

**Università degli Studi di Salerno
Facoltà di Ingegneria**

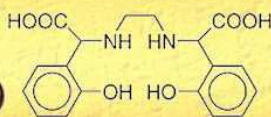


**Studio ed ottimizzazione
di un processo di
produzione di chelati per
l'agricoltura**

Marco Gigantino

pH

Cu^{2+}



Fe^{3+}

NO_3^-

$\text{Fe}(\text{OH})_3$

$\text{2,2'-EDDHA/Fe}^{3+}$

Zn^{2+}



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Studio ed ottimizzazione di un processo di produzione di chelati per l'agricoltura

Tesi in
Reattori Chimici

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Sara Cascone

Candidato:

Marco Gigantino

matricola 0610200295

Anno Accademico 2011/2012

Ai miei cari

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 27.04.2012
Fisciano, 16-04-2012

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	VII
Introduzione.....	1
1.1 Il ferro nell'agronomia	2
1.1.1 Clorosi ferrica	6
1.2 Uso dei chelanti nell'agricoltura.....	10
1.3 Stato dell'arte	18
1.3.1 Processi di sintesi	20
1.3.2 Problematiche analitiche	24
1.4 Obiettivi	26
Materiali e metodi	29
2.1 Materiali	30
2.1.1 Reagenti e solventi delle sintesi	30
2.1.2 Prodotti della sintesi: EDDHA	32
2.2 Apparecchiature	34
2.2.1 Spettrofotometro	34
2.2.2 HPLC	36
2.3 Metodi.....	38
2.3.1 Procedura di sintesi	38
2.3.2 Analisi spettrofotometrica	42

2.3.3 Analisi cromatografica	46
------------------------------	----

Risultati e discussione 51

3.1 Ottimizzazione della fase di estrazione	52
---	----

3.2 Riduzione dell'acqua di processo	56
--------------------------------------	----

3.3 Ottimizzazione del rapporto di alimentazione	61
--	----

Conclusioni e prospettive 69

4.1 Conclusioni e sviluppi futuri	70
-----------------------------------	----

Bibliografia 73

Indice delle figure

Figura 1. Percentuale di clorofilla prodotta al variare del ferro [ppm] solubile in acido cloridrico 1.0 N, in: ○, cloroplasti; ●, tessuto dell'intera foglia [1].	2
Figura 2. Disponibilità degli ioni Fe (II) e Fe (III) in base al pH del terreno [4]......	4
Figura 3. Tipici sintomi progressivi di carenza di ferro nel fagiolo comune (<i>Phaseolus vulgaris</i>) [2]......	6
Figura 4. Disponibilità relativa di ferro in base al pH ed alla presenza di fosfati nel terreno dopo 1, 2 e 24 ore dall'applicazione di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02% in soluzione) [4]......	10
Figura 5. Sequenza di chelazione di uno ione metallico.....	11
Figura 6. Meccanismo di acquisizione del ferro.....	11
Figura 7. Stabilità di alcuni chelati di ferro al variare del pH del suolo. Per 100 μM di chelato e per un massimo di 10 μM di Cu^{2+} in soluzione [19].	13
Figura 8. Ferro-chelanti "deboli". EDTA, acido etilen-diammino-tetracetico; HEDTA, acido 2-idrossietilen-diammino-tetracetico; DTPA, acido dietilen-triammino-pentacetico; EDDSA, acido etilen-diammino-disuccinico; IDSA, acido immينو-disuccinico. * Carbonio chirale [16].	14
Figura 9. Area totale della foglia (A), peso fogliare secco (B), lunghezza dello stelo (C), contenuto in ferro totale della foglia (D), contenuto in ferro attivo (E) e contenuto totale di clorofilla della foglia (F) della <i>Vitis labruscana</i> in relazione alla quantità di FeEDDHA applicato al terreno. Ogni punto è la media di cinque repliche [22]......	15
Figura 10. Agenti chelanti derivati dell'EDDHA presenti in commercio. <i>o,o</i> -EDDHA/ Fe^{3+} , acido etilendiammino-di(orto-idrossifenilacetico); <i>o,p</i> -EDDHA/ Fe^{3+} , acido etilendiammino-N(orto-idrossidifenilacetico)-N'(para-idrossidifenilacetico); EDDHMA, acido etilendiammino-di(orto-idrossifenilmetilacetico); EDDHSA, acido etilendiammino-di(2-idrossi-5-solfonatofenilacetico); EDDCHA, acido etilendiammino-di(5-carbossi-2-idrossifenilacetico). * Carbonio chirale [16].	16
Figura 11. Stabilità del FeEDDHA ed analoghi (con gruppi funzionali e posizioni di sostituzione diverse) al variare del pH del suolo. Per 100 μM di chelato e per un massimo di 10 μM di Cu^{2+} in soluzione [16].	17

