

EVALUACION DEL PESO MOLECULAR-PROMEDIO PONDERAL (M_w) DE ACIDOS HUMICOS POR UN METODO COMBINADO DE GEL-FILTRACION Y DIFUSION

por

F. J. GONZALEZ VILA y F. MARTIN MARTINEZ

SUMMARY

ESTIMATION OF THE WEIGHT AVERAGE MOLECULAR WEIGHT (M_w) OF HUMIC ACIDS BY A COMBINED METHOD OF GEL FILTRATION-DIFFUSION

A method to estimate weight average molecular weight (M_w) of humic acids based in the fractionation through Sephadex gels of different degree of cross-linking is proposed. The M_w of the fractions is obtained by interpolation in the calibrated curves of Sephadex G-100 and G-50. The M_w of the fractions separated by G-50 are calculated by its diffusion coefficients.

Los conocimientos actuales sobre la naturaleza química de los ácidos húmicos (HA) sugieren para éstos un carácter aromático y una estructura formada por la distribución desordenada («random») de múltiples componentes orgánicos definidos, entre los que se encuentran polifenoles, péptidos y polisacáridos. El «agregado» posee ciertas propiedades medias que caracterizan el sistema como un todo.

Un dato de importancia teórica y práctica en el estudio de los HA es el de su peso molecular (PM). Su conocimiento puede ayudar directamente a la elucidación de los problemas genéticos de suelos que plantean la migración de HA, su redistribución en el perfil y su efecto sobre los componentes minerales (Schnitzer y Desjardin, 1962; Orlov, 1972), y permitiría una comparación más racional del contenido en HA de distintos suelos, utilizando concentraciones molares de los mismos en vez de porcentajes.

Este dato, sin embargo, dista mucho de estar precisado. Los PM señalados para HA en la bibliografía oscilan entre algunos cientos y varios millones. Esta enorme discrepancia se debe tanto a la diversidad de las técnicas empleadas para su cálculo (obteniéndose en cada caso los distintos PM-promedios empleados en el estudio de sistemas polidispersos) como a las diferencias en origen, método de extracción, grado de purificación, etc., de las muestras (Schnitzer y Khan, 1972).

Dada la extrema polidispersidad de las sustancias húmicas, la Gel-Filtración (GF) ha sido uno de los métodos experimentales más ampliamente utilizado para su fraccionamiento y en la determinación de valores de PM o distribuciones en PM (Cameron et al., 1972a). Las dificultades que plantean las importantes interacciones gel/HA pueden superarse mediante una adecuada elección de las condiciones operacionales (Swift y Posner, 1971; González Vila y Martín, 1976).

Sin embargo, como han señalado muchos autores, para la utilización de esta técnica en el cálculo del PM de HA es necesario el calibrado previo de los geles con fracciones de HA de PM conocidos (Wershaw et al., 1970; Schnitzer y Khan, 1972; Cameron et al., 1972a). El poder de separación de los geles ha sido determinado por los fabricantes empleando fracciones de proteínas y polisacáridos de conformación y PM conocidos, y lógicamente debe variar para HA, muy diferentes en su constitución química a los materiales de calibrado citados.

Teniendo en cuenta esta objeción, en el presente estudio se propone un método para el cálculo del PM-promedio ponderal (M_{pw}) de dos muestras de HA de diferentes características analíticas. Se basa en la subdivisión y clasificación de los polímeros húmicos en razón de su volumen molecular utilizando sucesivamente geles de Sephadex-G de porosidad diferente. El PM de las fracciones se obtiene mediante la utilización de un gel, Sephadex G-100, calibrado por Cameron et al., 1972a para su uso con HA y calculando los coeficientes de difusión de fracciones de menor PM obtenidas por Sephadex G-50, con vistas a corregir los PM de las fracciones obtenidas por dicho gel.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de HA empleadas se extrajeron con NaOH 0,1 N (HAN) y la mezcla Pirofosfato-NaOH 0,1 M (HAP) respectivamente de un Vertisol localizado en El Sorbito, Utrera (Sevilla). Los métodos de extracción y las características físico-químicas de las mismas han sido previamente publicadas (González Vila et al., 1974).

