

**ESTUDIO DE LA FRACCIÓN HÚMICA DE
DIFERENTES FERTILIZANTES HÚMICOS
COMERCIALES.**

**TRABAJO REALIZADO DURANTE EL XXXIX CURSO
INTERNACIONAL DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL**

M^ªTRINIDAD SÁNCHEZ VERDEJO
(Licenciada en Ciencias Químicas)

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA**

Julio de 2002

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. De Investigación Francisco Martín, por haber dirigido el presente trabajo y prestado su ayuda.

A Trinidad Verdejo, por su infinita paciencia y por sus buenos consejos.

Al Dr. Luis Clemente, coordinador del Curso Internacional de Edafología y Biología Vegetal, por facilitarme el acceso a este.

A Martín Romero, por su gran ayuda prestada por mis problemas con el ordenador.

A mis compañeros de desayuno, con los que he compartido momentos muy agradables.

INDICE

I.- Introducción.	3
II.- Objetivos.	7
III.- Materiales.	7
IV.- Metodología Analítica.	7
IV.1.- Relación H/C y O/C.	8
IV.2.- Relación E₄₆₅/E₆₆₅.	8
IV.3.- Infrarrojo.	8
IV.4.- Pirólisis.	9
IV.5.- Reacción con TMAH.	9
V.- Resultados y discusión.	10
V.1.- Composición elemental y razones H/C y O/C.	10
V.2.- Relación E₄₆₅/E₆₆₅.	14
V.3.- Infrarrojo.	16
V.4.- Pirólisis.	19
V.5.- Reacción con TMAH.	23
VI.- Conclusiones.	26
VII.- Bibliografía.	28

I.- Introducción

Durante las últimas décadas la presión económica así como la creciente demanda de alimentos, ha dado lugar a la explotación de cultivos intensivos a gran escala, utilizando cada vez mayores cantidades de fertilizantes químicos inorgánicos y contemplando solamente la nutrición de los cultivos a corto plazo, olvidando cada vez más, el factor “natural” de la fertilidad misma de los suelos.

La materia orgánica, junto con el aire, agua y minerales, es uno de los componentes básicos del suelo. Se define como el conjunto de componentes orgánicos, de origen animal o vegetal, que se encuentra en diferentes estados de descomposición o transformación.

La materia orgánica es una porción del suelo aún y cuando la mayoría de los cultivos contienen solamente de 1 a 5 % de materia orgánica (en su capa superficial), esa pequeña cantidad modifica las propiedades físicas del suelo y afecta fuertemente sus propiedades químicas y biológicas.

La materia orgánica es responsable de una adecuada estructura en el suelo, aumenta la porosidad, mejora las relaciones agua-aire y reduce la erosión ocasionada por el agua y el viento. Químicamente, la materia orgánica es una fuente natural de nitrógeno, de fósforo y de azufre.

En el suelo, la materia orgánica se transforma, descompone o degrada hasta mineralizarse debido a la acción de microorganismos. Todo este proceso natural da lugar a la humificación, proceso evolutivo mediante el cual a partir de la modificación de tejidos originales y de la síntesis de los organismos del suelo, se produce un conjunto de compuestos estables de color oscuro o negrozco, amorfos y coloidales, conocidos con el nombre de HUMUS. Los productos así formados tienden a asociarse en estructuras químicas complejas que son más estables que los materiales iniciales.

El humus está constituido por las huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Podríamos resumir diciendo que las sustancias húmicas constituyen grupos heterogéneos que no están definidos por una composición determinada (como sería lo ideal) sino que se establecen en base a su comportamiento frente a determinados reactivos (según sean solubles o precipiten). El humus al tratarlo con una serie de reactivos extractantes se separa en una serie de fracciones. A cada fracción extraída se le da un nombre. Mediante los reactivos alcalinos, se separan las huminas (que son

insolubles) de los ácidos fúlvicos y húmicos, que son solubles. Estos últimos se separan mediante tratamiento ácido, generalmente ClH; los ácidos fúlvicos son solubles en ClH mientras que los húmicos son insolubles (Schnitzer y Khan, 1972).

Las principales características de cada una de las fracciones son las siguientes:

Las huminas, son la fracción insoluble del humus tanto en ácidos como en álcalis y componen un porcentaje considerable del humus y su carga es positiva.

Los ácidos húmicos se presentan como sólidos amorfos de color marrón oscuro, generalmente insolubles en agua y en casi todos los disolventes no polares, pero fácilmente dispersables en las soluciones acuosas de los hidróxidos y sales básicas de los metales alcalinos, constituyendo un hidrosol que puede experimentar floculación mediante el tratamiento de los ácidos o los demás cationes. Son de carga negativa.

Los ácidos fúlvicos constituyen una serie de compuestos amorfos, de color amarillento y naturaleza coloidal, fácilmente dispersables en agua y no precipitables por los ácidos, susceptibles en cambio de experimentar floculación en determinadas condiciones de pH y concentración de las soluciones de cationes no alcalinos. Es el material sobrante en la solución una vez que se ha extraído el ácido húmico por acidificación. Tiene carga negativa.

Las sustancias húmicas tienen una serie de características comunes. Se trata de sustancias amorfas de colores oscuros, polímeros tridimensionales de elevado peso molecular, de carácter ácido, constituidos por unos grupos funcionales: núcleo (grupos aromáticos nitrogenados, como el indólico y el pirrólico, y grupos bencénicos aromáticos, como el naftaleno y el benceno), grupos reactivos (responsables de importantes propiedades de la materia orgánica: hidroxilo, carboxilo, amino, metoxilo...) y puentes de unión (nitrilo, amino, cetónicos...) y cadenas alifáticas.

El humus influye en la capacidad de un suelo para retener y poner a disposición de la planta tanto aniones como cationes. La capacidad de intercambio catiónico está dada por los ácidos fúlvicos y húmicos, afectando de manera positiva la disponibilidad de nitrógeno (en su forma amoniacal), potasio, calcio, magnesio, cobre, hierro, manganeso y zinc. La capacidad de intercambio aniónico esta dada por las huminas y tiene influencia sobre la disponibilidad de nitrógeno (en su forma nítrica), fósforo, azufre, boro, molibdeno y cloro.

La capacidad de intercambio catiónico de un suelo está determinada en primera instancia por la cantidad de arcillas y humus presentes. De esta manera un suelo de

textura arenosa y un bajo contenido de humus tendrá una baja capacidad de intercambio catiónico y por lo tanto una capacidad limitada para aportar nutrientes a la planta. Una gran parte de la capacidad de intercambio catiónico de un suelo en su horizonte superficial se debe al humus. Por esta razón existe una relación directa entre el contenido de humus en el suelo y la fertilidad del mismo.

El humus tiene una reconocida capacidad adherente, hecho que permite la formación de agregados en el suelo produciendo condiciones adecuadas para el desarrollo de la raíz y en general de la actividad orgánica, lo que es importante en suelos de textura arcillosa por aireación y drenaje y en los arenosos donde la agregación evita en buena medida la lixiviación de arcillas hacia horizontes más profundos donde pudieran encontrarse menores cantidades de raíces absorbentes.

