

Capítulo 3

Caracterización de las sustancias húmicas.

3.1.- Espectroscopia UV-visible. Análisis espectrales.

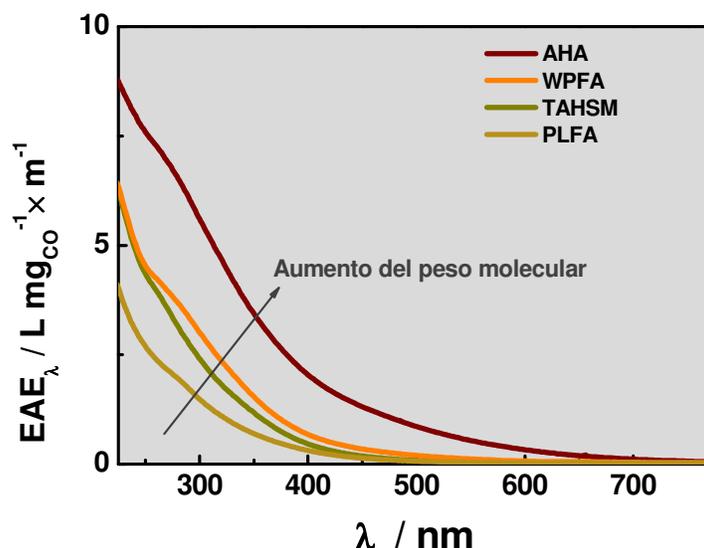
Los espectros de absorción UV-Vis de todas las muestras de SH no presentan estructura y como se observa normalmente para este tipo de materiales, muestran una disminución continua de la absorbancia con el aumento de la longitud de onda [1,2,3,4]. Para una comparación espectral cuantitativa, el espectro UV-vis (A_λ) de diferentes SH se normalizó teniendo en cuenta el contenido de COT, utilizando la ecuación 3.1 y se presenta en la figura 3.1 como espectro de absorción específica (EAE_λ):

$$EAE_\lambda = \frac{A_\lambda}{COT \times C_{HS} \times b} \times 10 \quad 3.1$$

donde, A_λ es la absorbancia a la longitud de onda λ ; COT es el porcentaje de carbono orgánico total

expresado en %p/p; C_{SH} es la concentración de SH en $g \times L^{-1}$ y, b el camino óptico en cm. Por lo tanto, EAE_λ se expresa en: $L \times (m \times mgCO)^{-1}$. A pesar de la falta de máximos de absorción, la relación de absorbancia a 465 y 665 nm (relación E4/E6) ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de las SH, siendo en general más elevados sus valores para AF que para AH [5]. También es de esperar una disminución en la relación E4/E6 con el aumento de la condensación molecular de las SH, debido a la mayor capacidad de absorción en la región de las longitudes de onda correspondientes al rojo en el espectro visible [6]. La tabla 3.1 muestra los valores de E4/E6 calculados a pH 7 para todas las muestras, los cuales presentan la siguiente tendencia: TAHSM > PLFA > WPFA > AHA. El orden observado se asocia con el incremento en la condensación molecular y la

Figura 3.1.- Espectros de absorción específica (EAE_{λ}) normalizados por mg de carbono orgánico (COT) para diferentes SH en solución acuosa a pH 7.



aromaticidad, las que son proporcionales al grado de humificación y maduración de las SH [3, 7].

La tabla 3.1 muestra también los valores de absorción específica a 254 nm ($SUVA_{254}$) [8] calculados con la ecuación 3.1. Adicionalmente, de la corrección de la absorción específica a 280 nm por el factor de 120, se obtiene la absortividad molar a 280 nm por mol de carbono orgánico (ϵ_{280} [=] $L \times mol_{CO}^{-1} \times cm^{-1}$). Estos parámetros están relacionados con el número de dobles enlaces C=C o aromaticidad (hibridación sp^2) que contienen las SH [7].

Los valores más altos de $SUVA_{254}$ y ϵ_{280} fueron obtenidos para la muestra de

AHA, lo que indica que este AH contiene un alto grado de aromaticidad y dobles enlaces conjugados en su estructura, tal como se esperaba para un material extraído de turba. Además, se ha demostrado que el ϵ_{280} se relaciona en forma lineal con el peso molecular (PM) de los ácidos fúlvicos acuáticos a través de la ecuación 3.2 [7]:

$$PM = 3,99\epsilon_{280} + 490 \quad \mathbf{3.2}$$

Para la mayoría de las SH provenientes de fuentes acuáticas o de suelos es de esperar que tengan coeficientes de extinción molar y pesos moleculares dentro de los límites de

esta relación y, la ecuación 3.2 puede ser utilizada cuidadosamente para estimaciones del peso molecular de las SH en ausencia de otras interferencias químicas (por ejemplo, óxidos metálicos, colorantes, etc.). La tabla 3.1 muestra los pesos moleculares calculados utilizando la ecuación 3.2 para las muestras de SH y se observa que el peso molecular aparente estimado de 3614 D para el AHA, se encuentra en concordancia con los valores reportados de 4100 D y 3070 D, determinados por cromatografía de alta presión de exclusión por tamaño (HPSEC) [7] y fraccionamiento de flujo de campo (FFF) [9].

Del ajuste del espectro de absorción UV con la ecuación 3.3 puede obtenerse información adicional

relacionada al grado y tipo de grupos sustituyentes cromóforos bencenoides de las SH en solución, suponiendo que la absorción UV de estas macromoléculas de SH está compuesta por tres tipos de bandas de Gauss [2]. Estas bandas se denominan localmente excitada (LE), bencenoide (BZ) y de transferencia de electrones (ET), las cuales se centran alrededor de 180, 205 y 250 nm, respectivamente.

$$A = \sum_i A_{0,i} \exp \left[- \left(\frac{2(\ln 2)^{1/2} (E - E_{0,i})}{\Delta A_{0,i}} \right)^2 \right] \quad \mathbf{3.3}$$

En la ecuación 3.3, A representa la absorbancia total, el sufijo i identifica

Tabla 3.1: Propiedades fisicoquímicas y de absorción UV-Vis para SH en medio acuoso a pH 7.

| Sustancia húmica^a | COT % | A_{0,ET}/A_{0,Bz} | E4/E6 | SUVA₂₅₄ L (m. mgco)⁻¹ | ε₂₈₀ L. (cm.molco)⁻¹ | PM^c (Dalton) |
|-------------------------------------|-------------------|--|--------------|--|---|------------------------------------|
| PLFA | 52,5 ^b | 0,11 | 10,51 | 2,56 | 235 | 1472 |
| WPFA | 53,6 ^b | 0,16 | 8,89 | 4,40 | 442 | 2605 |
| TAHSM | 52,4 | 0,23 | 11,25 | 4,19 | 377 | 1995 |
| AHA | 44,1 | 1,04 | 6,81 | 7,45 | 783 | 3614 |

^a Abreviaturas de las sustancias húmicas: (PLFA) ácido fúlvico Pony Lake; (WPFA) ácido fúlvico Waskish Peat; (TAHSM) SH del “tipo AH” de sedimento marino y (AHA) ácido húmico Aldrich.