Gel-Filtración

Ambas muestras a pH neutro se fraccionaron mediante el empleo sucesivo de geles de distinto reticulado, empleando Tris a pH 8,5 como eluyente (método de Swift y Posner, 1971). Se ensayó la efectividad de los dos procesos posibles respecto al sentido del fraccionamiento:

- a) Sentido A: fraccionamiento de la muestra total por G-100. La fracción retenida en éste se pasó por G-75; la retenida en éste se pasó por G-50 y la incluida en éste por G-25.
- b) Sentido B: fraccionamiento inicial por G-25. La fracción excluida se fraccionó por G-50, la excluida de éste se pasó por G-75 y la fracción excluida en éste por G-100.

Las distintas fracciones recogidas para un posterior fraccionamiento se purificaron por refraccionamientos en el mismo gel antes de su fraccionamiento en el próximo de mayor o menor rango.

Cálculo del coeficiente de difusión de dos fracciones obtenidas por G-50

Se fraccionaron 200 mg. de las dos muestras totales por una columna empaquetada con Sephadex G-50, con un

$$V_0 = 74,6 \text{ ml. y } V_t = 121 \text{ ml.}$$

Del reparto bimodal obtenido (G. Vila y Martín, 1976) se seleccionó en cada caso la fracción incluida. Por refraccionamientos continuos se obtuvo para ambas un pico de elución bien definido, empleándose unos 50 mg. de cada fracción en la determinación de los coeficientes de difusión.

El método empleado, modificación del descrito por Cameron et al., 1972b, utiliza el intenso color de las soluciones de HA. La parte experimental es como sigue: en una cubeta de vidrio de 1 cm² de superficie y 4 cm. de altura se depositaron cuidadosamente con una jeringa 2 cc. de un buffer incoloro (PO_4HK_2 0,2 M en agua) sobre otros 2 cc. de una solución diluida de la fracción de HA (aprox. 0,01 por 100). La formación de un límite claro de separación entre ambas soluciones se facilitó preparando la disolución de la fracción de HA en PO_4HK_2 0,2 M en una mezcla de glicerina-agua (10:90). A intervalos de dos horas se hicieron fotografías de las cubetas (con las muestras y replicados) dispuestas en un soporte estático dentro de una habitación termostatada. La concentración del HA difundido se siguió examinando la imagen de los negativos en el microscopio (Ultraphot Zeiss) mediante un sistema óptico electrónico de análisis de imágenes (Microvideomat). Sobre la imagen de la cubeta en la pantalla del Microvideomat se efectuó un barrido de la zona de contacto entre el buffer y la solución de HA con una «ventana» de 2 mm. reales de cubeta. En cada dos mm. se midieron así distintas áreas para varios tonos de grises previamente seleccionados.

Para calcular la difusión en cm/hora se representó la concentración de HA difundido cada dos mm., expresada por el área media del tono de gris medio, frente a cm. a los distintos tiempos en que se realizaron las fotografías.

Calculado el coeficiente de difusión experimental, se efectuó una corrección de viscosidad debida a la disminución de la velocidad de difusión en presencia del gradiente de glicerina, obteniéndose así el coeficiente de difusión standard (D_{20} , agua) del que se obtiene el M_w de la fracción de HA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los refraccionamientos sucesivos de ambas muestras de G-100 a G-25 (sentido A) y de G-25 a G-100 (sentido B) se presentan en las figuras 1 y 2 (a, b, c, d).

En la fig. 1b se observa que las segundas fracciones obtenidas por G-100 en ambas muestras (II N 100 y II P 100), al pasarlas por G-75 se incluyen totalmente dentro del volumen operacional de este gel sin fraccionarse.