El humus tiene la propiedad de incrementar la capacidad de retención de humedad del suelo. En términos generales se estima que el humus puede retener agua en una proporción de veinte veces su peso.

Todos los organismos heterótrofos requieren materia orgánica como fuente de carbono, siendo del humus la forma en la que más fácilmente lo toman. De esta manera el humus promueve la actividad microbiana responsable de los procesos de mineralización de la materia orgánica, amonificación, nitrificación, fijación de nitrógeno, etc.

Existen varias formas de regenerar los materiales húmicos en el suelo, la incorporación de estiércol, desechos de cosechas y abonos verdes son las más utilizadas, sin embargo, el problema que se presenta es que los residuos orgánicos incorporados a una profundidad de 15 cms. o menos se degradan fácilmente. A esta profundidad las bacterias y los hongos son muy activos y rápidamente descomponen los residuos orgánicos, es decir, los oxidan y dejan muy poco o nada para llegar a convertirse en humus.

Ante esta situación y reconociendo el impacto dramático que los materiales húmicos tienen sobre la productividad del suelo, la agricultura moderna contempla la necesidad de aplicar directamente al suelo, extractos húmicos concentrados.

Los fertilizantes húmicos aportan ácidos húmicos al sistema suelo-planta, dando lugar a beneficios sobre la fertilidad; al igual que los que producen los ácidos húmicos del humus natural del suelo. Las sustancias húmicas son muy difíciles de extraer y aislar de

los suelos y sedimentos; en cambio, se aíslan en grandes cantidades de los fertilizantes húmicos.

Existe una falta de información sobre la mayoría de los fertilizantes húmicos en lo que respecta a su origen, métodos de aislamiento y otros pretratamientos; así como las diferencias químicas que existen entre los materiales húmicos naturales y comerciales. En el medio agrario suponen que los ácidos húmicos contenidos en estos fertilizantes son similares a los del suelo, esperando por ello la misma respuesta de estos. Son comercializados en forma de suspensión, y algunos de ellos tienen además adición de nutrientes minerales. En España son muy usados en la obtención de productos de primor/precoces, y en cultivos extensivos, sobre todo frutales, mediante fertirrigación.

Existen evidencias de la diferencia química existente entre los materiales húmicos naturales y comerciales, y por ello es necesario valorar la calidad potencial de los productos comerciales mediante una serie de parámetros.

Se van a estudiar las fracciones húmicas de diferentes fertilizantes comerciales. Para ello se van a analizar sus características físico-químicas y estructurales mediante diversas técnicas; las cuales van a ser degradativas y no destructivas.

II. Objetivos.

En este trabajo se ha realizado un estudio de la fracción húmica de varias muestras líquidas de fertilizantes húmicos comerciales. A partir de muestras sólidas aisladas, se han llevado a cabo diferentes determinaciones y transformaciones químicas, analizándose así tanto sus características fisicoquímicas como estructurales, empleando para ello análisis destructivos y no destructivos. Los primeros nos van a ayudar a conocer, a partir de los productos de degradación obtenidos, la estructura de los materiales iniciales. Los segundos nos van a permitir conocer la composición de las muestras y la distribución de los grupos funcionales.

III. Materiales.

Se han seleccionado una serie de fertilizantes húmicos líquidos; de los que se han obtenido mediante precipitación por adición de HCl las correspondientes fracciones de ácidos húmicos. Se van a codificar de la siguiente manera:

H, HC, A, S, M, N, SP, V, F, C y HS. V es una muestra natural de suelo.

Estas fracciones se extraen con diclorometano. Esto se hace para eliminar la mayor cantidad posible de impurezas que puedan contener, las cuales podrían interferir posteriormente en los análisis. Durante este estudio se trabaja con las muestras purificadas.

IV. Metodología analítica.

Sobre las muestras de ácidos húmicos se llevan a cabo los siguientes análisis:

- Relaciones H/C y O/C.
- Relación E₄₆₅/E₆₆₅.
- Infrarrojo.
- Pirólisis.
- Reacción con TMAH.

IV.1- Relación H/C y O/C.

La composición elemental es una propiedad química importante que puede ser usada para establecer la naturaleza y origen de las sustancias húmicas. Cuando los datos de la composición vienen dados como las razones atómicas H/C y O/C, se hacen visibles algunas características generales. Se realiza un análisis elemental de las muestras y se determinan los cocientes H/C y O/C.

$$H/C = \frac{\%H \text{ en la muestra} / \text{Peso atómico de H}}{\%C \text{ en la muestra} / \text{Peso atómico de C}} \quad O/C = \frac{\%O \text{ en la muestra} / \text{Peso atómico de O}}{\%C \text{ en la muestra} / \text{Peso atómico de C}}$$

IV.2- Relación E₄₆₅/E₆₆₅.

Esta relación es el cociente entre la absorbancia de los ácidos húmicos a 465 y 665 nm. Para ello, se preparan las diferentes muestras disolviendo aproximadamente 2 mg de estas en NaHCO₃ 0,05N, consiguiéndose así un pH ligeramente básico (entre 7 y 8) facilitándose así la solubilidad de estas. Seguidamente se miden las absorbancias de las diferentes disoluciones en un a las longitudes de onda indicadas. La medida se hace por triplicado y se considera la media de los valores obtenidos.

IV.3- Infrarrojo.

Los espectros de IR de las muestras de ácidos húmicos extraídos y de los que han quedado tras la reacción con TMAH se realizaron por la técnica de pastilla de bromuro potásico a partir de 2 mg de muestra y 300 mg de KBr.

IV.4- Pirólisis.

Se realiza la pirólisis de las muestras, es decir, calentamiento rápido en ausencia de oxígeno. Los productos obtenidos pasan directamente al cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS), separándose los compuestos para su posterior identificación. Para ello, se toma una pequeña cantidad de muestra lo más finamente dividida posible a la cual se le añade unas gotas de metanol. Con ayuda de una pipeta Pasteur se deposita la muestra sobre un hilo de pirólisis de punto de Curie de 610°C.

IV.5- Reacción con TMAH.

Se pesan aproximadamente 3 mg de muestra de ácidos húmicos extraídos y se introducen en un tubo de vidrio cerrado; se le añade 120 microlitros de hidróxido de tetrametilamonio, TMAH (solución al 25wt.% en agua), y se introduce en el ultrasonido durante unos minutos. Se congela y seguidamente se evapora todo el líquido posible en el liofilizador, consiguiéndose también con ello el vacío en el interior del tubo de reacción. Se introduce en el horno a 270°C durante media hora. Una vez que el tubo de reacción se enfría a temperatura ambiente se extrae con agua, se acidifica, se extrae con acetato de etilo y se deseca con Na₂SO₄ anhidro. La parte insoluble tras la acidificación se centrifuga y se lava el sólido varias veces para la eliminación de sales. Este sólido se recoge y se deja secar para un posterior análisis de IR.