Figura 12. Isomeri posizionali (orto e para) e geometrici (racemico e meso) dell' o,o -EDDHA/ Fe^{3+} e dell' o,o -EDDH4MA/ Fe^{3+} . Per 100 μM di chelato e per un massimo di 10 μM di Cu^{2+} in soluzione [19].	18
Figura 13. Formula di struttura dei tre isomeri posizionali dell'EDDHA [29].	20
Figura 14. Quantità di Fe^{3+} prelevato dai chelati di ferro e ridotto a Fe^{2+} per diversi tipi di ferro-chelato nelle radici di zucchini (<i>Cucumis sativus</i> L.) in condizioni di stress da carenza di ferro [31].	21
Figura 15. Reazione di Strecker nel processo di sintesi dell'EDDHA da Kroll et al. del 1957 [25,32].	22
Figura 16. Reazione di tipo Mannich nel processo di sintesi dell'EDDHA di Dexter del 1958 [25].	22
Figura 17. Cromatogramma di un tipico prodotto commerciale di Fe-EDDHA. Picco 1, racemico- o,o -EDDHA/ Fe^{3+} ; Picco 2, meso- o,o -EDDHA/ Fe^{3+} ; Picco 3, o,p -EDDHA/ Fe^{3+} ; Picco 4, p,p -EDDHA/ Fe^{3+} . X= tempo [min] [42].	26
Figura 18. Formula di struttura dell'etilendiammina.	30
Figura 19. Formula di struttura del fenolo.	31
Figura 20. Formula di struttura dell'acido gliossilico.	31
Figura 21. Formula di struttura del toluene.	32
Figura 23. Rappresentazione dello ione ferrico avvolto dall' o,o -EDDHA.	33
Figura 24. Confronto tra gli isomeri $[o,o]$ ed $[o,p]$ dell'EDDHA.	34
Figura 25. Principio di funzionamento dello spettrofotometro.	35
Figura 26. Schema di funzionamento dell'HPLC [44].	37
Figura 27. Fase di reazione dell'EDDHA sodico. [37].	40
Figura 28. Fase di chelazione dell'EDDHA ferro-sodico. [37]	41
Figura 29. Spettro dell' o,o -EDDHA puro a 12.18 mg/L.	43
Figura 30. Spettro dell' o,o -EDDHA puro a diverse concentrazioni in seguito alla sottrazione della linea di base a 1100 nm.	44
Figura 31. Retta di taratura dello strumento a 280 e 480 nm.	45
Figura 32. Tracciati cromatografici ottenuti dall'analisi dello <i>standard</i> a diverse diluizioni.	47
Figura 33. Rette di taratura del metodo analitico all'HPLC.	48
Figura 34. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 1.	54
Figura 35. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 2.	56
Figura 36. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 3.	58
Figura 37. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 4.	59
Figura 38. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 5.	61

Figura 39. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 6.....	63
Figura 40. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 7.....	64
Figura 41. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 8.....	66
Figura 42. Cromatogramma a 280 nm del prodotto della sintesi 9.....	67

Indice delle tabelle

Tabella 1. Effetto della clorosi ferrica sulla crescita e sulla produttività delle arachidi [2].	7
Tabella 2. Effetti dei differenti stadi di carenza di ferro nella vite (<i>Vitis vinifera</i> L.) sui pigmenti fotosintetici, trasporto di elettroni, attività dei fotosistemi, attività del rubisco e del contenuto di proteine per unità di peso di uva fresca [2].....	8
Tabella 3. Alcuni fertilizzanti di ferro inorganici ed organici con rispettivo tenore di ferro [2].	9
Tabella 4. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 1.	54
Tabella 5. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 2.	55
Tabella 6. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 3.	57
Tabella 7. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 4.	59
Tabella 8. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 5.	60
Tabella 9. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 6.	62
Tabella 10. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 7.	64
Tabella 11. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 8.	65
Tabella 12. Quantità di sostanze adoperate nelle varie fasi della sintesi 9.	67