^b Valores reportados en <http://www.ihss.gatech.edu/elements.html>

^c PM calculados con la ecuación 3.2

a las bandas LE, Bz o ET; $A_{0,i}$, $E_{0,i}$ y $\Delta A_{0,i}$ son la absorbancia, la energía en el máximo al cual está centrada la banda y el ancho medio de la banda, respectivamente. Estos parámetros se pueden calcular ajustando los espectros de absorción utilizando la ecuación 3.3 en el rango entre 200 y 400 nm.

Es interesante, que la intensidad (A_0) de la banda ET se ve fuertemente afectada por la presencia de grupos funcionales polares en el anillo bencénico, mientras que la banda benzoide (Bz) prácticamente no es influenciada. Como resultado, la relación $A_{0,ET}/A_{0,Bz}$ calculada para compuestos modelo se incrementa de 0,03 (para el anillo bencénico) a 0,25-0,35 para compuestos fenólicos y aproximadamente 0,4 para anillos aromáticos con grupos carbonilos y carboxílicos [10]. Por lo tanto, este

parámetro puede ser una herramienta útil para una caracterización comparativa del grado de sustitución de los cromóforos aromáticos en las SH en solución. Morán y col., reportaron que durante el compostaje de residuos domiciliarios la relación $A_{0,ET}/A_{0,Bz}$ se incrementó rápidamente hasta tomar valores correspondientes a grupos carboxílicos aromáticos [3].

En el presente trabajo, se obtuvo un ajuste satisfactorio de los espectros, a través de la utilización de la ecuación 3.3, para la contribución de las bandas Bz y ET solamente, ya que la banda LE se desplaza hacia la región del UV-lejano por debajo de 200 nm. Los valores de $A_{0,ET}/A_{0,Bz}$ calculados para diferentes SH se presentan en la tabla 3.1. Para ambos AF y para la muestra de TAHSM de sedimento marino, se obtuvieron valores de $A_{0,ET}/A_{0,Bz} < 0,25$, lo que implica baja

Tabla 3.2: Propiedades de fluorescencia de diferentes SH estudiados en solución acuosa a pH 7.

| SH | Excitación 360 nm | | Excitación 450 nm | | ATMM (cm ⁻¹) | | PLEE (nm) ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$) | | Relación α' / α |
|--------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|--------------------------|------------------------|--|----------|-----------------------------|
| | $\Phi_F \times 10^3$ | λ_F (nm) | $\Phi_F \times 10^3$ | λ_F (nm) | λ_{exc} 360 nm | λ_{exc} 450 nm | α' | α | |
| PLFA | 11,35 | 463 | 9,96 | 525 | 6127 | 4638 | 260/467 | 365/463 | 1,54 |
| WPFA | 5,19 | 475 | 4,30 | 527 | 6022 | 4669 | 295/358 | 340/468 | 1,97 |
| TAHSM | 6,41 | 460 | 5,77 | 520 | 7026 | 3914 | 350/460 | 365/520 | 2,12 |
| AHA | 1,81 | 495 | 2,46 | 525 | 6013 | 4220 | 280/495 | 360/500 | 3,11 |

complejidad molecular y/o grado de oxidación. El mayor valor de $A_{0,ET}/A_{0,BZ} = 1,04$ se obtuvo para el AH extraído de turba (AHA), el cual es un típico ejemplo de ácidos húmicos de suelo con alto grado de desarrollo y humificación, y por lo tanto con un gran contenido de cromóforos altamente oxidados [11].

3.2.- Espectroscopia de fluorescencia. Rendimientos cuánticos. Matrices de excitación-emisión

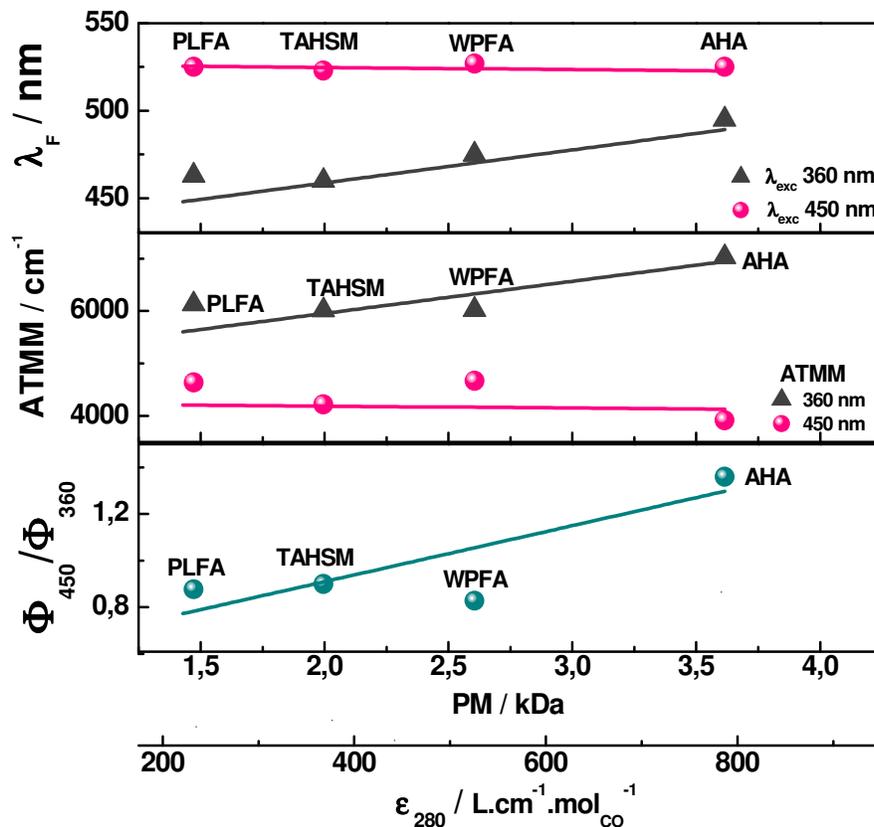
Algunos parámetros de fluorescencia que se muestran en la tabla 3.2 como máximos de emisión de fluorescencia (λ_F), rendimientos cuánticos (Φ_F^λ) y el ancho total a la mitad del máximo de la banda (ATMM) son independientes de la concentración de SH en el rango de (5-40) $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$. Sin embargo, estos parámetros dependen de la longitud de onda de excitación y de la naturaleza de la SH, lo que indica diferencias en los cromóforos presentes en estos materiales. En particular, el valor de Φ_F más alto se obtuvo para el ácido fúlvico PLFA, de composición menos compleja y menor tamaño molecular [4].