V. Resultados y discusión.

V.1- Composición elemental y razones H/C y O/C.

El análisis elemental de las muestras de ácidos húmicos nos da información de la distribución de los elementos. El contenido de carbono en los ácidos húmicos de suelo suele variar dentro del rango de 53,8-58,7%, el de oxígeno entre 32,7-34,7%, el de hidrógeno entre 4,4-5,5%, el de nitrógeno entre 0,8-2,4% y el de azufre entre 0,6-0,9% (Schnitzer y Kahn, 1978).

En la tabla 1 se muestran los análisis elementales de las muestras. Si se comparan las composiciones de los diferentes elementos con respecto a la de V, que es un ácido húmico natural, se observa que dos de las muestras (H y HS) tienen un contenido de carbono bastante inferior, que es más parecido al contenido de este en los ácidos fúlvicos. La cantidad de hidrógeno en H, N, HS y A, es menor a la característica de los procedentes de suelo. Con respecto al oxígeno, la mayoría tiene valores más elevados; mientras que los de nitrógeno son más bajos.

A partir del valor de las razones H/C y O/C se puede distinguir si los ácidos húmicos proceden de suelos, turbas, sedimentos ó aguas; ya que el valor de estas relaciones varía según el origen de estos. Las razones atómicas también nos ayudan a proponer estructuras hipotéticas de ácidos húmicos y fúlvicos y servir como una guía para la síntesis de humatos artificiales.

Aunque la composición elemental es una guía útil, su validez es dependiente de la pureza de la muestra. Si se realizan repetitivas manipulaciones no degradativas o fraccionamientos y cambia la composición de una vez a otra, podemos decir que estamos trabajando con una mezcla.

El problema más serio en el estudio de las sustancias húmicas es la falta de reproducibilidad de los datos analíticos; la composición puede variar dependiendo de que procedimientos se han usado para su extracción y fraccionamiento, incluso cuando la procedencia de las muestras sea la misma. Hay casos en los cuales los mismos autores han usado la misma fuente y el mismo procedimiento de extracción y han obtenido análisis elementales significativamente diferentes. A partir de un análisis

elemental no se pueden definir unas conclusiones estructurales (MacCarthy, 1976; Malcolm y MacCarthy, 1979).

Tabla 1.- Composición elemental de las fracciones de ácidos húmicos.

Muestra	C (%)	H (%)	O + S (%)*	N (%)
H	47.46	2.75	48.99	0.80
HC	55.26	5.50	37.02	2.22
A	54.31	3.90	40.25	1.54
S	56.71	4.55	37.21	1.53
M	51.80	5.21	41.05	1.94
N	51.40	3.15	44.20	1.25
SP	51.15	4.66	34.47	0.72
F	51.67	4.15	42.52	1.66
C	55.56	4.14	38.52	1.80
HS	45.47	3.66	49.54	1.33
V	57,70	5,61	30.90	5.79

* por diferencia.

En la tabla 2, se indican los valores obtenidos de las relaciones H/C y O/C de las muestras.

Tabla 2.- Razones H/C y O/C

Nombre de la muestra	Relación H/C	Relación O/C
H	0,69	0,77
HC	1,19	0,50
A	0,86	0,56
S	0,96	0,49
M	1,21	0,59
N	0,74	0,64
SP	1,09	0,51
F	0,96	0,62
C	0,89	0,52
HS	0,97	0,82
V	1.16	0.40

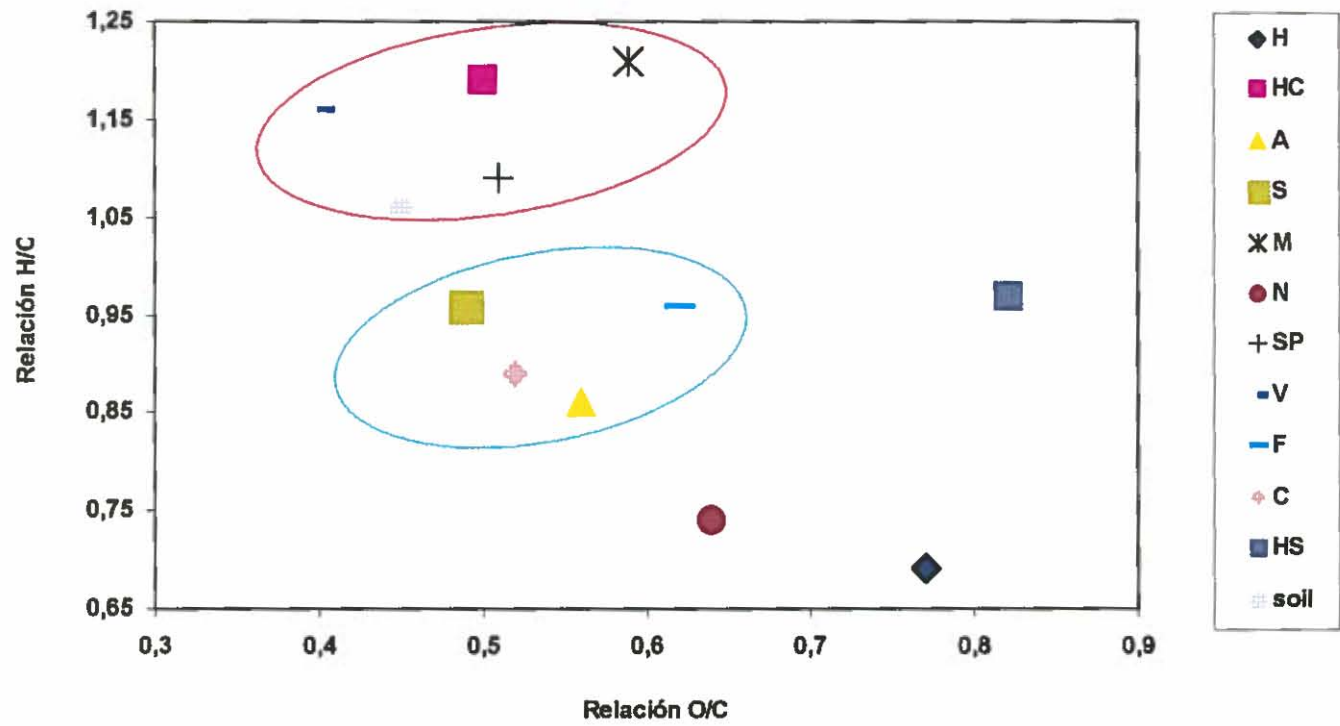
El cociente O/C es el más claro indicador del tipo de ácido húmico. En los procedentes del suelo este valor se encuentra alrededor de 0,5, al igual que los acuáticos (Thurman y Malcolm, 1983). Se observa que el valor obtenido en la mayoría de las muestras está en torno a 0,5; aunque dos de las muestras, H y HS, tienen valores más elevados. La razón H/C, normalmente con un valor en torno a 1, es muy similar para ácidos húmicos de diversos orígenes. En la muestra H, este valor es bajo.

Según Ertel y Hedges (1983) en los ácidos húmicos terrestres hay una correlación directa entre las relaciones E_{465}/E_{665} y H/C.