Bibliografia

1. Jacobson L., Iron in the leaves and chloroplasts of some plants in relation to their chlorophyll content, *Plant Physiology*, **20** (2) 233-245 (1945).
2. Prasad P.V.V., Plant Nutrition: Iron Chlorosis, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 649-656 Elsevier Ltd. (London) (2003).
3. Romheld V., Different strategies for iron acquisition in higher plants, *Physiologia Plantarum*, **70** 231-234 (1987).
4. www.adob.com.pl/images/Files/ADOB%20chelates%20in%20general.pdf
5. Brown J.C., Iron Chlorosis in Plants, *Advances in agronomy*, A.G. Norman, Academic Press Inc. Ltd. (London) 329-368 (1961).
6. Riviero R. M. et al., Influence of temperature on biomass, iron metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants, *Journal of Plant Physiology*, **160** (9) 1065-71 (2003).
7. Sanz M. et al., Diagnóstico visual de la clorosis férrica, *Información técnica Económica Agrária*, **93** 7-22 (1997)
8. Lindsay W.L. et al, Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper, *Soil Science Society of America Journal*, **42** (3) 421-428 (1977).
9. Katyal, J.C. et al., A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis, *Plant & Soil*, **55** 105-119 (1980).
10. Oserkowsky J., Quantitative relation between chlorophyll and iron in green and chlorotic pear leaves, *Plant Physiology*, **8** 449-468 (1933).
11. Gris E., Nouvelles experiences sur l'action des composés ferrugineux solubles, appliqués à la végétation, et spécialement au traitement de la chlorose et de la débilité des plantes, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, **19** 1118-19 (1844).
12. Fernandez V. et al., Foliar Iron Fertilization: A Critical Review, *Journal of Plant Nutrition*, **28** 2113-2124 (2005).
13. Niebur W.S. et al., Agronomic Evaluation of Soybean Genotypes Resistant to Iron Deficiency Chlorosis, *Crop Science*, **21** 551-554 (1980).

14. Broschat T. K., Effectiveness of Various Iron Sources for Correcting Iron Chlorosis in Dwarf Ixora, *HortTechnology*, **13** (4) 625-627 (2003).
 15. Broschat T. K., Effects of Iron Source on Iron Chlorosis and Exserohilum Leaf Spot Severity in Wodyetia bifurcata, *HortScience*, **40** (1) 218-220 (2005).
 16. Lucena J.J., Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants, in *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*, L.L. Barton et al., Springer 103-128 (2007)
 17. Chaney R. L. et al., Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans, *Plant Physiology*, **50** 208-213 (1972).
 18. Lucena J.J et al., Synthetic iron chelates as substrates of root ferric chelate reductase in green stressed cucumber plants, *Journal of Plant Nutrition*, **29** 423-439 (2006)
 19. García-Marco S., Contribuciones científicas al marco legal de fertilizantes de quelatos férricos: análisis cromatográfico; eficacia agronómica de o,p-EDDHA/Fe³⁺, *Sección de Química Agrícola Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid* (2005).
 20. Aboulroos S.A. et al., Reactions of the iron chelates and the sodium salts of EDTA, DTPA and EDDHA with two alkaline soils, and their effectiveness during growth of barley, *Agro-Ecosystem*, **8** (3-4) 203-214 (1983).
 21. Wiersma J.V., High rates of Fe-EDDHA and seed iron concentration suggest partial solutions to iron deficiency in soybean, *Agronomy Journal*, **97** (3) 924-934 (2004).
 22. Smith B.R. et al., Fe-EDDHA alleviates chlorosis in 'concord' grapevines grown at high pH, *HortScience*, **41** (6) 1498-1501 (2006).
 23. Zaiter H.Z. et al., Leaf chlorosis and seed yield of dry beans grown on high-pH calcareous soil following foliar iron sprays, *HortScience*, **27** (9) 983-985 (1992).
 24. Álvarez-Fernández A. et al., Evaluation of synthetic iron(III)-chelates. (EDDHA/Fe³⁺, EDDHMA/Fe³⁺ and the novel EDDHSA/Fe³⁺) to correct iron chlorosis, *European Journal of Agronomy*, **22** 119-130 (2005).
 25. Yunta F. et al., Chelating agents related to ethylenediamine bis(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA): synthesis, characterization, and equilibrium studies of the free ligands and their Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, and Fe³⁺ chelates, *Inorganic Chemistry*, **42** 5412-5421 (2003).
 26. Regolamento UE n. 137/2011 della commissione del 16 febbraio 2011, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 43/1 (17.2.2011).
 27. Hernández-Apaolaza L. et al., Chromatographic determination of commercial Fe(III) chelates of ethylenediaminetetraacetic acid, ethylene diaminedi(o-hydroxyphenylacetic) acid and ethylenediaminedi(o-hydroxy-p-methylphenylacetic)acid, *Journal of Chromatography*, **789** 453-460 (1997).
-

