

Caracterización espectroscópica de enmiendas orgánicas

Spectroscopic characterization of organic amendments

Zambrano, A. J.;^{1*} Contreras, F. A.;¹ Paolini, J. E.²
y Rivero, C.³

¹Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Laboratorio de Investigaciones y Análisis Químicos, Industriales y Agropecuarios (LIAQIA)
Mérida, Estado Mérida, Venezuela (Apartado Postal 5101).

²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe,
Centro de Ecología, Laboratorio de Ecología de Suelos,
Estado Miranda, Venezuela.
mapire3000@yahoo.com

³Universidad de Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Edafología,
Maracay, Estado Aragua, Venezuela.
fcontrer@ula.ve

*Correspondencia: alexisz@ula.ve

Resumen

Las características estructurales de los ácidos húmicos (AHs) dependen, fundamentalmente, del origen y las condiciones en las cuales se desarrollan estos compuestos. Cada vez se busca discernir, con mayor precisión, sobre la estructura y reactividad de los AHs, así como sobre los grupos funcionales que contienen. En esta investigación se utilizó —en conjunto— IR, ¹H-RMN, UV-Vis para el estudio estructural de los AHs, de una serie de enmiendas usadas en los Andes Venezolanos y su relación entre sí. Los resultados de la relación E_4/E_6 señalan menor polimerización para el lodo, estiércol de caprino y las vermicompostas ULA y Zea, y mayor para la cachaza y el estiércol de vacuno. Los espectros de infrarrojo de dichos AHs mostraron similitud, especialmente en bandas específicas a algunos grupos funcionales, tales como: alcoholes, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, grupos cetónicos e insaturaciones alifáticas y aromáticas. Los análisis de ¹H-RMN no permitieron un mayor esclarecimiento de la estructura de los AHs es-

Abstract

The structural characteristics of humic acids (HAs) depend mainly on the origin and the conditions in which these compounds are developed. There is a need to discern more accurately the structure and reactivity of HAs as well as the functional groups they contain. There are many analytical techniques that assess and allow the understanding of the complexity of these macromolecules. In this research, a —conjunction of— IR, ¹H-RMN, UV-Vis were used for the structural study of the has of a series of organic residues used and their relationship with each other at the Venezuelan Andes. The results of the E_4/E_6 ratio indicated less polymerization on sludge, manure and ULA and Zea vermicompost, and more polymerized structures in sugar cane residues and cow manure. The infrared spectra of has were similar for all organic amendments studied, especially in specific bands to functional groups such as alcohols, amines, amides, carboxylic acids, ketonic groups and aliphatic and unsaturated and aromatic

tudiados; sin embargo, se confirmó la presencia de grupos funcionales alifáticos y metilénicos, ácidos, alcoholes y amidas. Además de la presencia de estructuras aromáticas en algunos AHs. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por IRFT; expresan que existen diferencias en las estructuras químicas de los AHs de las enmiendas evaluadas vinculadas a su origen y estabilidad química.

Palabras clave

^1H -RMN, infrarrojo, relación E_4/E_6 , madurez, estabilidad, enmiendas orgánicas, composta.

groups. The ^1H -RMN spectra hasn't provided further evidence about has structure. However, the presence of methylene aliphatic acid, alcohols and amides groups was confirmed. The presence of aromatic structures in some ahs was observed. These results corroborate the results obtained by FTIR. The results show differences on the chemical structures of the organic residues' humic acids linked to their chemical origin and stability.

Key words

^1H -NMR, IR, E_4/E_6 ratio, maturity, stability, organic amendments, compost.

Introducción

Algunos autores sostienen que los ácidos húmicos (AHs) son mezclas de carbohidratos, proteínas y lípidos procedentes tanto de plantas como de microorganismos, junto con degradaciones parciales de lignina y taninos con materiales microbianos como melaninas; o son pseudoestructuras definidas como constituciones moleculares hipotéticas con elementos, estructuras y grupos funcionales parecidos y consistentes con alguna o todas las propiedades observadas. Algunos métodos que son ampliamente utilizados en muchos procesos industriales de control de calidad, también son aplicados en la evaluación de calidad de enmiendas orgánicas. El desarrollo de las diferentes técnicas espectrales —como la espectroscopia ultravioleta-visible, infrarroja con transformadas de Fourier, resonancia magnética nuclear ^{13}C , entre otros— ha permitido avanzar ampliamente en el estudio y comprensión de la estructura de los AHs (Mosquera *et al.*, 2007; Meissl *et al.*, 2008).