En la siguiente gráfica se representan los valores de H/C frente a O/C. Se considera que la zona de la derecha corresponde a los ácidos húmicos que están más oxidados, mientras que la de la izquierda a los más reducidos.

Para poder hacer una clasificación del origen de las muestras, se tienen en cuenta los valores de composición obtenidos por Schnitzer tras realizar un análisis elemental de ácidos húmicos procedentes de suelos (1997). Los valores medios fueron C 56,2%, O 33,7% y H 4,95%. Se toma como modelo un ácido húmico (al que llamamos "soil") con estas características y cuyas razones H/C y O/C son 1,06 y 0,45 respectivamente. De acuerdo con los datos y observando la gráfica, se pueden diferenciar dos zonas en las que se agrupan ácidos húmicos con características parecidas. La primera comprende a HC, M, SP, V y "soil" que, de acuerdo con las consideraciones tomadas, se pueden clasificar como ácidos húmicos procedentes de suelo. En una segunda zona podemos agrupar a S, A, C y F; que son muy similares entre sí, pero difieren de los obtenidos de suelo. Las muestras H, N y HS no se pueden englobar en ninguno de estos dos grupos.

Relación H/C-O/C



V.2– Relación E_{465} / E_{665} .

Entre los instrumentos científicos más útiles en el análisis químico, están los que aprovechan la radiación y la absorción de energía de las diferentes regiones del espectro electromagnético. Utilizando las diferentes longitudes de onda de la energía, es posible excitar selectivamente a los electrones de los enlaces moleculares, o de las órbitas atómicas, o incluso los núcleos de los átomos. Las moléculas y los átomos de cualquier sustancia dan unos modelos característicos de absorción de radiación.

La absorción en la región ultravioleta (200-400 nm) y visible (400-800 nm) del espectro electromagnético se debe a la presencia de electrones deslocalizados en grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno, azufre y halógenos, así como en sistemas con enlaces C=C conjugados. La absorción de luz supone el paso de electrones en orbitales σ , π , y η desde el estado de reposo (estado fundamental) a niveles de mayor energía (estado excitado) (Stevenson, 1982).

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos de las medidas de las absorbancias y de la relación E_{465} / E_{665} . El valor de esta relación suele ser menor de 5 para los ácidos húmicos de los diferentes tipos de suelos (Schnitzer, 1971).

Tabla 3.- Absorbancias a 465 y 665 nm y razón E_{465}/E_{665} .

Nombre de la muestra	E_{465}	E_{665}	E_{465}/E_{665}
H	0,767	0,197	3,89
HC	0,365	0,084	4,35
A	0,600	0,167	3,59
S	0,543	0,118	4,60
M	0,380	0,080	4,75
N	0,817	0,208	3,93
SP	0,385	0,104	3,70
F	0,396	0,074	5,35
C	0,752	0,209	3,60
HS	0,512	0,098	5,22
V	0.391	0.063	6.21

Esta razón es independiente de la concentración del material húmico pero varía con el origen de éste. Kononova (1966) cree que la magnitud de la razón E_{465} / E_{665} está

relacionada con el grado de condensación de la red aromática; de manera que un valor bajo de la relación indica un alto grado de condensación de los constituyentes húmicos aromáticos, y un valor alto de la relación refleja un bajo grado de condensación y con ello la presencia de gran proporción de estructuras alifáticas.

De acuerdo con Chen et al.(1977), esta relación viene gobernada por:

- Tamaño de la partícula (peso o Pm de esta).
- Afectada por el pH.
- Correlacionada con la concentración de radicales libres, contenido de O, C, CO₂H y acidez total; los cuales son función del tamaño (peso o Pm) de la partícula.
- Aparentemente no directamente relacionada con la concentración de anillos aromáticos condensados.
- Independiente de la concentración de ácidos húmicos, al menos en el rango de 100-500 ppm.

Según Chen et al.(1977), la relación viene principalmente gobernada por el tamaño y peso de las partículas. De acuerdo con estos investigadores, un valor E_{465}/E_{665} bajo está asociado a un tamaño molecular relativamente grande o a un alto peso molecular y un valor alto se asocia a un tamaño molecular más pequeño. También observó otras relaciones secundarias entre esta relación y la acidez total, contenido de grupos COOH y contenido de C y O.

Se ha observado una relación inversa entre esta razón y el tiempo de residencia medio del material húmico, específicamente, el material húmico con mayor valor de E_{465}/E_{665} tiene el menor tiempo de residencia medio, indicando esto que las sustancias más humificadas y altamente condensadas son de origen más antiguo (C.A.Campbell et al)., 1958).

Otros autores dicen que la absorción de luz de soluciones acuosas de ácidos húmicos en la región visible aumenta con la razón de C, el contenido total de carbono y el Pm. No hay evidencias que confirmen todo esto.

La relación E_{465}/E_{665} en las muestras varía entre el valor 3,60 en el caso de C y 6,21 en V. Este último muestra un valor muy alto con respecto al resto.

V.3- Infrarrojo.

En la espectroscopia infrarroja, los enlaces existentes entre los átomos absorben energía y se ponen a vibrar al ser irradiados en la zona infrarroja entre los $2,5 \cdot 10^{-6}$ m y los $20,0 \cdot 10^{-6}$ m. La longitud de onda real a la que se produce una vibración es característica de los dos elementos que forman el enlace, de lo que se deduce que en cualquier molécula formada por varios átomos diferentes hay muchos valores en los que se producen vibraciones, y que un espectro infrarrojo que cubre esa zona se compone de una serie de picos bastante acusados de diferente intensidad. Para que se produzca la absorción, es necesario que la frecuencia de la radiación incidente coincida con la frecuencia vibracional del enlace existente entre los dos átomos. El espectro infrarrojo de un compuesto se utiliza a modo de huella dactilar para fines de identificación.

La espectroscopia FT-IR, tiene ciertas ventajas sobre la dispersiva tradicional, ya que presenta un aumento de resolución y de la cantidad de energía que llega al detector del espectrofotómetro y la mejora de la relación señal/ruido (MacCarthy y Rice, 1985).

