

FRACCIONAMIENTO DE ACIDOS HUMICOS DE  
VERTISOL POR GELES DE SEPHADEX. COMPOR-  
TAMIENTO SEGUN LOS METODOS EMPLEADOS

por

F. J. G. VILA y F. MARTIN



PUBLICADO EN  
ANALE DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA  
Tomo XXXVI, Núms. 11-12 — MADRID, 1977

# FRACCIONAMIENTO DE ACIDOS HUMICOS DE VERTISOL POR GELES DE SEPHADEX. COMPOR-TAMIENTO SEGUN LOS METODOS EMPLEADOS

por

F. J. G. VILA y F. MARTIN

## SUMMARY

### VERTISOLS HUMIC ACIDS FRACTIONATION THROUG SEPHADEX GELS. BEHAVIOUR ACCORDING TO THE METHODS EMPLOYED

Two humic acids from vertisol have been fractionated by Sephadex gels G-50, G-75 and G-100 according to the following methods: 1) in acid media using water as eluent, 2) in neutral media with NaCl and with water also as eluent and 3) in neutral media with an alkaline buffer as eluent.

In each case the distribution is according to different processes. Selected the methods 1 and 3, a great quantity of both humic acids was fractionated and some characteristics of the fractions were determined.

The fractions obtained are also complex and anything of them are responsible of the specific character of the whole samples.

## INTRODUCCIÓN

Es bastante numerosa la bibliografía existente sobre la aplicación de Sephadex y otros geles hidrofílicos similares, para el fraccionamiento y el cálculo del peso molecular (PM) de sustancias húmicas de suelos, aguas naturales y sedimentos marinos (Schnitzer y Khan, 1972). En principio el método de gel filtración ofrece la posibilidad de obtener fracciones más homogéneas de ácidos húmicos (HA), que serían más accesibles al estudio estructural por estar en ellas sustancialmente rebajada la polidispersidad y el elevado PM que caracteriza a las muestras totales.

Los conocimientos actuales sobre la estructura química de los HA sugieren para éstos una estructura aromática, así como la participación de fenoles y compuestos heterocíclicos. Si además consideramos que contienen grupos funcionales ácidos, alcohol, uniones éteres y posiblemente grupos quinónicos y amínicos (Flaig, 1971), no debe sorpren-

der que surjan importantes problemas de adsorción al fraccionarlos por geles de Sephadex especialmente afines por sustancias aromáticas, heterocíclicas y fenólicas (Swift y Posner, 1971). Tales fenómenos de adsorción han sido reseñados por numerosos autores, pero es muy escasa la información sobre su grado y tipo.

Es evidente que las interacciones gel/soluto deben evitarse al máximo cuando se pretende un fraccionamiento basado en PM.

En el presente trabajo se han estudiado dos muestras de HA extraídas de un vertisol, utilizando tres métodos distintos de fraccionamiento. El principal objetivo de la comparación ha sido, además de discutir los posibles mecanismos que rigen las interacciones, el seleccionar el método más idóneo para el reparto de las muestras en fracciones que posteriormente se caracterizarían, e intentar de esta forma una mejor información sobre las diferencias encontradas en las muestras totales.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Las principales características del suelo utilizado, así como los métodos de extracción y purificación de los HA han sido anteriormente descritas (Martín et al., 1974; Vila et al., 1974).

En todos los casos los geles empleados fueron del tipo Sephadex G. La columna tenía unas dimensiones de  $2 \times 32$  cm. y la distribución de las fracciones obtenidas se determinó representando la absorción a 436 nm frente al volumen de elución expresado en ml.

El fraccionamiento de las muestras totales (HA-N la extraída con NaOH 0,5 N y HA-P la extraída con la mezcla  $P_2O_5 \cdot Na_4$ : NaOH 1 M (1:1)) a concentraciones de 2-20 mg/ml y por los geles G-50, G-75 y G-100, se realizó por los tres métodos siguientes:

##### *Método 1*

Elución de las muestras en medio ácido con agua desionizada. Hay que hacer la salvedad de que los HA-P liofilizados se dispersan directamente en agua, mientras que los HA-N sólo lo hacen después de pasar por resinas de cambio la sal sódica. Con el fin de fraccionar las muestras en igualdad de condiciones también se pasaron por resinas las disoluciones alcalinas de HA-P, una vez comprobado que tal tratamiento no afectaba el comportamiento de elución de la muestra.