La relación de las densidades ópticas o absorbancias de soluciones diluidas de AHs y fúlvicos (AFs) a 465 y 665 nm (abreviada como relación E_4/E_6), ha sido utilizada para caracterizar la materia orgánica. Ésta consiste en la relación entre la absorbancia a 465 y 665 nm, de una solución de AHs o AFs en NaHCO_3 a pH 8,2; donde, valores bajos indican un alto grado de aromaticidad; mientras que los altos señalan un mayor contenido de cadenas alifáticas. Chen *et al.* (1977) proponen que esta relación presenta una alta correlación con el contenido de radicales libres, O, C y -COOH, la acidez total y el peso molecular del material, los cuales están relacionados con el grado de madurez y estabilidad de las enmiendas orgánicas.

Con base en los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas, mediante las técnicas de espectroscopia visible e infrarroja, Kumada (1987) propuso la clasificación de los AHs en cinco grupos: A, B, R_p , P_0 y P, de acuerdo a su posición en un sistema de ejes coordenados (figura 1), previa obtención del Log K y el valor RF, midiendo $\Delta\log K$ y RF a través de la expresión:

$$\Delta \text{Log}K = \text{Log}k_{400} - \text{Log}K_{600}$$

$$RF = K_{600} 1000 \div C$$

Donde:

K_{400} y K_{600} son las densidades ópticas de una solución de AHs a 400 y 600 nm, respectivamente, y

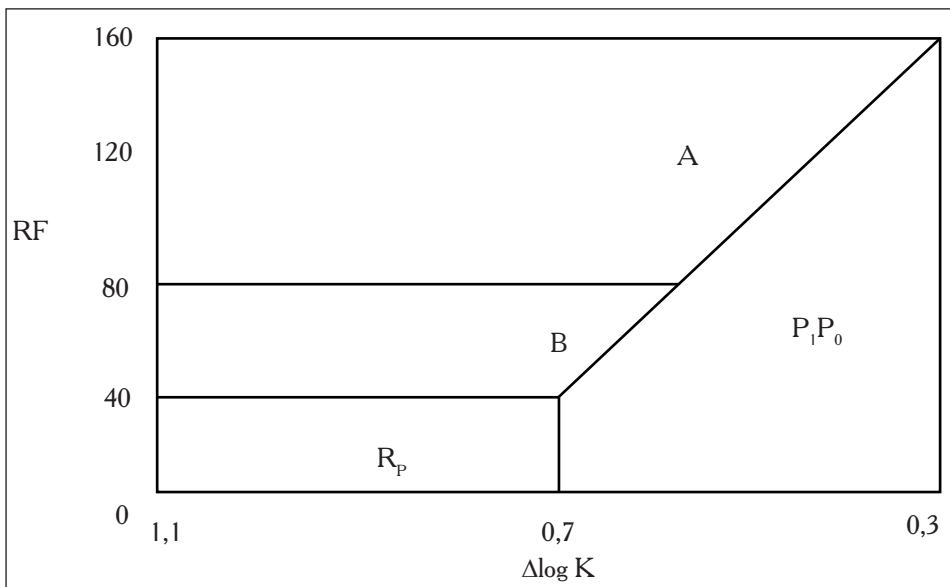
C = volumen de KMnO_4 0,1 M consumidos en la titulación de 30 mL de AHs, usados en la determinación del espectro de adsorción.

Clasificación Kumada:

- R_p : moléculas formadas en las primeras etapas del proceso de humificación.
- Grado de complejidad: $P_0 > P > B > A > R_p$.
- El esquema permite inferir acerca de: grado de aromaticidad ($A \gg B, P \gg R_p$).
- Acidez total y contenido de grupos carboxílicos y carbonilos ($R_p \gg P_0 \gg B \gg A$).
- Contenido de grupos hidroxilos y metoxilos ($A \gg B \gg P_0 \gg R_p$).
- Contenido de grupos funcionales en general ($R_p \ll B$ y $P \ll A$).
- Contenido de nitrógeno total ($R_p \gg P_0 \gg B \gg A$).

Figura 1

Esquema del sistema de clasificación de Kumada para ácidos húmicos.