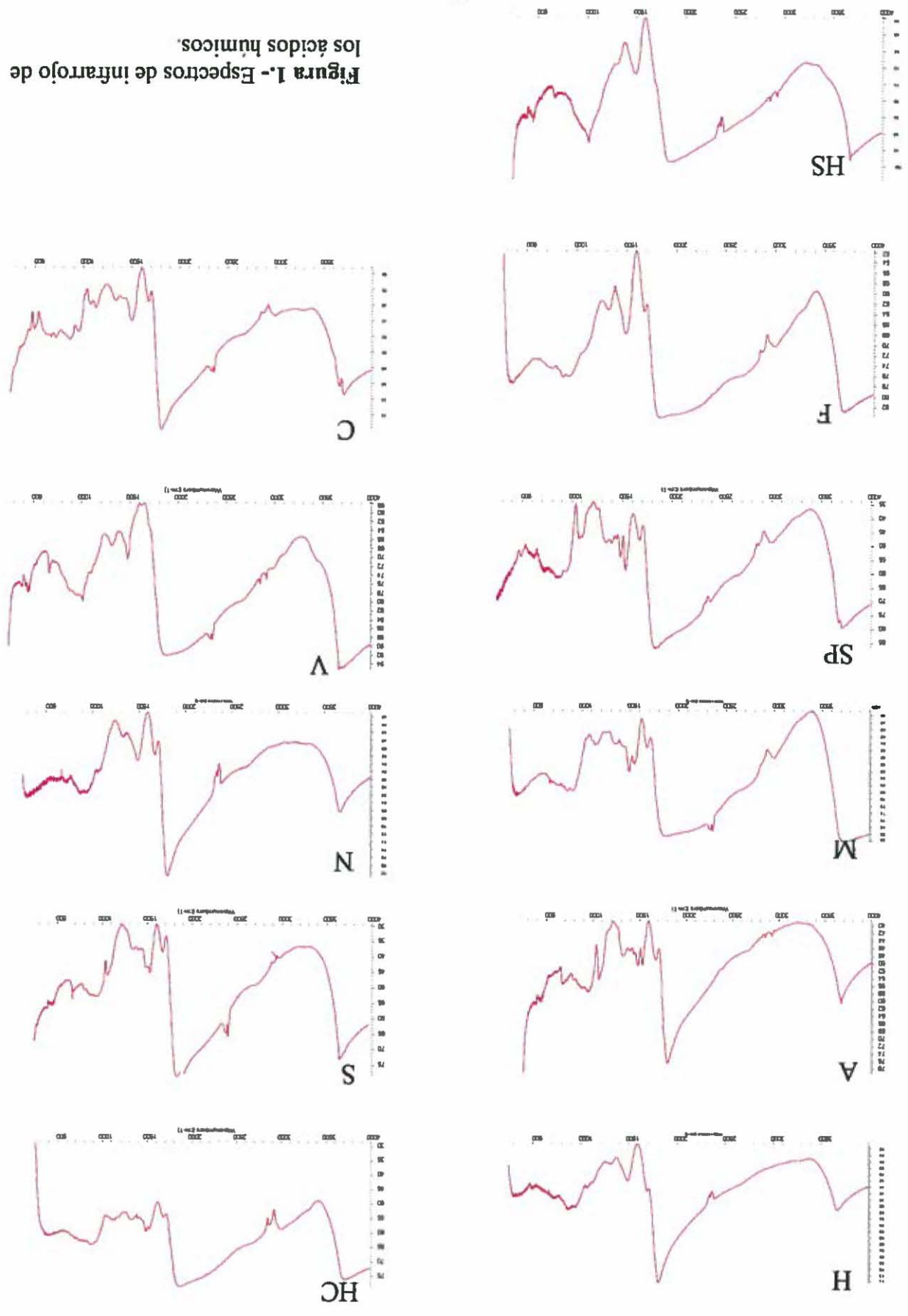
Los espectros de infrarrojo de las sustancias húmicas muestran bandas a las siguientes frecuencias: 3300 cm^{-1} (banda de hidroxilos); 2900 , 1460 , 1390 cm^{-1} (bandas de estructuras alifáticas); 1720 , 1250 cm^{-1} (bandas de grupos carbonilo); 1610 , 1500 cm^{-1} (bandas de estructuras aromáticas).

Las bandas son anchas probablemente por el solapamiento de las absorciones individuales. El espectro de IR refleja la preponderancia de grupos funcionales con contenido en oxígeno, como son, CO_2H , OH y $\text{C}=\text{O}$ en los materiales húmicos. Mientras que el espectro de IR de los materiales húmicos proporciona una valiosa información de la distribución de los grupos funcionales, dice poco sobre la estructura química del "núcleo" húmico. Sin embargo, la espectrofotometría infrarroja es útil para una somera caracterización de materiales húmicos de diversos orígenes, para la evaluación del efecto de diferentes extractantes químicos, modificaciones químicas como metilación, acetilación, saponificación y la formación de derivados. Puede también ser usado para la detección de cambios en la estructura química de materiales húmicos tras oxidaciones, pirólisis y tratamientos similares, para averiguar y caracterizar la formación de complejos de metal-humato y para indicar posibles interacciones de pesticidas y

herbicidas con los materiales húmicos (Sullivan y Felbeck, 1968; Stevenson y Goh, 1971; Schnitzer y Khan, 1972).

En la siguiente figura se muestran los espectros de infrarrojo de las muestras de ácidos húmicos extraídos. Se observa que algunos de ellos, como H, A, S, M y SP, presentan las bandas características indicadas anteriormente; que son cualitativamente similares a las bandas de los espectros de ácidos húmicos procedentes de turbas, suelos, sedimentos y aguas. En los espectros de IR de otras de las muestras hay bandas que no aparecen. Entre ellas tenemos H y N (no se observan las bandas de 2900, 1500 y 1460 cm^{-1}), V y F (no se observan las bandas de 1500 y 1460 cm^{-1}) y C (no se observa la banda correspondiente a 1500 cm^{-1}). HS es el único que presenta el espectro típico de una sal húmica ya que presenta bandas prominentes a 1575 y 1390 cm^{-1} .

Figura 1.- Espectros de infrarrojo de los ácidos húmicos



Si comparamos los resultados obtenidos con las razones E_{465}/E_{665} , se puede comprobar que en dos de las muestras, V y F, estos coinciden. Ambos tienen un valor del cociente alto lo que indica un grado de aromaticidad bajo, y en ambas se observa la falta de una de las bandas características de compuestos aromáticos.

Los espectros de infrarrojo de los residuos de la reacción con TMAH (no mostrados) presentan un pico muy acusado en una región cercana a 1040 cm^{-1} correspondiente a Si-O de impurezas de silicatos. Esta banda ya aparecía con menor intensidad antes de la reacción, pero ahora es más acentuada debido a que se ha degradado gran parte de la muestra y lo que nos ha quedado está principalmente constituido por estas impurezas.

V.4.- Pirólisis.

La pirólisis es un método degradativo que se utiliza para la caracterización de materiales húmicos. Dentro de los métodos degradativos se incluyen oxidaciones en medios alcalinos y ácidos, reducciones, hidrólisis y degradaciones térmicas, radioquímicas y biológicas. Con materiales complejos como los ácidos húmicos, la degradación es un acercamiento muy usado para obtener información de la estructura química de estos. Con ello se intenta producir compuestos químicos que puedan ser identificados y cuyas estructuras químicas puedan ser relacionadas con la de los materiales iniciales. Para ello han de utilizarse métodos que no sean muy drásticos y que no conduzcan a la formación de subproductos no deseados.

Se han desarrollado avances mediante sistemas computerizados de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) que hacen posible la separación e identificación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos de mezclas complejas. Se identifican las sustancias separadas por sus espectros de masas mediante un algoritmo de comparación con archivos que contienen espectros en forma de bibliotecas. Por todo ello, esta técnica es muy útil en el análisis cualitativo de mezclas orgánicas complejas.