La figura 3.2 muestra la variación de estos parámetros en función del peso

molecular de las SH calculados con la ecuación 3.2.

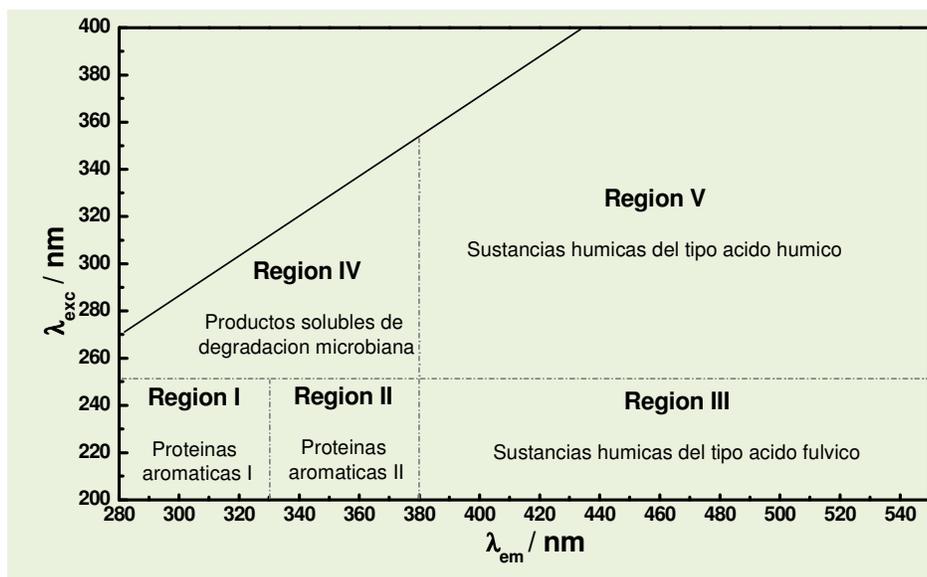
Un resultado interesante es el aumento monotónico de λ_F y ATMM con el tamaño molecular para $\lambda_{exc} = 360$ nm. En contraste estos parámetros son independientes del PM para $\lambda_{exc} = 450$ nm. Por otra parte, la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_F^{450}/\Phi_F^{360}$) aumenta de un valor de 0,88 a 1,36 con el peso molecular. Este comportamiento fue explicado para AH por Moran y col. [3] en función de la naturaleza multicromofórica y compleja de los mismos. Estos autores proponen que para las SH en general, puede esperarse la existencia de un *cuasi*-continuo solapamiento de bandas de absorción y emisión entre los cromóforos permitiendo procesos de transferencia de energía resonante (*resonance energy-transfer*) o migración de la energía de excitación [12]. Teniendo en cuenta la proximidad de los diferentes cromóforos en las SH ($< 10 \text{ \AA}$), puede esperarse un efectivo solapamiento orbital entre las moléculas donantes y receptoras de energía, siendo el intercambio de electrones o de interacción de cargas resonantes el mecanismo más probable de transferencia de energía [13].

Figura 3.2.- Dependencia con el peso molecular (PM) de las diferentes SH en solución acuosa a pH 7: A) del máximo de emisión (λ_F); B) del ancho total a la mitad del máximo de la banda (ATMM) y; C) de la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por excitación a 450 y 360 nm (Φ_{450}/Φ_{360}).



Esto a su vez, concuerda con lo publicado recientemente por Del Vecchio y col. [14,15] para ácidos húmicos y fúlvicos acuáticos. Estos autores propusieron que las propiedades ópticas de las SH disueltas surgen de la absorción y emisión aproximadamente continua desde estados de transferencia de carga intramoleculares formados por grupos donores, por ejemplo, grupos aromáticos polihidroxilados, indoles, etc. y grupos aceptores más oxidados

(por ejemplo, otros aromáticos oxidados o quinonas) [14,15]. Los cambios observados en los parámetros de fluorescencia se pueden explicar teniendo en cuenta el mismo modelo propuesto, en el cual la densidad de grupos más oxidados se incrementa con el grado de humificación y / o el tamaño molecular, lo cual favorece la migración intramolecular de la energía de excitación a los estados emisores de menor energía.