Este sistema de codificación permite obtener información sobre las características de las moléculas de AHs, tales como: grupos funcionales, composición elemental y grado de humificación. De este modo, Kumada (1987) propone como una teoría para la formación de los AHs, en la que el proceso de humificación de los mismos ocurre a partir de los AHs tipo Rp (los cuales representan a aquellos que están relacionados con los primeros estados de humificación de la materia orgánica). Éstos, a su vez, evolucionan hacia AHs del tipo B y, finalmente, hacia el tipo A. Estos últimos corresponden a las formas más evolucionadas dentro de los AHs, pero cada tipo exhibe una forma relativamente estable en el suelo del cual es extraído; aunque en suelos fuertemente ácidos, los AHs del tipo Rp son reemplazados por ácidos de tipo P. Los AHs tipo Rp y B representan formas inmaduras y transitorias de los AHs tipo A. En este sentido, se ha intentado clasificar las sustancias húmicas en tres tipos, según su espectro de absorción: tipo A, aquellas que no tienen bandas de absorción específicas y disponen de un bajo valor de $\Delta\text{Log K}$, estando por debajo de 0,6; tipo B, sustancias húmicas cuyo espectro se caracteriza por tener un pico a 275 nm y un valor de $\Delta\text{Log K}$ entre 0,6 y 0,8; tipo C, aquellas cuyo valor de $\Delta\text{Log K}$ oscila entre 0,8 y 1,1.

Kononova (1982) describe el valor E_4/E_6 como una relación inversamente proporcional al grado de condensación de la red aromática carbonada de las sustancias húmicas y, por tanto, una baja relación E_4/E_6 ; es indicativo de un alto grado de condensación de estructuras aromáticas. Inversamente, una alta relación E_4/E_6 reflejará un bajo grado de condensación aromática e infiere la presencia de proporciones relativamente grandes de estructuras alifáticas (Stevenson, 1994). Para los AHs, indica valores comprendidos entre 3 y 5,5 y para los AFs el intervalo está entre 6 y 8,5.

Schnitzer y Khan (1972) indicaron que la absorción de luz de los AHs y AFs en la región visible del espectro electromagnético aumenta con la relación del carbono en el núcleo aromático al carbono de las estructuras alifáticas, con el contenido total de carbono y con el peso molecular. Chen *et al.* (1977) señalaron que la relación E_4/E_6 está determinada por el tamaño de partícula o peso molecular, pH, concentración de oxígeno, carbono, grupos carboxílicos y acidez total y que, aparentemente, no está relacionada directamente con la concentración de anillos aromáticos condensados (grado de condensación); además, es independiente de la concentración de AHs, al menos en el intervalo de concentración entre 100 - 500 Mg.kg⁻¹. Mientras que la reducción en la relación E_4/E_6 supone un aumento en el tamaño molecular y la menor proporción de carboxílicos ácidos (Heymann *et al.*, 2005; Rupiasih y Vidyasagar, 2007).

La espectroscopia infrarrojo (IR), por su capacidad de identificar grupos funcionales que absorben radiación en el sector IR, se ha convertido en una herramienta muy útil para estudiar la naturaleza, reactividad y arreglo estructural de las mismas. Permite detectar la presencia de proteínas y carbohidratos o de impurezas inorgánicas (Rivero, 2001); la espectroscopia infrarrojo con transformadas de Fourier es una técnica altamente efectiva, pero su información es básicamente cualitativa y ha tenido éxito en el estudio de los procesos de degradación de la materia orgánica y su mineralización (Chefetz *et al.*, 1996).

Otra técnica moderna para la caracterización de AHs es la resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido (Mao *et al.*, 2000). Esta técnica ofrece una descripción de las principales clases de grupos que contienen carbono en su estructura; de una manera simple ha contribuido considerablemente a la información en cuanto a la naturaleza química de AHs. El análisis de los AHs extraídos, utilizando la técnica de ^1H -RMN, permite obtener información sobre los grupos funcionales presentes en los mismos y su aromaticidad.

Es importante señalar que la información obtenida por cada una de las técnicas IR, RMN, UV-Vis, etcétera, de manera aislada no es por sí sola suficiente, dado que no hay 100% de especificidad; por lo que se requiere la combinación de éstas u otras técnicas analíticas adicionales (rayos X, espectroscopia de fluorescencia, resonancia de spin electrón, microscopia electrónica). La combinación demuestra la presencia de las distintas estructuras o grupos funcionales.

El interés por la disposición final de residuos orgánicos degradables y la recuperación de suelos degradados o con deficiencia de materia orgánica, ha permitido que las enmiendas orgánicas surjan como una de las mejores alternativas a utilizar. En Venezuela se han realizado pocos estudios de caracterización de AHs de enmiendas orgánicas; la mayoría de las investigaciones se han orientado en caracterizar la materia orgánica del suelo y evaluar las propiedades físico-químicas y biológicas de éste después de la aplicación de dichos materiales. En la presente investigación, se caracterizaron —por técnicas espectroscópicas— ocho enmiendas orgánicas comerciales, con el fin de evaluar su calidad, estabilidad y madurez y deducir su potencial uso y aplicación. Esta evaluación puede ser realizada a través de diversos parámetros y medidas espectroscópicas UV-Vis, infrarrojo, o analizando la estructura de los AHs.