Los cromatogramas obtenidos (cromatogramas de ion total) se muestran en la figura 2. Se observa que son muy diferentes unos de otros, tanto cualitativa como cuantitativamente.

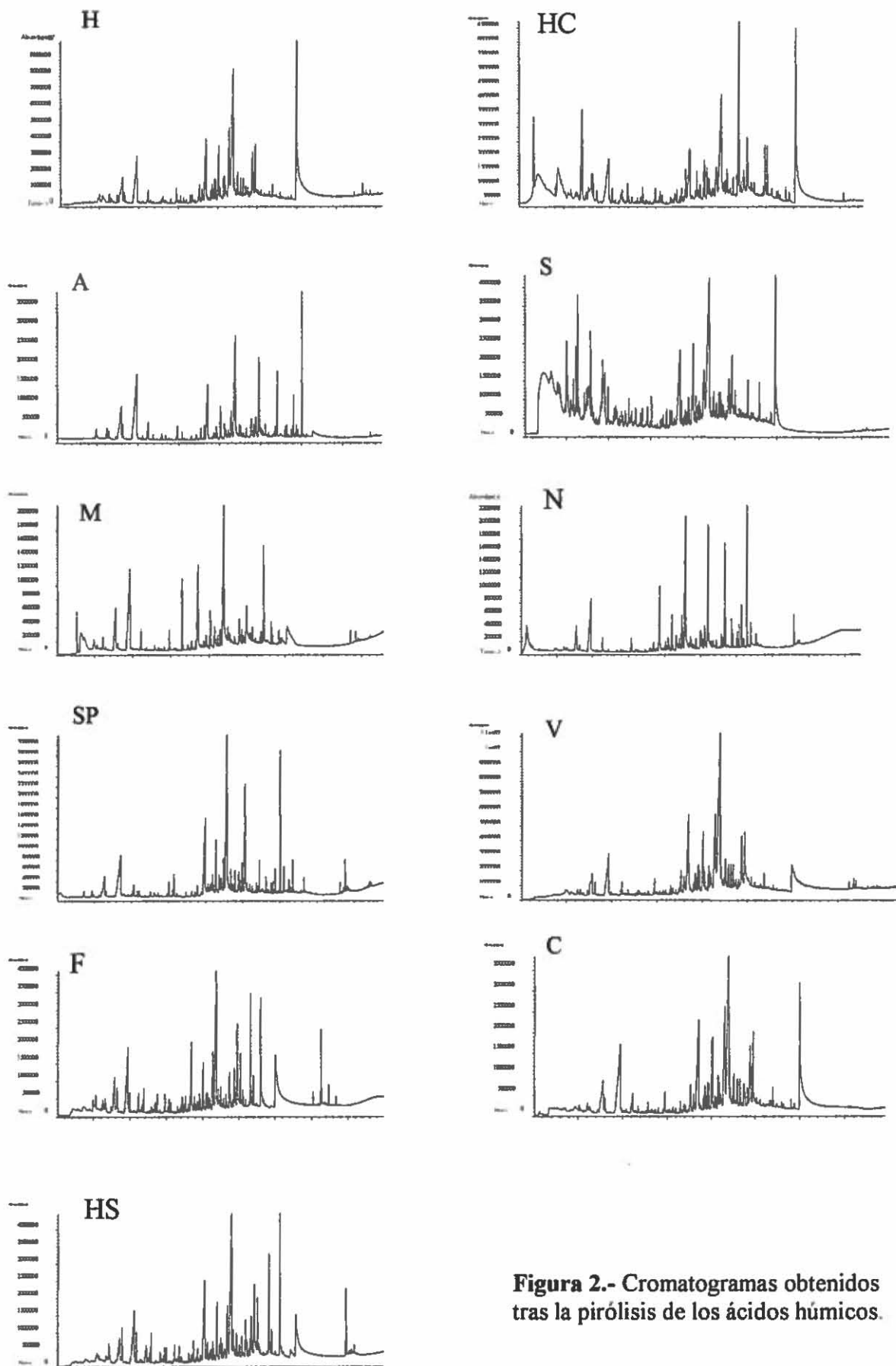


Figura 2.- Cromatogramas obtenidos tras la pirólisis de los ácidos húmicos.

En la tabla 4 se indican algunos de los compuestos identificados.

Tabla 4.- Compuestos identificados en pirólisis.

-Dimetilfenol.	-Bencenedicarboxilato de dimetilo
-3-Etilfenol	-2-(fenilmetilene)octanal=aldehido hexilcinámico
-4-Metil-2-(2'-metil-1'-propenil)fenol	-2(5H)furanone
-3-(1-metiletil)fenol	-5-etildihidro-, 2(3H)furanona
-2,6-dimetoxifenol	-5-hexildihidro-, 2(3H)furanona
-4-vinil-2-metoxifenol	-5-heptildihidro-,2(3H)furanona
-Fenol	-2-etilhexanoato de decilo
-2-metoxi-4-(1-propenil)fenol	-2-etilhexanoato de hexadecilo
-2-metoxi-4-propilfenol	-2-etilhexanoato de dodecilo
-2 ó 3 ó 4-metilfenol	-2-metil-2-propenoato de dodecilo
-2-metoxifenol	-3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de 2-etilhexilo
-2-metoxi-4-metilfenol	-Tetradecanoato de 1-metiletilo
-4-vinilfenol	-4-hidroxi-octadecanoato de metilo
-4-etil-3-metilfenol	-4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido
-4-cloro-3-metilfenol	-3-fenil-2-propenal
-4-etil-2-metoxifenol	-5-metil-1-feniloctano
-2-propenal-3-fenil	-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-, etanona
-Ácido benzoico	-1-metilnaftaleno
-Ácido 4-clorobenzoico	-Dimetilnaftaleno
-Ácido p-tert-butilbenzoico	-Trimetilnaftaleno
-Ácido 4-(1,1-dimetiletil)benzoico	-Tetrametilnaftaleno
-2-hidroxibenzoato de fenilmetilo	-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)naftaleno
-Benceno	-Piridina
-Metilbenceno	-2-dimetilamino-3-metilpiridina
-Dimetilbenceno	-Hexadecanamida
-Trimetilbenceno	-Anhídrido ftálico
-Etenilbenceno	-3-metoxiacetofenona
-1-metiletilbenceno	-1,1,3,3,5-pentametil-2,3-dihidroindeno
-1,5,5-trimetil-2-(1,2-propadienil)benceno	-Ácido fosfórico, tributil ester
-1,2-bencenodiol	-N-metil-N-1-(oxodecil)-, glicina
-nonilbenceno	-Tetrahidro-3-metiltiofeno
-1-metiltridecilbenceno	-Tetrahidro-6-propil-, 2H-piran-2-ona
-1-metiletil-, bencenoato de metilo	-2,3-dihidro-, 1H-inden-5-ol
-2-metil-1,4-bencenodicarboxaldehido	-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona=Geranilacetona
-2-furancarboxaldehido	-Nerilacetona
-5-metil-2-furancarboxaldehido	-Dihidrometiljasmonate
-5-hidroximetil-2-furancarboxaldehido	
-1H-pirrol-2-carboxaldehido	

Además de estos tenemos la serie de los ácidos grasos desde C₆ hasta C₁₈, y los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono esterificados. También aparecen las series de los aldehidos desde C₉ hasta C₁₆, alcanos y alquenos.