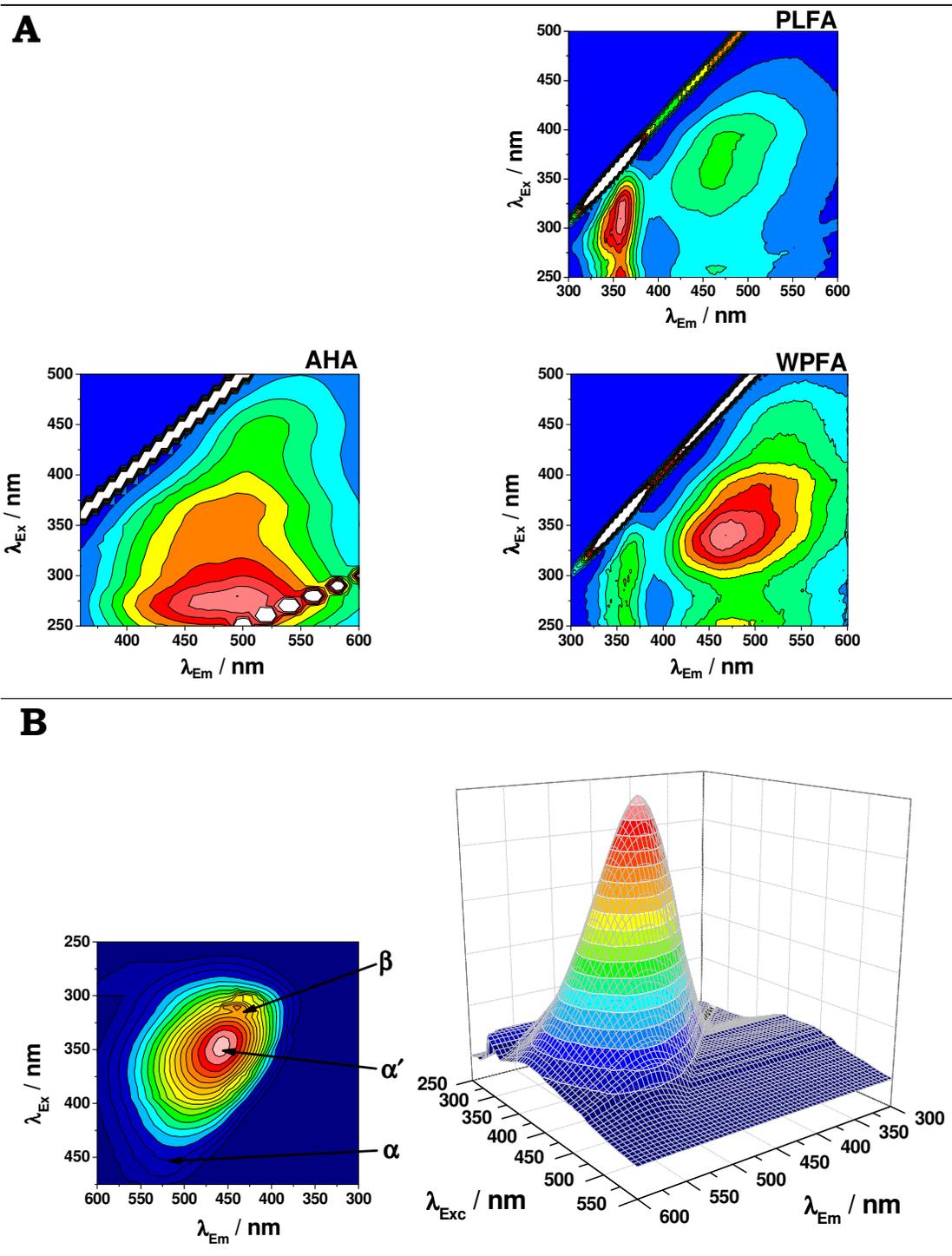
Figura 3.3.- Regiones de las MEE

El análisis de las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEE) de las SH también proporciona información interesante. Las MEE pueden dividirse en 5 regiones (figura 3.3). Los picos en cada región han sido asignados por diferentes autores a compuestos orgánicos del tipo húmicos, fúlvicos, tirosínicos, triptofánicos o fenólicos, [16,17,18]. En general, picos a longitudes de onda de excitación cortas (< 250 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (< 350 nm) se asocian al aminoácido tirosina y a proteínas simples con alto contenido de este tipo de aminoácidos aromáticos (Regiones I y II) [19,20]. Picos correspondientes a longitudes de onda de excitación corta (< 250 nm) y a mayores longitudes de onda de emisión se relacionan con los ácidos

fúlvicos (Región III) [21]. Los picos que corresponden a longitudes de onda de excitación intermedias (250-280 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (< 380 nm) están relacionados a productos solubles de degradación microbiana (Región IV) [18,19]. Picos a longitudes de onda de excitación más largas (> 280 nm) y también longitudes de onda de emisión más largas (> 380 nm) están relacionados con la presencia de ácidos húmicos (Región V) [22,23,24].

La figura 3.4 muestra las MEE con valores de intensidad normalizados para las muestras en estudio. Se puede observar la evolución progresiva de la “huella digital” de fluorescencia con el tamaño de las macromoléculas. Las matrices correspondientes a los AF (PLFA y WPFA) en la figura 3.4 A

Figura 3.4.- Matrices de excitación-emisión con intensidades normalizadas para diferentes SH comerciales (**A**) y para las SH “tipo AH” de sedimento marino (**B**) en solución acuosa a pH 7.



muestran que la principal fluorescencia se enmarca en las regiones IV, I y II que corresponden a productos solubles del metabolismo microbiano y a proteínas aromáticas, respectivamente. Según esta clasificación se esperaría que estas muestras presenten picos en la región III, pero no fueron observados aquí. El AHA muestra fluorescencia en todas las zonas (incluidas las zonas III y V, correspondientes a los ácidos fúlvicos y húmicos respectivamente). Por otro lado, Sierra y col. en un estudio mucho más reciente analizaron las MEE de un gran número de SH de diferentes orígenes. Según este análisis, las MEE contienen por lo menos cuatro pares de longitudes de onda de excitación/emisión relacionados a los fluoróforos α' , α , β y γ (o δ). Estos autores encontraron que los picos α' y α , son característicos de componentes del tipo húmico y están presentes en todas las muestras independientemente de su origen. Para las muestras de AF estos pares se presentan a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de ~ 260 nm/460 nm y ~ 310 nm/440 nm, respectivamente. Para las muestras de AH estos picos están corridos al rojo $\alpha' = 265$ nm/525 nm y $\alpha = 360$ nm/520 nm. El fluoróforo β ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 320$ nm/430 nm) está solo presente en algunas muestras marinas y de estuarios. Se presenta como un

hombro en el pico α y su detección depende de la intensidad de emisión del pico α [25].

El pico γ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 270 nm /330 nm) también es característico para muestras marinas [26] y se atribuye a material orgánico fresco liberado por organismos marinos y/o algas al “pool” de materia orgánica disuelta como resultado de la actividad biológica.

Las sustancias húmicas WPFA y AHA presentan, como es de esperar, los picos α' y α y no los β y γ .

Los picos α' de WPFA y PLFA se encuentran a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 365 nm / 463 nm y 340 nm /468 nm, respectivamente, y corresponden a máximos característicos para AF.

La MEE para la muestra de PLFA es la única que presentó el pico γ a 240 nm /360 nm. Este ácido fúlvico se forma por completo a partir de biomasa que no contiene lignina. Como tal, se espera que su composición química sea la propia de ácidos fúlvicos acuáticos, con una contribución insignificante de materia orgánica terrestre.

La MEE para TAHSM (Figura 3.4 B) muestra la presencia: del pico principal α' a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 350 nm / 460 nm propio de componentes del tipo ácido fúlvico; del pico α típico para componentes del tipo ácido húmico a 365 nm/520 nm y un pico β

Tabla 3.3: Acidez total, grupos carboxílicos (COOH), grupos fenólicos (PhOH) (en meq/g de carbono orgánico) para diferentes SH.

| Sustancia húmica | Acidez total (meq×g _{CO} ⁻¹) | COOH (meq×g _{CO} ⁻¹) | % COOH | PhOH (meq×g _{CO} ⁻¹) | % PhOH |
|------------------|---|---|--------|---|--------|
| PLFA | 16,40 | 13,15 | 80,18 | 3,25 | 19,82 |
| TAHSM | 14,87 | 11,89 | 79,96 | 2,98 | 20,04 |
| WPHA | 13,17 | 9,31 | 70,69 | 3,86 | 29,31 |
| AHA | 10,61 | 8,09 | 76,25 | 2,52 | 23,75 |

a 310 nm / 440 nm. La ausencia del pico γ indica un avanzado estado de degradación.

La intensidad relativa para los picos α y α' ha sido empleada para diferenciar la materia orgánica fluorescente proveniente de fuentes terrestres de la originada en ambientes marinos, siendo los valores más altos los correspondientes a fuentes de agua de mar abierto, debido a la menor contribución del fluoróforo α en esos ambientes [27, 28, 29]. También es de esperar que para AH se obtengan valores más altos de α'/α que para AF. Para la muestra del TAHSM se obtiene un alto valor de la relación α'/α (2,12) de acuerdo con la alta contribución de los componentes del tipo húmico, como es de esperar para el procedimiento utilizado en la extracción.