Estabilidad y madurez de las enmiendas orgánicas son expresiones que suelen usarse de manera indistinta y, generalmente, no son catalogados como índices de calificación. Estabilidad se refiere a una etapa específica de descomposición del material orgánico, la cual está relacionada con el tipo de compuestos orgánicos residuales y la actividad biológica resultante que se puede medir; por ejemplo, la desaparición de la banda de adsorción cercana a $1,456\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la lignina en materiales ricos en lignina durante el compostaje (Sacco, 2008). Mientras que la madurez se refiere a la capacidad de uso final en el suelo. En este caso, la relación E_4/E_6 calculada como el cociente de absorbancias a 465 y 665 nm se incrementa ligeramente con el tiempo de compostaje y luego decrece al final del proceso, llegando a valores cercanos al obtenido para el AHs extraídos de suelos.

Materiales y métodos

Selección de las enmiendas orgánicas utilizadas. En esta investigación se evaluaron ocho enmiendas orgánicas de diferentes orígenes: estiércol de vacuno y caprino, vermicomposta de dos fuentes distintas de sustratos, composta de cachaza (C), lodo originado de una planta depuradora aerobia (L), el cual obedece al origen, la carga iónica de las aguas y el tipo de planta de tratamiento, gallinaza Lara (GL, estiércol de pollos de engorde y gallinas ponedoras, no peletizado) y gallinaza Mérida (GM, cama de descanso con base

en concha de arroz de forma peletizada). En la selección de las enmiendas se consideró su grado de estabilidad y su uso agrícola. En el caso de las vermicompostas, se tomó en cuenta la naturaleza y manejo de los sustratos usados en el compostaje y las condiciones ambientales. La vermicomposta ULA (VU) usa como sustrato residuos vegetales y la vermicomposta Zea (VZ) fue elaborada con una mezcla de estiércol de vacuno y desechos de una planta de beneficio de café. La extracción de las sustancias húmicas se realizó de acuerdo al método propuesto por Ciavatta *et al.* (1990), que usa una mezcla hidróxido-pirofosfato como extractante en una relación 1:10, enmienda-extractante.

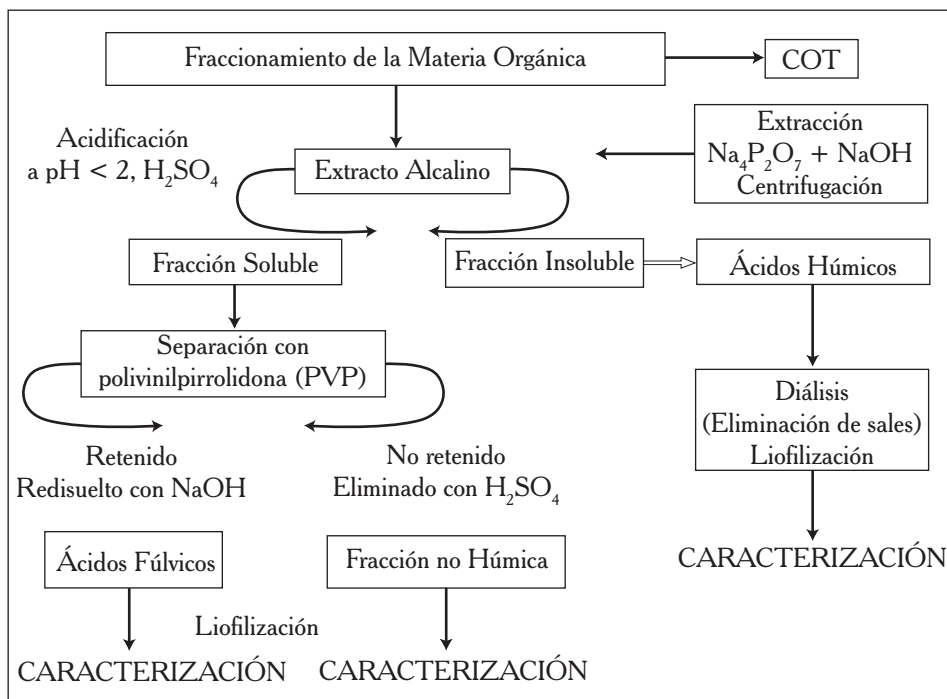
En todos los casos, se tomaron cinco muestras en presentaciones de 3 kg. Las mismas, se secaron al aire y se tamizaron a 2 mm. Se siguió el mismo tratamiento para las ocho muestras estudiadas, tomando cuatro repeticiones en cada enmienda.