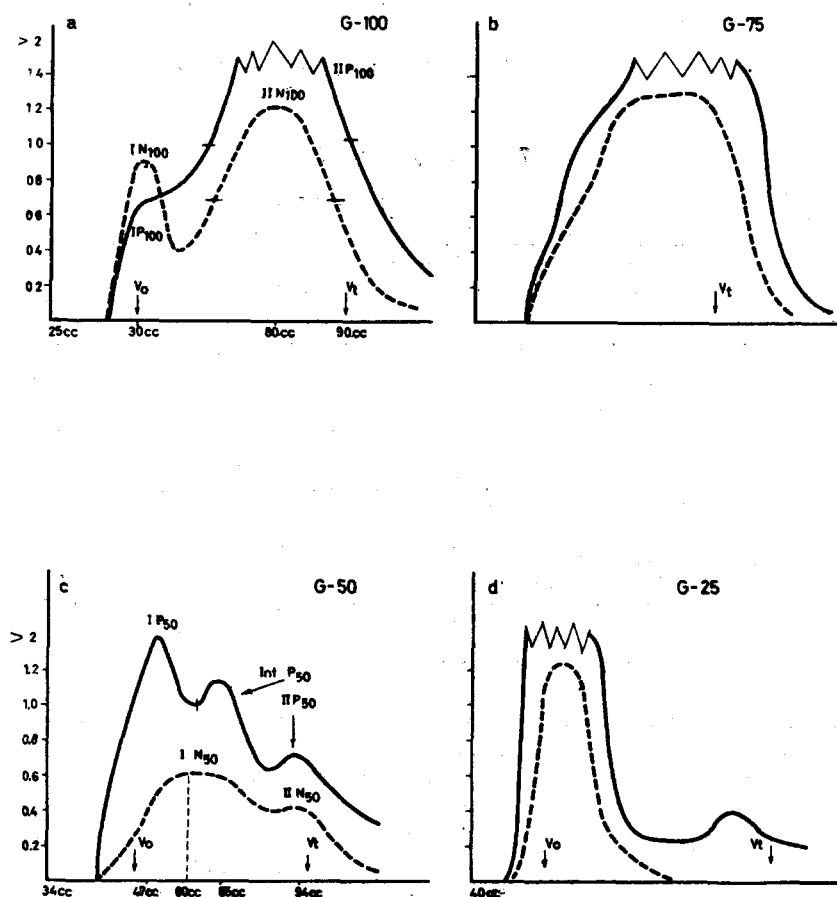


Fig. 1.—Sentido A de refraccionamientos, de G-100 a G-25.

Estas fracciones se pasaron por G-50, distribuyéndose la de HAN en dos fracciones (I N 50 y II N 50) y la de HAP en tres (I P 50, Int P 50 y II P 50) según se observa en la fig. 1c. Las fracciones Int P 50 y II P 50 se pasaron conjuntamente por G-25, obteniéndose dos fracciones bien definidas en el V_0 y V_t de la columna, mientras que la II N 50 sólo presenta una fracción en el V_0 al refraccionarse por G-25 (fig. 1d). En ambos casos se observó una clara absorción al gel G-25 debida probablemente a la existencia en el mismo de grupos COOH libres que lo hacen actuar como un débil cambiador catiónico (Sephadex. Pharmacia Fine Chemicals. Sweden).

Por esta razón, al pasar ambas muestras totales por G-25 (sentido B, figura 2a) se observa una fuerte absorción al gel, quedando la columna irreversiblemente manchada. Aún desconociéndose el verdadero alcance de esta absorción, puede pensarse que afecta a una correcta distribución de las muestras en fracciones. Como se observa en la fig. 2, en este sentido no se mejoró la distribución conseguida en el sentido A, por lo que se eligió éste para la subdivisión de las muestras sin tener en cuenta los geles G-25 y G-75, poco operativos en ambos sentidos.