En la mayoría hay una gran cantidad de compuestos aromáticos, aunque predominan más en unas que en otras. Entre las muestras en las que aparece mayor número de estos compuestos aromáticos se encuentran A, HC, H, S, F y V. En algunas de ellas estos datos coinciden con los obtenidos de la razón E_{465}/E_{665} ; como es el caso de A y H, que tienen un valor del cociente bajo y, por tanto, mayor aromaticidad.

Algunos de los productos de degradación son derivados de la lignina, como es el caso de metoxifenoles y de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido entre otros.

También tenemos compuestos derivados de heterociclos aromáticos (furano, tiofeno y piridina) y de policiclos aromáticos (naftaleno).

V.6.- Reacción con TMAH.

Esta reacción consiste en una hidrólisis térmica asistida a baja temperatura (322°C) y metilación, la cual se realiza utilizando hidróxido de tetrametilamonio. Entre los productos degradados se obtienen fenoles, metoxifenoles, ácidos bencenocarboxílicos, ácidos grasos e hidrocarburos.

Se ha postulado recientemente que la degradación analítica de macromoléculas con TMAH a temperaturas de subpirólisis ofrece la misma información que la pirólisis convencional a alta temperatura con TMAH (D.E. McKinney et al., 1995), pero se han realizado investigaciones que no corroboran esto.

También se ha comprobado si se producían cambios en los productos obtenidos tras la degradación cuando aumentamos la cantidad de TMAH añadida a la muestra ó cuando la reacción se da a otras temperaturas durante ½ hora en el horno (200 y 230°C), pero no se observan diferencias significativas (F. Martín et al., 2001).

En la tabla 5 se indican algunos de los compuestos identificados.

Tabla 5.- Compuestos identificados en la reacción con TMAH.

-Etilbenceno	-(1-metildodecil)-, benceno
-1-etil-2-metilbenceno	-(1-metiltridecil)-, benceno
-1,3 ó 1,4-dimetilbenceno	-Ácido benzoico
-1,2,3-trimetilbenceno	-Ácido 2,5-dimetoxibenzoico
-2-propenilbenceno	-Ácido p-tert-butilbenzoico
-4-etil-1,2-dimetilbenceno	-Ácido 3-metoxi-4-metilbenzoico
-1,2,3,4-tetrametilbenceno	-Ácido 4-metoxibencenoacetico
-metoximetilbenceno	-Benzaldehido
-1,2-dimetoxibenceno	-3-hidroxi-4-metoxibenzaldehido
-1,2,3-trimetoxibenceno	-4-metoxibenzaldehido
-1,2,3-trimetoxi-5-metilbenceno	-3,4-dimetoxibenzaldehido
-1,2-dimetoxi-4-(1-propenil)benceno	-3,4,5-trimetoxibenzaldehido
-1,4-dimetoxi-2,3,5,6-tetrametilbenceno	-2,3-dimetoxi-4,5-
-1,2,4-trimetoxi-5-(1-propenil)-, benceno	metilenedioxibenzaldehido
-1-etenil-4-metoxibenceno	-3,4-dimetoxibencenoacetato de metilo
-1,2-dimetoxi-4-metilbenceno	-fenol
-4-etenil-1,2-dimetoxibenceno	-2-metoxifenol
-1,2,3,4-tetrametoxibenceno	-3,4-dimetoxifenol
-(1-pentiloctil)-, benceno	-2-metoxi-4-metilfenol
-(1-butylnonil)-, benceno	-4,5-dimetoxi-2-metilfenol
	-4,5-dimetoxi-2-(2-propenil)fenol

Tabla 5.-(continuación)

-2-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol	metilo
-3,4-dimetoxi-5-metil-2-(1-metiletil)fenol	-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenoato de metilo
-3,4-dimetoxitolueno	-Ácido 3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propanoico
-2,4,6-trimetoxitolueno	-2-etilhexanoato de hexadecilo
-1,2,3,4-tetrametoxitolueno	-2-etilhexanoato de octadecilo
-3-acetil-2,5,6-trimetoxitolueno	-24-metilhexacosanoato de metilo
-Benzoato de metilo	-cis-3,4-bis(3,4-dimetoxibencil) tetrahidrofurano
-4-hidroxi-3-metoxibenzoato de metilo	-3-(3,4-dimetoxifenil)propilamine,PFP
-4-etoxibenzoato de etilo	-1,2,3-trimetoxipropano
-3,4-dimetoxibenzoato de metilo	-Butanedioato de dibutilo
-3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo	-Metilbutanedioato de dimetilo
-3 ó 4-metoxibenzoato de metilo	-Metilenebutanedioate de dimetilo
-3-metoxi-4-metilbenzoato de metilo	-Hexadecanedioato de dimetilo
-2,6-dimetoxi-4-hidroxibenzoato de metilo	-Nonanedioato de dimetilo
-3,4-dimetoxibencenopropanoato de metilo	-Ácido 2-tiofenecarboxílico
-1,4-bencenodicarboxilato de dimetilo	-2-Tiofenecarboxilato de metilo
-1-(3-metoxifenil)-, etanona	-Dihidrometil jasmonate
-1-(3,4-dimetoxifenil)-, etanona	-Ácido dehidroabiético
-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-, etanona	-Ácido dehidroabiético, methyl ester
-1-(4-metoxifenil)-1-propanona	-3,3',4,4'-tetrametoxi-, estilbeno
-1(2,4-dimetoxifenil)-1-propanona	-Dimetilftalato
-3,6-di-tert-butil-1,7-dimetoxi-8-metilnaftaleno	-N,N-dimetilbutanamida
-3,6-di-tert-butil-1,7-dimetoxi-8-metil-, naftaleno	-3-metoxipiridina
-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)naftaleno	-2-(3,4-dimetoxifenil)tetrahidropirano
-1-(2-(4-metoxifenil)etenilcarbonil)-,3-metilbutano	-4-metoxibenzenamina
-3-(4-metoxifenil)-2-propenoatode2-etilhexilo	-1,3,5-trimetil-2,4(1H,3H)pirimidinadiona
-3-(dimetilamino)-2-propenoato de metilo	-Acetofenona
-3-fenil-2-propenoato de metilo	-3-metoxiacetofenona
-3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de metilo	-2,3-dimetoxi-4-metilacetofenona
	-2', 4'-dimetoxiacetofenona
	-2-(fenilmetilene)octanal=aldehido hexilcinamico-p-metoxicinamato de metilo

Entre los productos de degradación se encuentran, además de los indicados anteriormente, la serie de los ácidos grasos, de 6 a 18 átomos de carbono; la de los ácidos grasos metil esterificados, desde C₁₄ hasta C₃₄; y la de los alcanos y alquenos.