28. Cremonini A. et al., Nuclear magnetic resonance analysis of the iron ligand ethylenediaminedi(o-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA) employed in fertilizers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** 3527-3532 (2001).
 29. Gómez-Gallego M. et al., Synthesis of o,p-EDDHA and its detection as the main impurity in o,o-EDDHA commercial iron chelates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** 6395-6399 (2002).
 30. Hernández-Apaolaza L. et al, Structure and fertilizer properties of byproducts formed in the synthesis of EDDHA, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** 4355-4363 (2006).
 31. García-Marco S. et al., Effectiveness of ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N(p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) to supply iron to plants, *Plant & Soil*, **279** 31-40 (2006).
 32. Kroll H. et al., A phenolic analogue of ethylenediaminetetraacetic acid, *Journal of the American Chemical Society*, **79** 2024-2025 (1957).
 33. Strecker A., Ueber einen neuen aus Aldehyd- Ammoniak und Blausäure entstehenden Körper (p), *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **91** (3) 349–351 (1854).
 34. Dexter M., Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids, *U.S. Patent 2,824,128* (1958).
 35. Mannich C. et al., Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin, *Archiv der Pharmazie*, **250** 647–667 (1912).
 36. Kornblum et al., Solvation as a Factor in the Alkylation of Ambident Anions: The Importance of the Hydrogen Bonding Capacity of the Solvent, *Journal of the American Chemical Society*, **85** (8) 1141–1147 (1963).
 37. Petree H.E. et al., Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids, *U.S. Patent 4,130,582* (1978).
 38. Julien J.A.L. et al., Nouveau procede de preparation de l'acide ethylenediamine N,N'-bis(o-hydroxyphénylacétique) et de derives de celui-ci, *European Patent 0,331,556 A2* (1989).
 39. Hoefnagel A.J. et al., Process for separating the ortho- and para- isomers of hydroxymandelic acid or a salt thereof, the isomers thus obtained, the use of the ortho-isomer for the preparation of EDDHA, *Patent WO9414746* (1994)
 40. Sierra M.A. et al., Nuevo procedimiento para la preparación de ácidos bis(2-hidroxiaril)aminoacéticos utilizando agentes de transferencia de cianuro, *Patent WO0200604 A1* (2002).
 41. McKenzie et al., Plant Nutrient Based on O, P-Ethylene (Bis) Hydroxyphenyl Glycines, *US 10/599,409* (2005)
-

42. Determination of chelating agents in fertilizers by chromatography Part 2: Determination of Fe chelated by o,o-EDDHA and o,o-EDDHMA by ion pair, *UNI EN 13368-2* (2007).
 43. García-Marco S. et al., Chromatographic determination of Fe chelated by ethylenediamine-N-(o-hydroxyphenylacetic)-N'-(p-hydroxyphenylacetic) acid in commercial EDDHA/Fe³⁺ fertilizers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** 1380-1386 (2006).
 44. www.unipa.it/~dctfpal/camardaanalisiIII/HPLC.doc
-