##### *Método 2*

Elución de las muestras a pH neutro con adición de un electrolito. La solución (0,2 N en ClNa) se eluyó con agua (técnica de «salt boundary», Posner, 1963).

*Método 3*

Elución de las muestras a pH neutro con buffers alcalinos. Se ensayaron bórax (pH 8), trietanolamina (pH 8,5) y Tris (pH 9). Los resultados mostraron que el primero no era aconsejable debido a interacciones HA/gel y que los otros dos eran igualmente efectivos. Se eligió la elución con Tris por su mayor fuerza iónica, según Swift y Posner, 1971. La disolución directa de las muestras de HA en los buffers alcalinos, no mejoró ni alteró los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del fraccionamiento de ambas muestras por los tres métodos descritos se presentan en las tablas I, II y III y en las figuras 1-6.

TABLA I

*Fraccionamiento de HA-N y HA-P por G-50*

Método	% F-I	% F-interm.	% F-II
HA-N <sub>1</sub> .....	64.7	—	35.3
HA-N <sub>2</sub> .....	40.0	—	56.8
HA-N <sub>3</sub> .....	55.6	—	44.3
HA-P <sub>1</sub> .....	78.8	—	21.1
HA-P <sub>2</sub> .....	10.1	12.7	71.0
HA-P <sub>3</sub> .....	61.2	—	39.4

Los subíndices indican el método seguido de fraccionamiento.

TABLA II

*Fraccionamiento de HA-N y HA-P por G-75*

Método	% F-I	% F-interm.	% F-II
HA-N <sub>1</sub> .....	68.3	—	31.2
HA-N <sub>2</sub> .....	14.0	20.8	57.1
HA-N <sub>3</sub> .....	24.3	—	75.7
HA-P <sub>1</sub> .....	68.2	—	33.5
HA-P <sub>2</sub> .....	6.6	14.2	79.2
HA-P <sub>3</sub> .....	9.0	—	90.1

TABLA III

Fraccionamiento de HA-N y HA-P por G-100

Método	% F-I	% F-interm.	% F-II
HA-N <sub>1</sub> .....	72.1	—	26.6
HA-N <sub>2</sub> .....	7.9	25.6	63.2
HA-N <sub>3</sub> .....	20.0	—	76.5
HA-P <sub>1</sub> .....	71.2	—	28.7
HA-P <sub>2</sub> .....	3.8	20.0	72.7
HA-P <sub>3</sub> .....	5.0	—	94.2

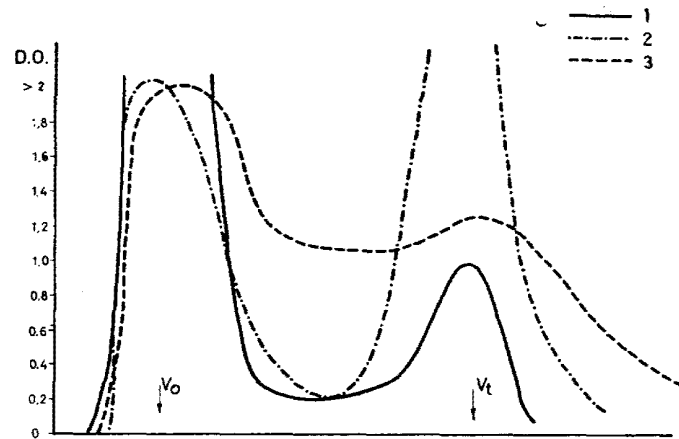


Fig. 1.—Fraccionamiento de HA-N por G-50.

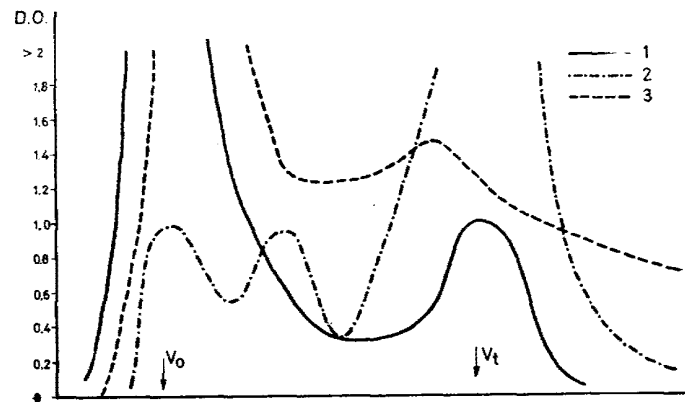


Fig. 2.—Fraccionamiento de HA-P por G-50.