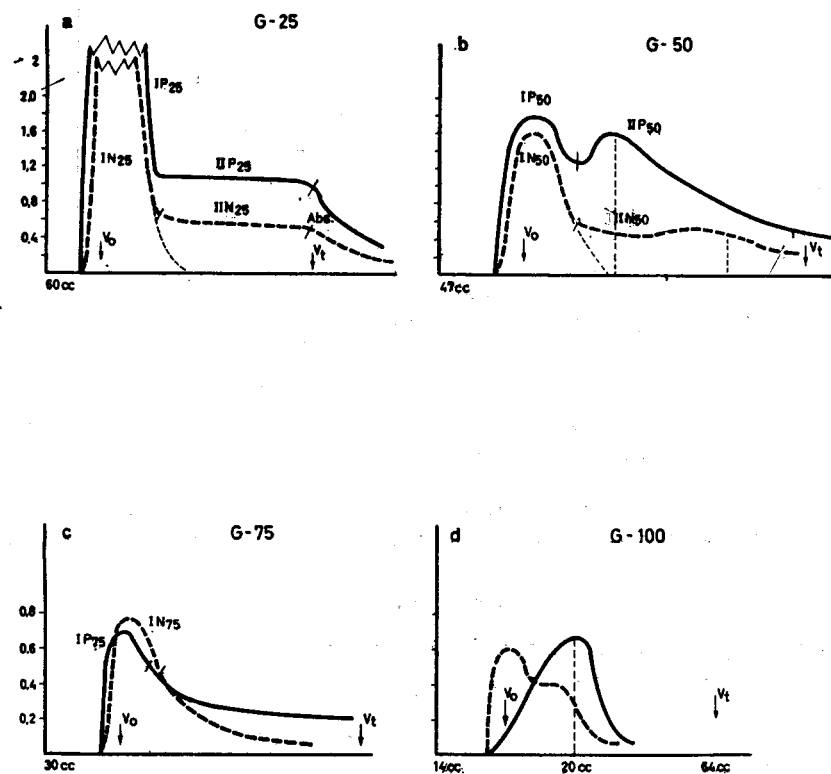


Fig. 2.—Sentido B de refraccionamientos, de G-25 a G-100.

Para la determinación del PM se escogieron tres fracciones de HAN: la excluida por G-100 próxima al V_0 de la columna (I N 100) y las dos obtenidas al refraccionar por G-50 la fracción retenida en G-100 (I N 50 y II N 50). De la muestra de HAP se escogieron asimismo cuatro fracciones: I P 100, I P 50, Int P 50 y II P 50.

Los PM de las fracciones excluidas por G-100 (I N 100 y I P 100), se calcularon interpolando sus respectivos coeficientes de partición (K_{av}) en la curva de calibrado de Sephadex G-100, obtenida por Cameron et al., 1972a con fracciones de HA de PM conocidos, que se muestra en la fig. 3.

Para calcular el M_w de las fracciones obtenidas por G-50 hay que

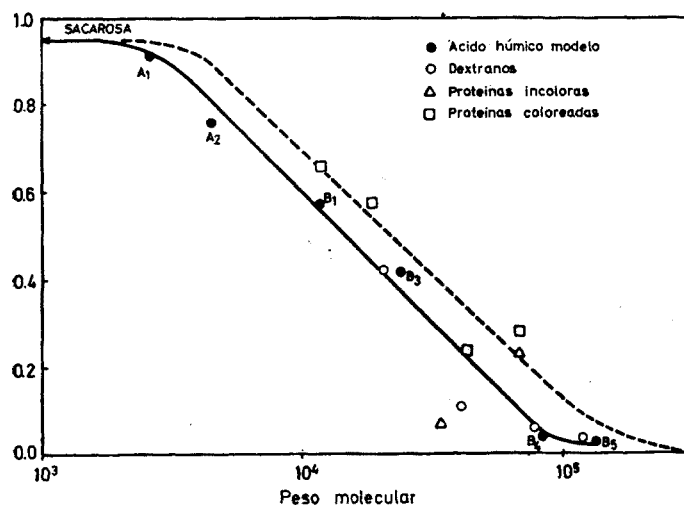


Fig. 3.—Curvas de calibrado de G-100 para ácidos húmicos y otras macromoléculas (Cameron et al., 1972a).

