estabilidad del FeEDDHMA es similar al de los iones cloruro (Tabla.IV.36).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	13'2	220745
2	d,l-racémico	21'0	249438
	<b>Total</b>	--	<b>470183</b>
3	--	11'9	28639
4	--	3'0	693709

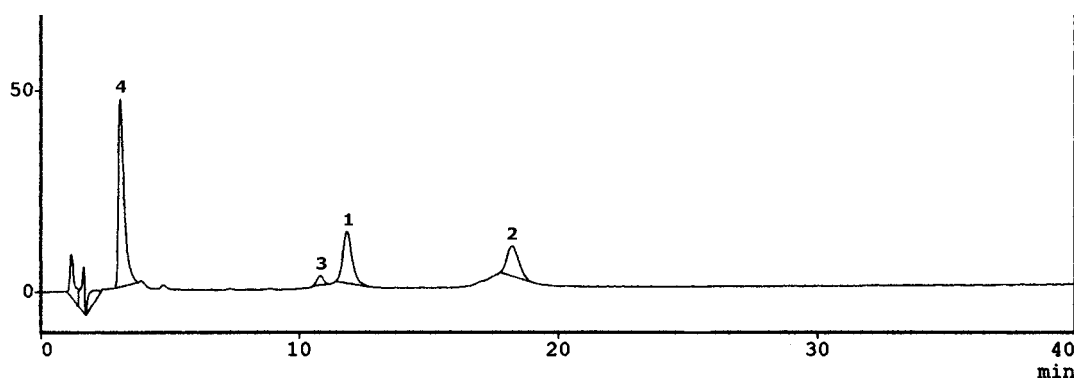
**Fig.IV.59. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B' recompuesta pH 6'0. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**

Cabe señalar que los porcentajes de FeEDDHMA recuperados en la disolución nutritiva **B'** recompuesta a pH 6'0 (51'7 %) son del mismo orden de los encontrados para el FeEDDHA estándar (50'3%) (Tabla.IV.33) y que

en ambos casos, la estabilidad de los quelatos es inferior a la del FeEDDHA comercial (Tabla.IV.33).

**Proceso de descomposición-recomposición de pH 1'0 hasta pH 4'5 del quelato FeEDDHMA comercial en disolución nutritiva.**

Del análisis del comportamiento del FeEDDHMA en las disoluciones nutritivas **B'** (Fig.IV.60) y **C'** (no se incluye figura) recompuestas hasta pH 4'5, se deduce que el proceso de recomposición ha producido unas pérdidas de FeEDDHMA del 27'4% para **B** y del 15'7% para **C**. En ambos casos la reducción es básicamente debida a la descomposición del isómero de menor estabilidad (d,l-racémico) (Tabla.IV.37).



Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área
1	meso	11'8	309739'5
2	d,l-racémico	18'2	213498'3
	<b>Total</b>	--	<b>523237'8</b>
3	--	10'8	42160'5
4	--	3'0	713150

**Fig.IV.60. Cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva B' recompuesta pH 4'5. Pico 1: isómero meso; Pico 2: isómero d,l-racémico.**



De acuerdo con los datos recogidos en la Tabla.IV.34, el contenido de FeEDDHMA recompuesto aumenta a medida que disminuye la concentración de la disolución nutritiva, a pesar de que los valores de NQ y pH se han mantenido constantes. Este comportamiento difiere del observado en las disoluciones recompuestas hasta pH 6'0, donde no existen diferencias entre la disolución **B'** y la **C'** (Tabla.IV.34).

Con respecto a la estabilidad que el quelato FeEDDHMA comercial presenta en las disoluciones que se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición hasta los dos valores de pH en estudio, el porcentaje de FeEDDHMA recuperado a pH 4'5 es superior al obtenido a pH 6'0 (Tabla.IV.35), confirmando la tendencia general observada en los ensayos anteriores.

Por otro lado, no se observan diferencias significativas en el comportamiento del FeEDDHMA comercial frente a nitratos y sulfatos y el mostrado en presencia de cloruros (Tabla.IV.36)

Es de destacar que tal y como ocurría a pH 6'0, las pérdidas de FeEDDHMA en las disoluciones nutritivas recompuestas a pH 4'5 son superiores a las encontradas para el FeEDDHA comercial (Tabla.IV.33). Sin embargo, mientras que en la disolución de mayor concentración el porcentaje de recomposición es del orden del obtenido para el FeEDDHA estándar, en la más diluida la estabilidad del FeEDDHMA aumenta con respecto a la del quelato estándar (Tabla.IV.33).

### **Conclusiones**

En base a los resultados mostrados se llega a las siguientes conclusiones:

- La estabilidad del quelato FeEDDHMA en las disoluciones nutritivas que no se han sometido a variaciones de pH, es elevada, siendo mínima la descomposición que sufre dicho quelato independientemente de la concentración y del valor de pH que alcance la disolución.
- Cuando las disoluciones nutritivas se someten a un proceso de descomposición-recomposición del FeEDDHMA hasta pH 6'0, no se observan diferencias significativas en los porcentajes de Fe quelado recuperados para las dos disoluciones en estudio. Sin embargo, cuando la recomposición tiene lugar hasta pH 4'5 las pérdidas de quelato aumentan a medida que lo hace la concentración de la disolución nutritiva.
- En los procesos de recomposición, el isómero que sufre mayores pérdidas es el menos estable, es decir, el d,l-racémico.
- Tanto en las disoluciones nutritivas que se han sometido a un proceso de descomposición-recomposición del quelato como en aquellas que no han sufrido variaciones de pH, la estabilidad del FeEDDHMA comercial frente a los aniones nitrato y sulfato es igual a la encontrada para los iones cloruro