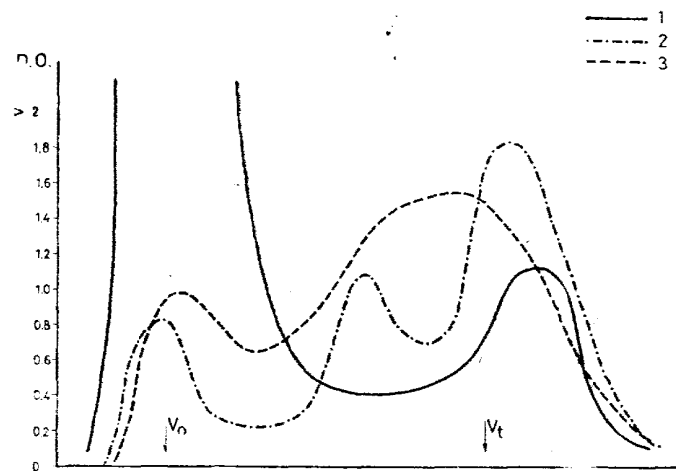


Fig. 3.—Fraccionamiento de HA-N por G-75.

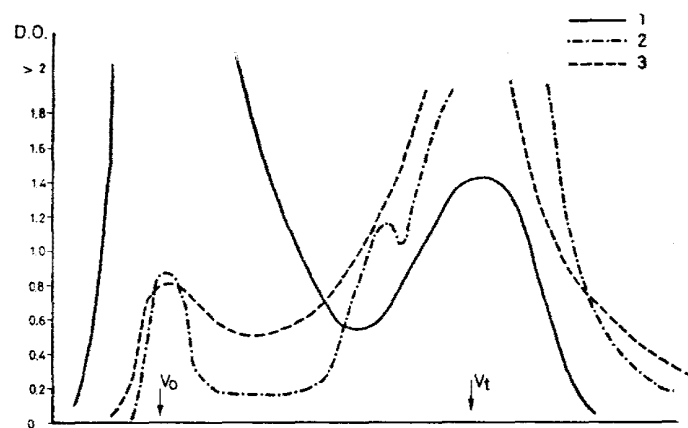


Fig. 4.—Fraccionamiento de HA-P por G-75.

Al fraccionar ambas muestras por el método 1 se observa: a) una clara exclusión de gran parte de las muestras por los tres geles, obteniéndose en el  $V_0$  entre el 65 y el 80 por 100 de las mismas (tablas I, II y III). Este resultado es similar al encontrado por Gjessing, 1965, al fraccionar HA de aguas naturales en medio ácido. b) Una pequeña adsorción de ambas muestras a los geles (más intensa en los HA-N). Este comportamiento está en desacuerdo con el que podría esperarse de la naturaleza aromática de los HA y con las observacio-

nes de Posner, 1963, y Schnitzer y Skinner, 1968, que señalan la existencia de fuertes interacciones al fraccionar, en medio ácido.

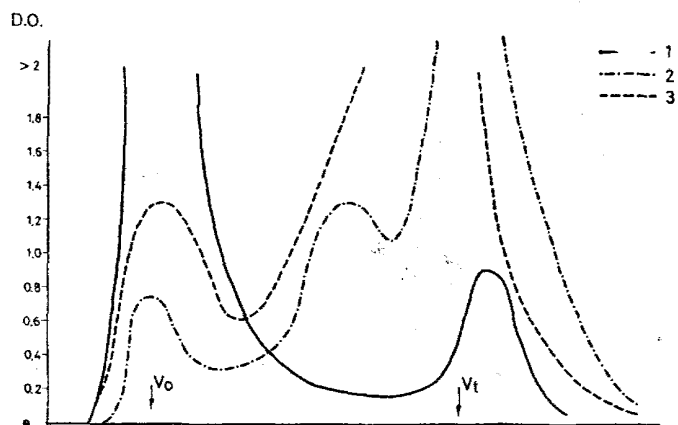


Fig. 5.—Fraccionamiento de HA-N por G-100.