El área de los ácidos grasos metil ester es diferente de unas muestras a otras. Hay algunas en las que los esteres de mayor área se corresponden con los de 16 y 18 átomos de carbono, mientras que en otras son los de 26 y 28 átomos de carbono.

Los carbohidratos son constituyentes de la materia orgánica de los suelos. Estos pueden proceder de residuos de plantas que han resistido a la descomposición, a partir de síntesis microbiana de otros sustratos o por transformaciones microbianas de monómeros que se han liberado de las plantas durante la degradación. Se han identificado derivados de polisacáridos, entre los cuales tenemos 1,5-anhidro-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol; α -D-Xilofuranosido, metil, 2, 3, 5-tri-O-metil; permetil- α -D-Glucopiranosil-(1-1)- α -D-Glucopiranosido; . α -D-Glucopiranosido, fenil 2, 3, 4, 6-tetra-O-metil; permetil- β -D-Glucopiranosil-(1-1)- β -D-Glucopiranoside. Estos aparecen sólo en algunos de los ácidos húmicos, como es el caso de M, A, H, F y V.

Un gran número de compuestos son metoxifenoles que presumiblemente sean derivados de la lignina.

Otros productos son compuestos nitrogenados. Estos aparecen en las muestras M, HC, A, S, V y C, que son lógicamente los de mayor contenido en N (tabla 1).

Se observa que algunos de los compuestos aromáticos no están completamente metilados, como es el caso de 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de metilo; 2,6-dimetoxi-4-hidroxibenzoato de metilo y ácido 2-tiofenecarboxílico entre otros; así como los ácidos grasos citados anteriormente.

Parte de la muestra quedó sin reaccionar y esto sugiere que los productos que se han obtenido proceden de la superficie más externa y accesible de los ácidos húmicos quedando aún una parte que no se ha degradado mediante la utilización de esta reacción.

La pirólisis y la reacción con TMAH son técnicas complementarias entre sí. Entre las dos se identifican una gran cantidad de compuestos que nos ayudan a caracterizar las muestras.

VI.- Conclusiones.

Los fertilizantes húmicos son productos que aportan ácidos húmicos al sistema suelo-planta, provocando beneficios sobre la fertilidad.

Al comparar el análisis elemental de las muestras se observa que, en general, no se corresponden con el de V. Las composiciones no se parecen a la del ácido húmico natural. Mediante las razones H/C y O/C, se han agrupado las muestras en dos grupos, uno que incluye a las que son más parecidas a la de suelo (HC, M, SP), y otro que contiene a otras con características similares entre sí (S, A, C y F).

Los valores obtenidos de E_{465}/E_{665} en las fracciones húmicas estudiadas son menores que el de la muestra natural. Según los datos, las de mayor aromaticidad serían A y H, por poseer un valor más bajo del cociente; mientras que las de menor aromaticidad serían V y F. Se ha comprobado mediante pirólisis y la reacción con TMAH que las muestras A, HC, H, S, F y V, son las que presentan mayor número de compuestos aromáticos. Estos resultados no coinciden con los que se obtienen con esta técnica, lo cual se podría atribuir a que es un método empírico y los resultados no tienen por que corresponderse con la realidad.

Los espectros de infrarrojo son similares a los de los ácidos húmicos de suelo (Stevenson, 1982). La banda de compuestos alifáticos (2900 cm^{-1}) no se observa en dos de las muestras (H y N). La banda a 1040 cm^{-1} perteneciente al enlace Si-O-Si (de arcillas y silicatos, considerados como impurezas inorgánicas), es más prominente en A, S, SP y C.

Al identificar los productos obtenidos tras las técnicas degradativas se ve que algunos de ellos son nitrogenados. Los ácidos húmicos, entre cuyos constituyentes hay compuestos que tienen nitrógeno (M, HC, A, S, C y V) son los que contienen mayor cantidad de este elemento en su composición elemental, por tanto, los resultados están de acuerdo entre sí. Pero si comparamos estos valores con el valor medio dado por Schnitzer para ácidos húmicos procedentes de suelo, se comprueba que estos son bastante más bajos, exceptuando a V (muestra natural) que es algo mayor.

En algunas de las muestras se identifican derivados de polisacáridos, como es el caso de M, A, H, F y V.

La pirólisis y la reacción con TMAH son dos técnicas complementarias entre sí que nos ayudan a conocer la composición de los ácidos húmicos.

Es difícil determinar el origen de las muestras analizadas.

VII.- Bibliografía.

P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm y P.R. Bloom.
Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings (1990).

M. M. Kononova.
Soil Organic Matter (1961).

Russel F. Christman y Egil T. Gjessing.
Aquatic and Terrestrial Humic Materials (1983).

George R. Aiken, Diane M. McKnight, Robert L. Wershaw y Patrick MacCarthy.
Humic Substances in Soil, Sediment and Water (1985).

M. Schnitzer y S. U. Khan.
Soil Organic Matter (1978).

F. J. Stevenson.
Humus Chemistry (1982).

Gonzalez-Vila, F.J.; Knicker, H.; Martín, F.; Del Rio, J.C.; Castillo, L.; Bautista, J.M.
Assesment of the potential agronomic quality of commercial humic fertilizers by FT-IR and CPMAS ¹³C-NMR techniques.
In Humic substances, Clapp (Eds), Humic Substances Society (1996).

J.C. del Rio, D.E. McKinney, H. Knicker, M.A. Nanny, R.D. Minard, P.G. Hatcher.
Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line termochemolysis with tetramethylammonium hydroxide.
Journal of Chromatography A, 823, 433-448 (1998).

F. Martín, G. Almendros, F.J. González-Vila, T. Verdejo.
Experimental reappraisal of flash pyrolysis and low-temperature thermally assisted
Hydrolysis and methylation using tetramethylammonium hydroxide for the
molecular characterization of humic acids.
Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 61, 133-145 (2001).

Chen Y., Senesi N., Schnitzer M.
Information provided on humic substances by E4/E6 ratios.
Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 352-358 (1977).

Martín F., González-Vila F.J., Del Rio J.C., Verdejo T.
Pyrolysis derivatization of humic substances. 1. Pyrolysis of soil humic acids in the
presence of TMAH.
J. Anal. Appl. Pyrolysis, 31, 75-83 (1995).

González-Vila, F.J.; Lüdemann, H-D.; Martín, F.
13C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and
extracted derivatives.
Geoderma, 31, 3-15 (1983).

**Fründ, R.; Lüdemann, H-D.; González-Vila, F.J.; Almendros, G.; Del Rio, J.C.;
Martín, F.**
Structural differences between humic fractions from different soil types as determined
By FT-IR and 13C-NMR studies.
Sci. Total Environ., 81/82, 187-194 (1989).

TRABAJO REALIZADO POR M^o TRINIDAD SÁNCHEZ
VERDEJO (LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS)

M.  S.

SEVILLA 15 DE JULIO DE 2002