3.3.- Determinación de grupos carboxílicos y fenólicos por titulación.

Los valores de acidez total y grupos carboxílicos para las muestras de TAHSM y SH comerciales se muestran en la tabla 3.3.

Se ha sugerido que la región de 300-350 nm en el espectro de excitación se debe a la presencia de cromóforos con alto contenido de grupos carboxílicos, mientras que las estructuras que contienen grupos fenólicos se ubican entre 350 y 400 nm [30]. Ambas bandas de excitación se observan en la MEE tanto de TAHSM como de las SH comerciales, de acuerdo con el alto contenido de grupos carboxílicos, así como de grupos fenólicos.

El contenido de grupos carboxílicos por gramo de carbono orgánico (expresado como meq × g_{CO}⁻¹)

correspondiente al TAHSM es mayor que el informado para WPHA (IHSS), de diferentes orígenes, incluidas las SH que se extraen de las aguas de estuarios [31] y se asemeja más a los valores obtenidos para los ácidos fúlvicos (IHSS, [31]), a pesar de que se empleó para su extracción un método para ácidos húmicos. Este resultado está de acuerdo con el componente ácido fúlvico observado en la MEE y con el bajo peso molecular de la muestra de TAHSM.

3.4.- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

En la figura 3.5 se muestran los espectros de absorción IR obtenidos para las muestras de sustancias húmicas comerciales y extraídas.

En la tabla 3.4 se resumen las principales bandas de absorción IR de las SH y la asignación de las mismas a diferentes grupos funcionales [32,33, 34,35].

La banda de absorción IR más importante en todas las muestras analizadas es la que se centra alrededor de los 3400 cm^{-1} y corresponde al estiramiento del enlace O-H de los grupos alcohol alifático, fenol o ácido carboxílico [32]. Las bandas a 2920 y 2850 cm^{-1} [32, 33] son características de los estiramientos de los enlaces C-H. La

absorción a 1720 cm^{-1} se asigna al estiramiento del enlace C=O de los grupos COOH. Las bandas que aparecen entre 1600 y 1650 cm^{-1} son debidas al estiramiento del enlace C=O en carboxilatos, cetonas y ácidos carboxílicos. El pico a 1400 cm^{-1} es debido al bending del enlace C-H alifático y al estiramiento asimétrico del COO⁻. Las bandas en 1511 y 1540 cm^{-1} son debidas al estiramiento del enlace C=C y a deformaciones del enlace N-H.

Las relaciones entre los principales picos de FTIR para ácidos húmicos son indicativas de los grados de aromaticidad y policondensación [34]. Los valores del grado de aromaticidad (relaciones de absorbancia $1650/2920$ y $1650/2850$) y del grado de policondensación ($1034/2920$, $1034/2850$ y $1034/1540$) para diferentes muestras de SH se muestran en la tabla 3.5.

La secuencia del grado de aromaticidad obtenida a partir de los espectros de FTIR es PFHA > AHA \approx AP \approx SSHA > VCHA. La figura 3.6 muestra el esperado incremento del grado de policondensación con la disminución de la relación E4/E6. La figura 3.6 también muestra una correlación positiva de la policondensación con la aromaticidad y el número de grupos carboxílicos en las muestras.

La comparación de los espectros FTIR de las muestras de ácido húmico Aldrich purificado (AP) y no purificado (AHA) muestra que las bandas más afectadas por el proceso de purificación son en torno a 1400 y 1720 cm^{-1} . La disminución de la absorción a estas longitudes de onda para la muestra de

Tabla 3.4: Bandas de IR y su asignación.

| Número de onda (cm^{-1}) | Asignación de la banda |
|-------------------------------------|---|
| 775- 975 | <i>Bending</i> fuera del plano del C-H aromático |
| 1030- 1080 | Estiramiento C-O-C de éteres aromáticos, carbohidratos y polisacáridos |
| 1170 | Vibraciones del grupo alcohol |
| 1200- 1260 | Estiramiento C-OH de grupos aromáticos y estiramiento C-O-C de éteres arílicos y fenoles |
| 1380-1400 | Deformación de los O-H, estiramiento C=O de fenoles, estiramiento anti-simétrico COO ⁻ y deformación C-H en alifáticos |
| 1440- 1460 | Deformación C-H alifáticos en ácidos grasos y grasas durante el proceso de compostaje |
| 1510- 1540 | Estiramiento C-C de aromáticos, deformaciones N-H |
| 1580 | Estiramiento C=N en amidas secundarias |
| 1640- 1654 | Estiramiento C=C de aromáticos, estiramiento C=O en quinonas, ácidos cetónicos y amidas primarias |
| 2680- 2685 | Estiramiento de OH con puentes de H |
| 2840 | Estiramiento asimétrico C-H de -CH ₃ y -CH ₂ - en cadenas alifáticas |
| 2925 | Estiramiento C-H alifático (simétrico y asimétrico) de -CH ₃ y -CH ₂ - |
| 3300- 3500 | Vibraciones de los grupos O-H de fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos y vibraciones de los N-H de amidas y aminas |

Figura 3.5.- Espectros FTIR para sustancias húmicas.