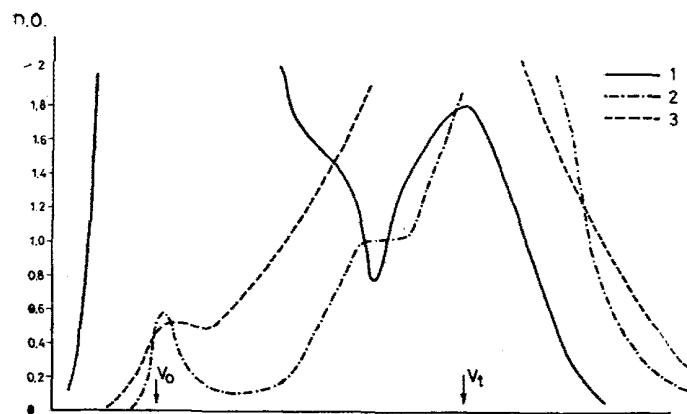


Fig. 6.—Fraccionamiento de HA-P por G-100.

Sin dejar de tener en cuenta el posible efecto de repulsión electrostática entre los polianiones húmicos y los grupos cargados del gel, hay que pensar en otro tipo de mecanismo para justificar el fenómeno de exclusión observado. Wershaw y Pinckney, 1973, en un estudio sobre el equilibrio asociación-disociación de HA en relación con el pH, mediante dispersión de rayos X a ángulos pequeños, encontraron que a pH 3.5 (pH al que quedan las muestras al ser pasadas por resinas de cambio) existe una alta agregación de las partículas de HA, agregación que decrece a medida que aumenta el pH, hasta el valor 7

donde las partículas están completamente desagregadas. Este resultado coincide con otros obtenidos con la ultracentrífuga (Flaig y Beutelspacher, 1968) y el microscopio electrónico (Flaig, 1971).

De acuerdo con estas observaciones, sería lógico interpretar los resultados de este fraccionamiento como una separación por grupos de agregados, en los que las partículas que componen las muestras totales se encuentran en distinto grado de agregación. El efecto de tamiz molecular del gel seguiría rigiendo la penetración y/o exclusión de los distintos grupos de agregados, pero quedaría desvirtuada de alguna forma una separación exclusiva en PM.

El método 2 es el único que no permite una distribución bimodal de las muestras totales de acuerdo con los resultados más frecuentes en la bibliografía (Dubin y Fil'kov, 1968; Butler y Ladd, 1969; Swift y Posner, 1971; Wershaw y Pinckney, 1971; Khan y Friesen, 1972). En general se obtuvo una separación defectuosa tanto cuali como cuantitativamente. Con ambas muestras y con los tres geles se producen adsorciones irreversibles e incluso la retención total al comienzo de los lechos de G-75 y G-100 de una fracción de HA-P.

La eficacia de este procedimiento está condicionada por la dificultad en precisar la concentración idónea de electrolito. Teóricamente éste reduciría el peso de agua polar de hidratación asociada al coloide húmico, suprimiendo así las interacciones entre las dobles capas cargadas del soluto y el gel, que son las que condicionan la distribución del primero según su concentración, al eluir con agua (Posner, 1963; Söchtig, 1972).

Una posible explicación al aumento de la adsorción de las muestras de HA al gel al añadir el electrolito, puede encontrarse interpretando los resultados según conceptos de química coloidal. Eaker y Porath, 1967, sugirieron que las moléculas que contienen porciones hidrofóbicas son atraídas a la fase gel por puntos en los que no hay sal y por tanto no están completamente rodeados de agua. La existencia de estos puntos activos en el gel, quedaría explicada según Derman y Lampert, 1972, al establecerse una competencia por el agua entre las cadenas de dextrano solvatadas y los iones del electrolito, que terminaría a favor de éstos, resultando como consecuencia un engorgamiento del gel.

Por otra parte, según los estudios con coloides húmicos realizados por Ong y Bisque, 1968, puede admitirse que el polielectrolito húmico, inicialmente hidrofílico, se convierte, al menos parcialmente, en hidrofóbico, al añadir a sus disoluciones una sal, por expulsión de una parte de agua de hidratación que rodea las moléculas (efecto Fuoss). Teniendo en cuenta estas consideraciones, podría explicarse el que se produzcan fuertes adsorciones hidrofóbicas de ambas muestras, y que incluso no se incluya alguna fracción de HA-P que tiene mayor contenido en estructuras aromáticas que la de HA-N según se deduce



del análisis de ambas muestras (Viña, F. J. G. Tesis doctoral). Los distintos picos de las curvas de elución, obtenidos por este método, son producto de la intervención en el gel de tres mecanismos distintos: tamizado, cambio iónico y adsorción hidrofóbica.