aplicar un factor de corrección al límite de fraccionamientos de dicho gel, toda vez que éste está calculado para proteínas (Determann y Michel, 1966) como se indicó anteriormente. Este factor de corrección se determinó midiendo el Mw de las fracciones obtenidas por G-50 según describe en la parte experimental, a partir de la relación empírica:

$$Mw = f(D_{20, \text{agua}})$$

donde $D_{20, \text{agua}}$ es el coeficiente de difusión en agua a 20° C.

Según Cameron et al., 1972b y comunicación personal, la relación:

$$Mw = 1,4 \times 10^{-8} / (D_{20, \text{agua}})^2 \quad (1)$$

expresando $D_{20, \text{agua}}$ en $\text{cm}^2/\text{seg.}$, resulta válida para valores de Mw comprendidos entre $3,10^3$ y $2,10^5$.

El coeficiente de difusión experimental se obtiene según:

$$D_{\text{exp}} = 0,2749 d^2 / t \quad (2)$$

donde d es la distancia entre dos puntos del gradiente de concentración en cm. y t el tiempo en seg.

Estos parámetros se calcularon a partir de los datos del Microvideomat, presentados en la tabla I y en la fig. 4 para la fracción de HAN.

Como se observa en la fig. 4, se produjo una difusión de 0,35 cm/diez horas, que corresponde a un valor para el coeficiente de difusión experimental, según la expresión (2):

$$D_{\text{exp}} = 0,2749 \cdot 0,35^2 / 33.000 = 9,35 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$$

TABLA I

Cálculo del área media del tono de gris medio para cada 2 mm. de cubeta en la zona de contacto buffer-solución de ácido húmico

Tonos grises	cm. de la cubeta								
	1-1,2	1,2-1,4	1,4-1,6	1,6-1,8	1,8-2	2-2,2	2,2-2,4	2,4-2,6	2,6-2,8
Foto a t - 0 h									
410	6,3	5,9	4,5	0,9	0	0	0	0	0,00
370	9,6	9,6	9,6	9,4	5,0	0	0	0	0
340	9,6	9,6	9,6	9,6	9,2	0	0	0	0
320	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	0,1	0,1	0	0
295	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	1,7	1,7	0	0
Area media del tono de gris medio	8,82	8,73	8,39	7,50	6,27	1,13	0,48	0	0
Foto a t - 10 h									
410	4,6	3,9	2,1	6,7	0	0	0	0	0
370	9,25	9,45	8,35	6,6	1,6	0,01	0	0	0
340	9,5	9,6	9,6	9,45	7,3	1,1	0,1	0,05	0
320	9,55	9,6	9,6	9,6	9,9	5,2	1,20	0,15	0,01
295	9,55	9,55	9,6	9,6	9,6	9,2	7,8	3,5	2,1
Area media del tono de gris medio	8,34	8,22	7,56	6,83	5,12	2,87	1,57	0,63	0,36

Dado que se utilizó una disolución de la muestra en PO_4HK_2 en la parte inferior de la cubeta, con un 10 por 100 de glicerina para conseguir un límite de separación bien definido, es necesario efectuar una corrección de la viscosidad según:

$$D_{20, \text{ agua}} = D_{\text{exp}} \eta T / \eta_{20} \times 293 / T \quad (3)$$

donde

$$\eta T / \eta_{20} = \eta_{\text{ glicerina}} + \text{PO}_4\text{HK}_2 / \eta_{\text{PO}_4\text{HK}_2}$$

Este valor calculado experimentalmente fue de 1,095, que sustituido en (3) nos da un valor para el coeficiente de difusión standard:

$$D_{20, \text{ agua}} = 9,85 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$$

Según la relación (1) la fracción de HAN obtenida por G-50 tiene un Mw de 14,430.