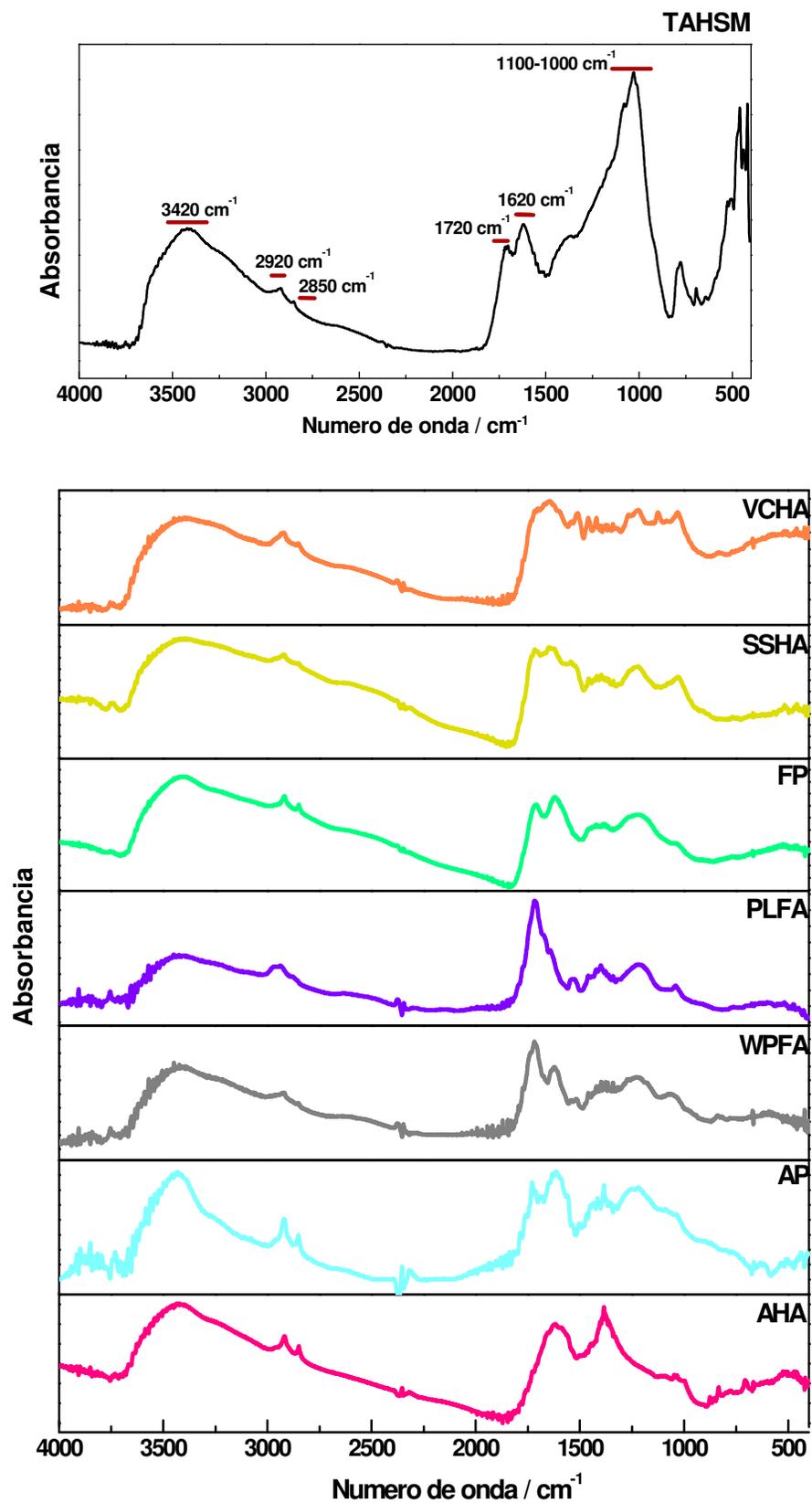
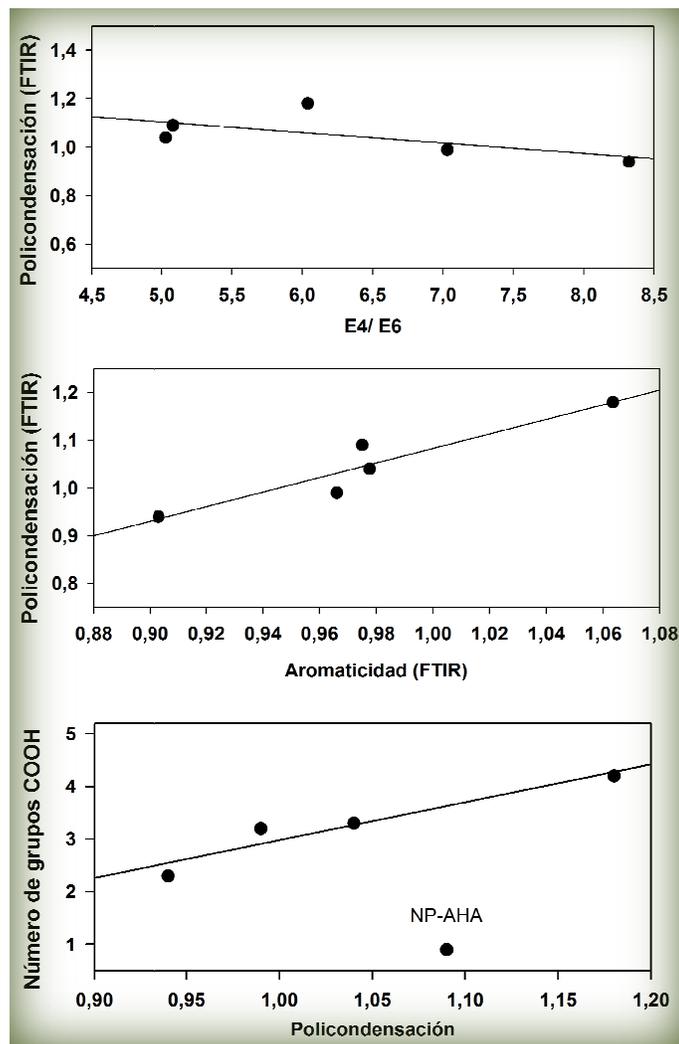


Tabla 3.5: Resultados de espectroscopia FTIR para ácidos húmicos.

| Ácido Húmico | 1650/2920 C=O(COO-) /C-H | 1650/2850 C=O(COO-) /C-H | 1720/2920 C=O(COOH) /C-H | 1511* /2920 | 1650 /1540* | 1034/2920 C-O-C /C-H | 1034/2850 C-O-C /C-H | 1034 /1540* |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------|
| AHA | 1,0111 | 0,9926 | 0,8842 | 0,9364 | 1,0607 | 1,1601 | 0,8556 | 0,9142 |
| AP | 1,6032 | 2,1986 | 1,6025 | 0,9230 | 0,1764 | 1,4964 | 1,4692 | 0,1179 |
| FP | 0,9944 | 1,0343 | 0,9609 | 0,8193 | 1,1677 | 1,2569 | 0,8229 | 0,9290 |
| SSAH | 1,0191 | 1,0423 | 1,0135 | 0,9598 | 1,0387 | 1,0824 | 0,9629 | 0,9596 |
| VCAH | 1,1109 | 1,1538 | 1,0764 | 1,0680 | 1,0698 | 1,0373 | 1,1122 | 1,0313 |

* Las bandas a 1511 y 1540 cm^{-1} se deben a estiramiento de enlaces C=C y / o deformación N-H.

Figura 3.6.- Correlación para la policondensación con la relación E4/E6, la aromaticidad y el número de grupos carboxílicos en las muestras.



AP indica una menor cantidad de grupos COOH. Sin embargo, el contenido de grupos COO⁻ es mayor en los AP. Esto puede deberse a que las muestras se obtuvieron por precipitación de soluciones a diferentes pH. Para una mejor comparación de los espectros de FTIR los sólidos se deben obtener a partir de soluciones del mismo pH. El AP fue purificado según metodología descrita en literatura [36]. En esta purificación se remueven las trazas de iones metálicos, el material inorgánico y el material orgánico distinto del ácido húmico. Se puede observar claramente que la banda en torno a 900-400 cm⁻¹ debida a impurezas inorgánicas es más intensa para AHA que para AP. Por otro lado AP presenta bandas más intensas: **(a)** alrededor de 1200 cm⁻¹ debido a amidas III o éteres aromáticos **(b)** una banda ancha en 1100-1000 cm⁻¹ característica de éteres aromáticos, polisacáridos, **(c)** dos picos a 500 cm⁻¹ debidos a la doble sustitución del anillo aromático [34]. Todas ellas dan indicio de que durante el proceso de purificación se incrementa el grado de oxidación y / o sustitución en las moléculas del AH.