Janson, 1967, recomienda el fraccionamiento de sustancias aromáticas en soluciones fuertemente alcalinas. La mayor parte de los autores que han empleado la técnica de gel filtración en HA han empleado buffers alcalinos. Swift y Posner, 1971, recomiendan que para efectuar un fraccionamiento basado solamente en diferencias en el PM, debe emplearse buffers alcalinos conteniendo un gran catión amino. En el presente trabajo al utilizar el método 3, no se observan fenómenos de adsorción, apareciendo los máximos del segundo pico antes o en el  $V_r$ , si bien tampoco se obtiene una buena distribución, es decir, una marcada separación entre las fracciones. Este hecho tiene poca importancia en comparación con la posibilidad de obtener fracciones que sólo difieren en PM, pero obliga a una serie de refraccionamiento si se quiere trabajar posteriormente con ellas.

La distribución es marcadamente diferente como se observa en las curvas y en las tab'as, al menos en lo que respecta a G-75 y G-100. En este último, el orden de distribución en porcentaje es diametralmente opuesto a la distribución según el método 1 y más acusado en HA-P que en HA-N.

A la vista de estos resultados se eligieron los métodos 1 y 3 y el gel G-100 para el fraccionamiento de ambas muestras en gran escala, en razón a la pureza de los fraccionamientos (según los criterios aceptados) y al hecho de que éstos tienen lugar en virtud de parámetros distintos: separación por grupos de partículas de igual tamaño y PM respectivamente. La elección de G-100, con el rango de fraccionamiento más elevado, garantiza que al menos la primera fracción está bien definida en cuanto a su homogeneidad cromatográfica.

En la tab'a IV se presentan los datos de composición elemental, razones atómicas y moleculares y contenido en grupos funcionales de las muestras totales y las distintas fracciones.

Diversos autores han relacionado algunas propiedades fisico-química de fracciones de HA de suelos (Butler y Ladd, 1969; Ladd, 1969; Schnitzer y Skinner, 1968; Swift et al., 1970) y de sedimentos marinos (Rashid y King, 1969) obtenidas por gel filtración. En general, los resultados se limitan a establecer una serie de correlaciones poco concluyentes. En el presente trabajo ocurre igual, ya que de los valores presentados en la tab'a IV no se pueden deducir las diferencias analíticas que cabría esperar entre fracciones de muy distinto PM, ni la justificación de los distintos mecanismos que han intervenido supuestamente en las separaciones.

Las dos fracciones que teóricamente deben ser más complejas pero mejor definidas, HA-N<sub>11</sub> y HA-P<sub>11</sub> y HA-N<sub>31</sub> y HA-P<sub>31</sub>, mantienen las

tendencias que presentan las muestras totales, es decir las de HA-P contienen más C pero menos H y N que las de HA-N. Se observa una regularidad en cuanto a que las fracciones eluidas en primer lugar por ambos métodos contienen más C, H y N que las eluidas en segundo lugar, y consecuentemente menos O. Asimismo para ambas muestras, las fracciones obtenidas por el método 1 tienen menos C, H y N que las correspondientes obtenidas por el método 3. El mayor contenido en N de las muestras eluidas según el método 3 no es un índice, toda vez que el empleo como eluyente de una sustancia con grupos amino puede conducir a error en la determinación de este elemento.

Teniendo en cuenta la razón atómica H/C, utilizada como índice de aromaticidad, las fracciones eluidas en segundo lugar por los dos métodos, son más aromáticas que las primeras, siendo las diferencias más acusadas entre una y otra en el fraccionamiento en medio alcalino, es decir basado fundamentalmente en PM. Esta mayor aromaticidad de las fracciones retenidas está de acuerdo con la mayor densidad óptica respecto a las fracciones excluidas, resultado que está de acuerdo con los obtenidos por Ladd, 1969 y Swift et al., 1970. En opinión de estos autores este hecho muestra que el grado de aromaticidad está inversamente relacionado con el PM.