Según el volumen de elución (V_e) de esta fracción el M_w que se obtiene interpolando en la curva de calibrado de G-50 obtenida por Determann y Michel, 1966 con proteínas glóbulares, es de 17.500. Se obtiene así un factor de corrección de $14.430/17.500 = 0,82$ para el límite de fraccionamientos de dicho gel con HA.

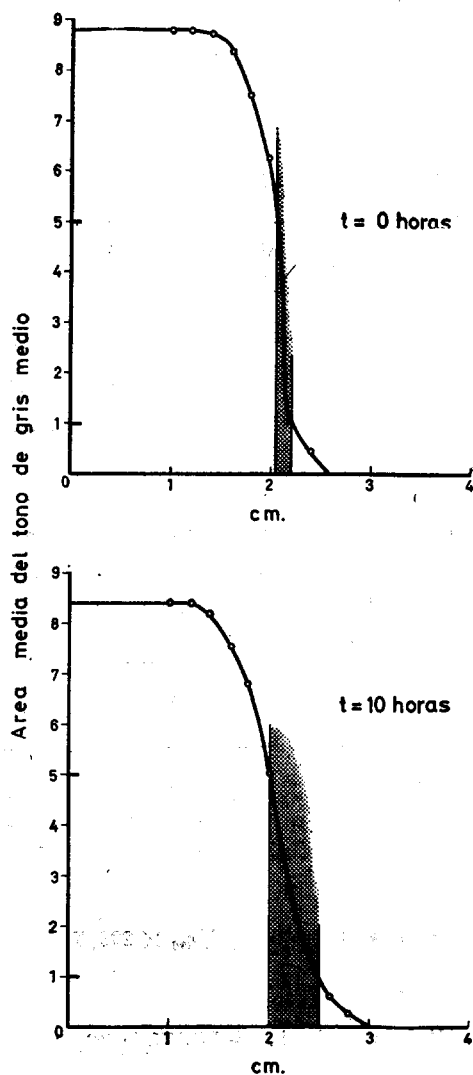


Fig. 4.—Cálculo de la difusión en cm/hora de la fracción retenida en G-50 de HAN.

En la tabla II se presentan los volúmenes de elución y los porcentajes de distribución cuantitativa de cada una de las fracciones, así como los PM de éstas, obtenidos por interpolación en la curva de calibrado.

de G-100 y mediante la corrección obtenida para el fraccionamiento por G-50.

TABLA II

Pesos moleculares y porcentajes de distribución cuantitativa de fracciones de HAN y HAP obtenidas por una secuencia de fraccionamientos

Fracciones	K_{av} obs.	V_0/V_0 obs.	% distribución	PM
IN 100	0,132		20,5	76.000 ^a
IN 50		1,27	50,65	17.311 ^b
4IN 50		2,0	28,84	3.287 ^b
4P 100	0,125		5,02	78.000 ^a
4P 50		1,06	46,48	29.110 ^b
IN+P 50		1,40	30,26	12.983 ^b
IIP 50		1,0	17,53	3.287 ^b

a: interpolados en la curva de Cameron et al., 1972a de la fig. 3.

b: corregidos por el factor 0,82 en la curva de calibrado de G-50 para proteínas de Determann y Michel, 1966.

El PM de ambas muestras, aplicando la expresión:

$$Mw = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

para el PM-promedio ponderal (Tanford, 1960), resultó ser de 52.796 para HAN y de 34.326 para HAP.

La marcada diferencia en Mw entre estos dos HA extraídos del mismo suelo, confirma la gran influencia del agente extractor sobre las características del material extraído, anteriormente señalada por muchos autores (González Vila, 1974).