3.5.- Seguimiento del proceso de compostaje.

La figura 3.7 muestra los espectros de absorción UV-Vis de todas las

muestras de SH del “tipo AH” extraídas a diferentes tiempos del proceso de compostaje. A pesar de la falta de máximos de absorción de la inspección de la derivada primera de los espectros normalizados por mg de carbono orgánico se pueden detectar claramente los puntos de inflexión. Estos picos bien definidos en los espectros de absorción derivados, a 290 y 330 nm para la primera derivada, se encontraron como potenciales índices para la caracterización del proceso de compostaje, ya que muestran tener una marcada dependencia con el tiempo de compostaje.

Adicionalmente, la relación E4/E6 ha sido utilizada en la caracterización del proceso de compostaje y se reporta en la tabla 3.6. Se observó una disminución de la relación E4/E6 con la extensión del tiempo de compostaje. El menor valor anómalo de E4/E6 observado para la muestra de compost de 1 día puede estar relacionado a las impurezas que absorben luz roja y que siguen presentes en la mezcla de compost durante la fase de mineralización (< 60-75 días).

En la figura 3.8 se observa que en este proceso de mineralización la pérdida de carbono orgánico total (COT) es de aproximadamente un 10 % en los últimos 175 días (a partir del máximo en la curva de la figura 3.8). El

aparente incremento en la cantidad de carbono orgánico total durante los primeros 30 días de compostaje se debe a la gran pérdida de humedad de las muestras, ya que durante ese período se experimenta la etapa termófila.

Para las muestras de compost de esta tesis, tanto el $SUVA_{254}$ como el ϵ_{280} (tabla 3.6) aumentan con el tiempo de compostaje lo que indica un aumento en el grado de aromaticidad y dobles enlaces conjugados en su estructura.

Figura 3.7.- Espectros de absorción UV-Vis normalizados por mg de carbono orgánico total (COT) para AH extraídos a diferentes tiempos de compostaje (1, 15, 30, 97, 137, 170 y 205 días) en solución acuosa a pH 7.

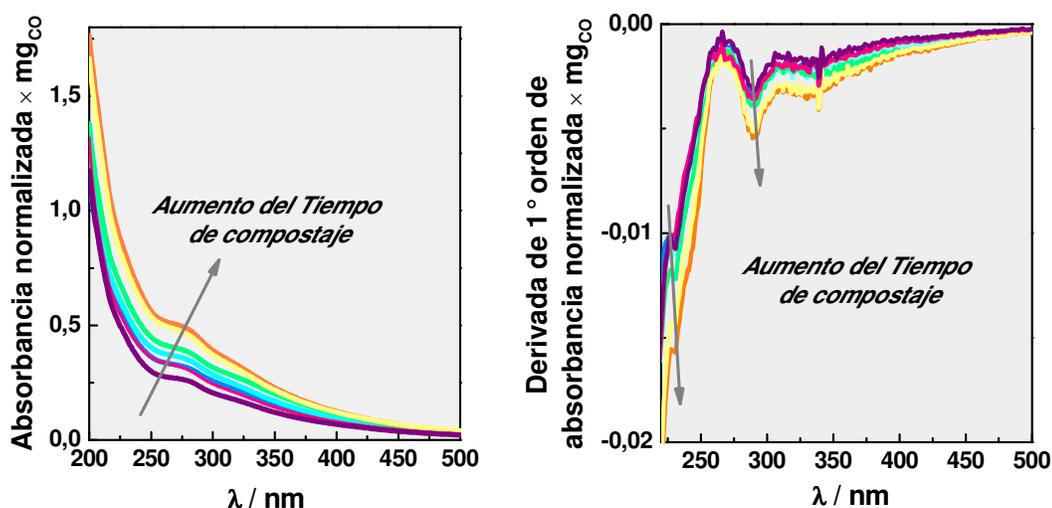
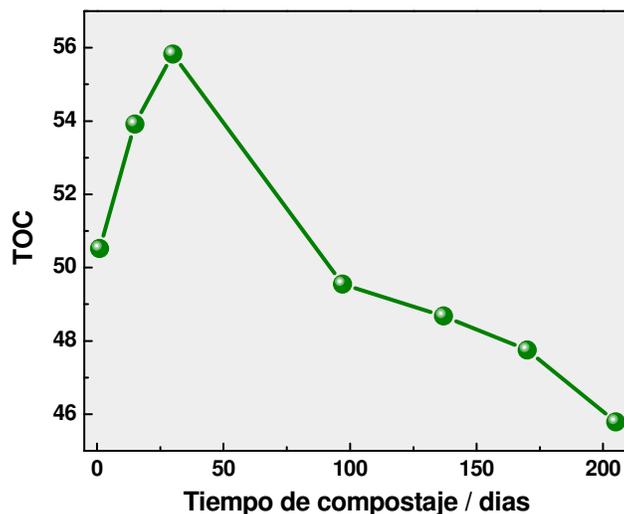


Tabla 3.6: Propiedades fisicoquímicas y de absorción UV-Vis para AH extraídos a diferentes tiempos de compostaje en medio acuoso a pH 7.

| Tiempo de Compostaje (Días) | COT % | E4/E6 | $SUVA_{254}$ $L.(m.mg_{CO})^{-1}$ | ϵ_{280} $L.(cm.mol_{CO})^{-1}$ | PM (Dalton) |
|-----------------------------|-------|-------|--------------------------------------|--|-------------|
| 1 | 50,5 | 8,64 | 2,85 | 307 | 1717 |
| 15 | 53,9 | 9,06 | 3,66 | 355 | 1908 |
| 30 | 55,8 | 9,25 | 4,01 | 380 | 2007 |
| 97 | 49,5 | 8,55 | 3,53 | 394 | 2063 |
| 137 | 48,7 | 8,45 | 3,51 | 431 | 2209 |
| 170 | 47,7 | 7,21 | 5,01 | 538 | 2636 |
| 205 | 45,8 | 6,84 | 5,70 | 615 | 2946 |

Figura 3.8.- Cambios en el contenido de carbono orgánico total con el tiempo de compostaje.



Los materiales de tiempos cortos de compostaje muestran valores de PM similares a las muestras de AF conforme a sus cortos periodos de formación y a sus grados de condensación y humificación más bajos, pero a medida que el proceso se prolonga se observan valores de PM más cercanos al de AH.