La razón O/H molecular, utilizada como índice del grado de oxidación de las muestras, indica que las fracciones retenidas de ambos HA y por los dos métodos presentan un mayor estado de oxidación que las excluidas. Este resultado concuerda con el obtenido por Theng et al., 1969; Butler y Ladd, 1969 y Swift et al., 1970, que observan un incremento en el estado de oxidación a medida que disminuye el PM. En medio ácido los grupos de agregados tienen mayor estado de oxidación que en medio alcalino, lo que indicaría que el PM de los primeros es mayor que el de los segundos.

Por lo que se refiere a los grupos funcionales, sólo se observa una cierta secuencia en los grupos carboxilos, que son mayores en las fracciones retenidas en ambos métodos, como también encontraron Dell' Agnola y Ferrari, 1971.

## CONCLUSIÓN

Por la reproducibilidad de los fraccionamientos, independiente de la concentración de las muestras, así como por la ausencia de interacciones gel/soluto, es posible obtener una distribución de las partículas que componen los HA en tamaños de agregados o pesos moleculares, fraccionando las muestras en medio ácido utilizando agua como eluyente o en medio neutro utilizando un buffer alcalino aminado. En el primer caso además de un mecanismo de exclusión interviene la acción de tamiz molecular del gel.

TABLA IV

Composición elemental, razón atómica H/C, razón molecular O/H y grupos funcionales de las muestras totales y de las fracciones obtenidas por los métodos 1 y 3

Muestra	C	H	N	O	H/C	O/H	Acidez total	Grupos COOH	OH totales	OH fenólic.	OH alcohol	C = O totales
HA-N ... ..	52,10	4,25	4,25	37,60	1,14	7,60	5,04	3,50	5,87	1,54	4,33	1,22
HA-P ... ..	55,52	3,47	2,14	36,76	0,75	10,59	6,65	5,25	6,08	1,40	4,68	1,33
HA-N <sub>11</sub> ... ..	51,25	2,91	2,39	43,45	0,68	14,93	5,00	3,29	6,28	1,71	4,57	2,50
HA-N <sub>12</sub> ... ..	44,68	2,05	1,67	48,40	0,55	23,61	5,00	3,57	n. d.	1,43	n. d.	0,00
HA-N <sub>31</sub> ... ..	51,56	5,70	6,00	37,89	1,32	6,64	3,75	2,16	6,12	1,59	4,53	0,00
HA-N <sub>32</sub> ... ..	50,41	4,08	4,17	40,10	0,97	9,83	5,83	4,02	6,08	1,81	4,27	2,50
HA-P <sub>11</sub> ... ..	54,94	2,91	2,39	39,76	0,63	13,65	8,75	5,58	5,41	3,17	2,24	6,00
HA-P <sub>12</sub> ... ..	50,78	2,60	2,02	44,60	0,61	17,15	8,23	6,48	5,61	1,75	3,86	4,50
HA-P <sub>31</sub> ... ..	55,21	4,14	3,09	37,56	0,90	9,07	7,00	3,50	n. d.	3,49	n. d.	3,65
HA-P <sub>32</sub> ... ..	54,76	2,68	2,17	40,39	0,59	15,07	8,75	7,38	4,87	1,37	3,50	5,30

El primer subíndice indica el método y el segundo la fracción.

Sin embargo, las fracciones obtenidas siguen siendo muy complejas y no parece que alguna de ellas sea responsable del carácter específico de las muestras totales.

#### RESUMEN

Dos ácidos húmicos extraídos de un vertisol con dos agentes alcalinos, se fraccionan por geles de Sephadex, G-50, G-75 y G-100, según tres métodos: 1) en medio ácido con agua como eluyente, 2) en medio neutro con adición de ClNa y agua como eluyente, y 3) en medio neutro con un buffer alcalino como eluyente.

La distribución en cada caso se efectúa según procesos diferentes. Elegidos los métodos 1 y 3 se fraccionan ambos ácidos húmicos en mayor escala determinándose posteriormente algunas características de las fracciones.

Las fracciones obtenidas siguen siendo complejas y no parece que alguna de ellas sea responsable del carácter específico de las muestras totales.