El resultado concuerda en nuestro caso con lo esperado a la vista de las características físico-químicas y espectroscópicas de ambas muestras (G. Vila et al., 1974). El HAN, según los parámetros usuales en la química del humus (razón E_4/E_6 , relación estadística H/C vs O/C, aromaticidad por oxidación al aire, etc.) es un material más alifático y menos condensado que el HAP. Clásicamente se han relacionado estas propiedades con un menor grado de humificación y por ende menor PM. Sin embargo, investigaciones recientes, apoyadas en la variación de las características espectrales con el PM (Ladd, 1969; Swift et al., 1970), relacionan inversamente el grado de humificación y/o aromaticidad con el PM.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. R. S. Cameron por las sugerencias dadas para la realización del trabajo y al Dr. J. Olmedo por las medidas con el Microvideomat.

RESUMEN

Se propone un método para el cálculo del peso molecular-promedio ponderal (M_w) de ácidos húmicos, basado en el fraccionamiento de los mismos mediante empleo sucesivo de geles de Sephadex de distinto reticulado. El peso molecular de las fracciones se obtiene por interpolación en curvas de calibrado de Sephadex G-100 y G-50. Para el calibrado de G-50 se calcula el peso molecular de fracciones obtenidas por este gel a partir de sus coeficientes de difusión.

*Centro de Edafología y Biología Aplicada del Cuarto.
C. S. I. C. Apartado 1.052. Sevilla.*

BIBLIOGRAFÍA

- CAMERON, R. S., SWIFT, R. S., THORNTON, B. K. and POSNER, A. M. (1972a). Calibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acids. *J. Soil Sci.*, **23**, 342-49.
- CAMERON, R. S., THORNTON, B. K., SWIFT, R. S. and POSNER, A. M. (1972b). Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J. Soil Sci.*, **23**, 394-408.
- DETERMANN, H. and MICHEL, W. (1966). The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins. *J. Chromatog.*, **25** (303-313).
- GONZÁLEZ VILA, F. J., SÁIZ JIMÉNEZ, C. y MARTÍN, F. (1974). Comparative studies of humic acids extracted with alkaline agents. *Agrochimica*, **18**, 164-172.
- GONZÁLEZ VILA, F. J. (1974). Tesis doctoral, Sevilla.
- GONZÁLEZ VILA, F. J. y MARTÍN, F. (1977). Fraccionamiento de ácidos húmicos de Vertisol por geles de Sephadex. Comportamiento según los métodos empleados. *Anal. Edaf. y Agrob.*, **36**, 1113-1124.
- LADD, J. N. (1969). The extinction coefficients of soil humic acids fractionated by «Sephadex» Gel Filtration. *Soil Sci.*, **107**, 303-306.
- ORLOV, D. S. (1972). Modern chemical and physical techniques for studying the nature and structure of soil humic substances. *Soviet Soil Sci.*, **7**, 461-467.
- SCHNITZER, M. y DESJARDINS, J. G. (1962). Molecular and equivalent weights of the Organic Matter of a Podsol. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **26**, 362-365.
- SCHNITZER, M. y KHAN, S. U. (1972). Humic substances in the environment. Marcel Dekker, New York.
- SWIFT, R. S., THORNTON, B. K. y POSNER, A. M. (1970). Spectral characteristics of a humic acid fractionated with respect to molecular weight using an agar gel. *Soil Sci.*, **110**, 93-99.
- SWIFT, R. S. y POSNER, A. M. (1971). Gel chromatography of humic acids. *J. Soil Sci.*, **22**, 237-249.
- TANFORD, C. (1961). Physical Chemistry of Macromolecules. John Wiley and Sons Inc. New York.
- WERSHAW, R. L., HELLER, S. J. y PINCKNEY, D. J. (1970). Measurements of the molecular size of a sodium humate fraction. *Advances in R-Ray Analysis*. Vol. 13, 609-617.

Recibido para publicación: 7-IX-77