3.6.- Conclusiones

Los resultados espectroscópicos proveen evidencia de que ocurre una progresiva mineralización y humificación durante el compostaje de residuos frutihortícola. En este sentido, la relación E4/E6 puede ser

usada para monitorear la evolución de las sustancias húmicas.

La variación del rendimiento cuántico de fluorescencia de las SH con el tipo de muestra es útil para monitorear el grado de oxidación de los grupos sustituyentes, estos se modifican por la incorporación de grupos donantes de electrones, como los grupos fenólicos, ó aceptores de electrones, como son los grupos carboxílicos. El análisis de MEE también da información complementaria. El número promedio de grupos fluoróforos y el ensanchamiento y desplazamiento hacia la región del rojo de la fracción de húmicos se relaciona con el aumento en el grado de humificación de la materia orgánica.



Referencias

1. Domeizel, M., Khalil, A., Prudent, P. UV spectroscopy: a tool for monitoring humidification and proposing an index of the maturity of compost. *Biores. Technol.* **94** (2004) 177–184
2. Korshin, G. V., Li, C.-W., Benjamin, M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV-spectroscopy: a consistent theory. *Water Res.* **31** (1997) 1787–1795
3. Morán Vieyra, F. E., Palazzi, V., Sanchez de Pinto, M., Borsarelli, C. Combined UV-Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes. *Geoderma.* **151** (2009) 61–67
4. Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R., Brunetti, G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.* **81/ 82** (1989) 143–156
5. Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. Information provided on humic substances by E4-E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal.* **41** (2) (1977) 352–358
6. Lguirati, A., Ait Baddi, G., Mousadik, A., Gilard, V., Revel, J.C., Hafidi, M. Analysis of humic acids from aerated and non-aerated urban landfill composts. *International Biodeterioration & Biodegradation* **56** (2005) 8–16
7. Chin, Y. P., Alken, G., O'Loughlin, E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ.Sci.Technol.* **28** (1994) 1853–1858
8. Potter, B.B., Wimsatt, J.C. Determination of total organic carbon and specific UV absorbance at 254 nm in source water and drinking water. USA Environmental Protection Agency. EPA Document # EPA/600/R-05/055 (2005) 415.3-1 – 415.3-56
9. Beckett, R., Jue, Z., Giddings, J. C. Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environ. Sci. Technol.* **21** (1987) 289–295
10. Scott, A. I. Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products. 1964, Pergamon Press, New York.
11. Fog, K. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biol. Rev.* **63** (1988) 433–462
12. Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Wiley-Vch Ed. New York, 2001. Capítulo 4, p. 113.
13. B. Valeur. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Wiley-Vch Ed. New York, 2001. Capítulo 9, p. 249.
14. Del Vecchio, R.; Blough, N. V., On the Origin of the Optical Properties of Humic Substances. *Environmental Science & Technology.* **38** (14) (2004) 3885–3891
15. Boyle, E. S.; Guerriero, N.; Thiallet, A.; Del Vecchio, R.; Blough, N. V., Optical Properties of Humic Substances and CDOM: Relation to Structure. *Environmental Science & Technology.* **43** (7) (2009) 2262–2268

- 16.** Baker, A., Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent *Environ.Sci.Technol.* **36** (2002) 1377-1382
- 17.** Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., Booksh, K. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter *Environ.Sci.Technol.* **37** (2003) 5701-5710
- 18.** Coble, P. G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* **51** (1996) 325-346
- 19.** Ahmad S. R. y D. M. Reynolds. Monitoring of water quality using fluorescence technique: prospect of on-line process control. *Water Research.* **33** (1999) 2069-2074
- 20.** Determann S., R. Reuter, P. Wagner y R. Willkomm. Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: Method of measurement and near-surface distribution *Deep Sea Reserach, Part I*, **41** (1994) 659-675
- 21.** Mounier S., N. Patel, L. Quilici, J. Y. Benaim y C.Benamou. Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve Amazone. *Water Research.* **33** (1999) 1523-1533
- 22.** Artinger R., G. Buckkau, S. Geyer, P. Fritz, M. Wolf y J. I. Kim. Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry.* **15** (2000) 97-116
- 23.** Miano T., G. Sposito y J. P. Martin. Fluorescence spectroscopy of model humic acidtype polymers. *Geoderma.* **47** (1990) 349-359
- 24.** Mounier, S., R. Braucher, J. Y. Benaim. Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by crossflow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence. *Water Research.* **33** (1999) 2363-2373
- 25.** Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **58** (2005) 715-733
- 26.** Parlanti, E., Morin, B., Vache, L. Combined 3D-spectrofluorometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Organic Geochemistry.* **33** (2002) 221-23
- 27.** Sierra, M.M.D., Donard, O.F.X., Lamotte, M., Belin, C., Ewald, M. Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters. *Mar. Chem.* **47** (1994) 127-144
- 28.** Coble, P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* **51** (1996) 325-346
- 29.** Sierra, M.M.D., Donard, O.F.X., Lamotte, M. Behaviour of dissolved fluorescent organic matter during estuarine mixing. *Mar. Chem.* **58** (1997) 51-58
- 30.** Silva, M.R., 1996. Estudos potenciométricos e fluorimétricos dos equilíbrios ácido-básicos e da complexação de metais com o Obisdien e as substâncias húmicas. Contaminação pelos metais em sedimentos da Ilha de Santa Catarina (Brasil). PhD Thesis, Universidad e Federal de Santa Catarina.
- 31.** Zhang, Y., Du, J., Zhang, F., Yu, Y., Zhang, J. Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: The Qinglan area of Hainan Island, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **92** (2011) 180-187

-
- 32.** Tatjana Andjelkovic, Jelica Perovic, Milovan Purenovic, Srdjan Blagojevic, Ruzica Nikolic, Darko Andjelkovic, Aleksandar Bojic. Spectroscopic and potentiometric studies on derivatized natural humic acid. *Analytical Sciences*. **22** (2006) 1553–1558
- 33.** Song, Z., Chouparova, E., Jones, K.W., Feng, H. y Marinkovic, N.S. FTIR Investigation of Sediments from NY/NJ Harbor, San Diego Bay, and the Venetian Lagoon. NLS Activity Report 2001, Z-112-Z-116
- 34.** Soumia Amir, Mohamed Hafidi, Jean-René Bailly, Jean-Claude Revel. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex® gel fractions. *Agronomie* **23** (2003) 269–275
- 35.** Samios, S., Lekkas, T., Nikolaou A., Golfinopoulos, S. Structural investigations of aquatic humic substances from different watersheds. *Desalination*, **210**, 125–137
- 36.** Takumi Saito, Luuk K. Koopal, Willem H. van Riemsdijk, Shinya Nagasaki and Satoru Tanaka. Adsorption of Humic Acid on Goethite: Isotherms, Charge Adjustments, and Potential Profiles. *Langmuir*, **20** (2004) 689–700