*Centro de Edafología y Biología Aplicada del Cuarto. Sevilla.*

#### BIBLIOGRAFÍA

- BUTLER, J. H. A. y LADD, J. M. (1969). The interaction of phenols with Sephadex gels. *J. Chromatog.*, 41, 200.
- DELL'AGNOLA, G. y FERRARI, G. (1971). Molecular sizes and functional groups of humic substances extracted by 0.1 M pyrophosphate from soil aggregates of different stability. *J. Soil Sci.*, 22, 342.
- DETERMAN, H. y LAMPERT, K. (1972). Hydrophobic interaction in gel adsorption chromatography. *J. Chromatog.*, 69, 123.
- DUBIN, V. N. y FILKOV, V. A. (1968). Fractionation of humic acid in some Moldavian soils by Sephadex filtration. *Soviet Soil Sci.*, 639.
- EAKER, D. y PORATH, J. (1967). Sorption effects in gel filtration. *Separation Sci.*, 2, 507.
- FLAIG, W. (1971). Biochemistry of soil organic matter in relation to crop production. Introductory lecture for FAO consultant project 472.
- FLAIG, W. y BEUTELSPACHER, H. (1968). Investigation of humic acid with the analytical centrifuges. The use of Isotopes and Radiation in Soil Organic Matter studies IAEA, Vienna, 23.
- GJESSING, E. T. (1965). Use of Sephadex gel for estimation of molecular weight of humic substances in natural water. *Nature*, 208, 1091.
- JANSON, J. C. (1967). Adsorption phenomena on Sephadex. *J. Chromatog.*, 28, 12.
- KHAN, S. U. y FRIESEN, D. (1972). Gel filtration of humic acids extracted from the black solonchic and black chernozemic soils of Alberta. *Soil Sci.*, 114, 73.
- LADD, J. M. (1969). The extinction coefficients of soil humic acids fractionated by Sephadex gel filtration. *Soil Sci.*, 107, 303.
- MARTÍN, F., SÁIZ JIMÉNEZ, C. y GONZÁLEZ VILA, F. J. (1974). Humic matter from vertisols. *An. Edaf. Agrobiol.*, 33, 477.
- ONG, H. L. y BISQUE, R. E. (1968). Coagulation of humic colloids by metal ions. *Soil Sci.*, 106, 220.
- POSNER, A. M. (1963). Importance of electrolyte in the determination of molecular weight by Sephadex gel filtration with special reference to humic acid. *Nature*, 198, 1161.
- RASHID, M. A. y KING, L. H. (1969). Molecular weight distribution measurements

- on humic and fulvic acids fractions from marine clays on the Scotian shelf. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **32**, 147.
- SCHNITZER, M. y SKINNER, S. I. M. (1968). Gel filtration of fulvic acids a soil humic compound. The use of Isotopes and Radiation in Soil Organic Matter studies IAEA, Vienna, 41.
- SCHNITZER, M. y KHAN, S. U. (1972). Humic substances in the environment. Marcel Dekker., New York.
- SÖCHTIG, H. (1972). Gel chromatography as a method for characterization of humic systems. Proc. Int. Meet. Humic Substances. Nieuwerluis. Fudoc. Wageningen. Holanda.
- SWIFT, R. S., THORNTON B. K. y POSNER, A. M. (1970). Spectral characteristics of a humic acids fractionated with respect to molecular weight using an agar gel. *Soil Sci.*, **110**, 93.
- SWIFT, R. S. y POSNER, A. M. (1971). Gel chromatography of humic acids. *J. Soil Sci.*, **22**, 237.
- THENG, B. K., WAKE, J. R. H. y POSNER, A. M (1968). The fractional precipitation of soil humic acid by ammonium sulphate. *Plant and Soil*, **29**, 305.
- VILA, F. J. G. (1974). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Sevilla.
- VILA, F. J. G., SÁIZ JIMÉNEZ, C. y MARTÍN, F. (1974). Comparative studies of humic acids extracted with alkaline agents. *Agrochimica*, **18**, 164.
- WERSHAW, R. L. y PINCKNEY, D. J. (1971). Association and dissociation of a humic acid fraction as a function of pH. *Geol. Survey Res., D.*, 216.
- WERSHAW, R. L. y PINCKNEY, D. J. (1973). The fractionation of humic acids from natural water systems. *J. Res. U. S. Geol. Survey*, **1**, 361.

Recibido para publicación: 1-VI-76