Extracción y purificación de las sustancias húmicas. La extracción de las sustancias húmicas se realizó según el esquema de la figura 2, basado en la diferencia de solubilidad en ácidos y bases. Se usó una relación 1:10, enmienda: extractante, de acuerdo al método propuesto por Ciavatta *et al.* (1990). Este procedimiento permitió precipitar los AHs en medio ácido y separarlos por centrifugación del medio de extracción (pirofosfato de sodio-hidróxido de sodio). Posteriormente, se separaron los ácidos fúlvicos de las sustancias no húmicas a través de una columna de polivinilpolipirrolidona.

Los ácidos húmicos obtenidos se dializaron, introduciéndolos dentro de una membrana de diálisis membrana Spectrapor de 3.3 mL/cm de capacidad, 32 mm de ancho y 20.4 mm de diámetro. Con un peso molecular de corte entre 6,000 y 8,000. Spectrapor, marca Thomas Scientific, permaneciendo en contacto con agua hasta que se equilibró la concentración de sales. La remoción de agua se realizó periódicamente hasta eliminar por completo la presencia de SO_4^{2-} y Cl^- en los ácidos húmicos, cuya existencia se determinó por la turbidez generada en el medio al interactuar con una solución diluida de BaCl_2 y AgNO_3 , respectivamente. Enseguida, los ácidos húmicos se liofilizaron con un liofilizador Freezone 77510, marca Labconco, con el fin de obtener en forma sólida dichos ácidos para sus análisis espectroscópicos.

Figura 2

Fraccionamiento de la materia orgánica.



Fuente: adaptado de Ciavatta *et al.* (1990).

Relación E_4/E_6 . Esta relación se utilizó para caracterizar la materia orgánica de las enmiendas orgánicas, midiendo la relación de absorbancias a 465 y 665 nm, de una solución de AHs en NaHCO_3 a pH 8,2 usando un espectrofotómetro UV-Visible 1601, marca Shimadzu, de acuerdo a la metodología descrita por Kononova (1966).

Por otra parte, la clasificación de los AHs, se realizó de acuerdo al sistema de clasificación de Kumada (1987), midiendo la absorbancia a 400 y 600 nm, determinando posteriormente los valores de $\Delta \log K$ y RF.

Caracterización por espectroscopia de infrarrojo. Esta caracterización se realizó a partir de una mezcla de AHs, a los cuales se le agregó KBr en una proporción de 0,25%, de acuerdo al método propuesto por Inbar *et al.* (1989), usando un espectrofotómetro infrarrojo con transformadas de Fourier modelo 1605, marca Perkin-Elmer, en el rango entre 4,400 y 450 cm^{-1} .

Caracterización con espectroscopia de resonancia magnética nuclear, $^1\text{H-RMN}$. Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ se realizaron por dilución de los AHs con agua deuterada ($\text{D}_2\text{O} > 99,996\%$), en un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN), a

una frecuencia de 400 MHz, según el método sugerido por Inbar *et al.* (1989), en un equipo de RMN digital, modelo Avance DRX 400, marca Bruker.

Resultados

Relación E_4/E_6 . De acuerdo a la relación de las densidades ópticas (E_4/E_6) obtenidas, los valores altos indican presencia de moléculas orgánicas pequeñas o estructuras alifáticas y, por lo general, con un mayor contenido de grupos funcionales. Mientras que, valores bajos de la relación E_4/E_6 supone un aumento en el peso molecular y menor proporción de ácidos carboxílicos, además de estar relacionada con el contenido de oxígeno en los AHs. En el cuadro 1, se presentan los valores de la relación E_4/E_6 de los AHs de las diferentes enmiendas estudiadas. Se observa que los mayores valores corresponden a los AHs del lodo, estiércol de caprino y la gallinaza Mérida; mientras que las relaciones E_4/E_6 menores pertenecen a la cachaza.

Cuadro 1

Relación E_4/E_6 obtenidas para los ácidos húmicos de las enmiendas orgánicas estudiadas.

Enmienda	E_4/E_6
Estiércol de Vacuno	5,13*
Estiércol de Caprino	7,59**
Gallinaza Lara	5,71*
Gallinaza Mérida	7,41**
Vermicomposta ULA	6,69*
Vermicomposta Zea	5,64*
Cachaza	3,59*
Lodo	8,00**

Diferencia estadística para E_4/E_6 , según Tukey ($P = 0,05$). * Efecto significativo; ** Efecto no significativo.

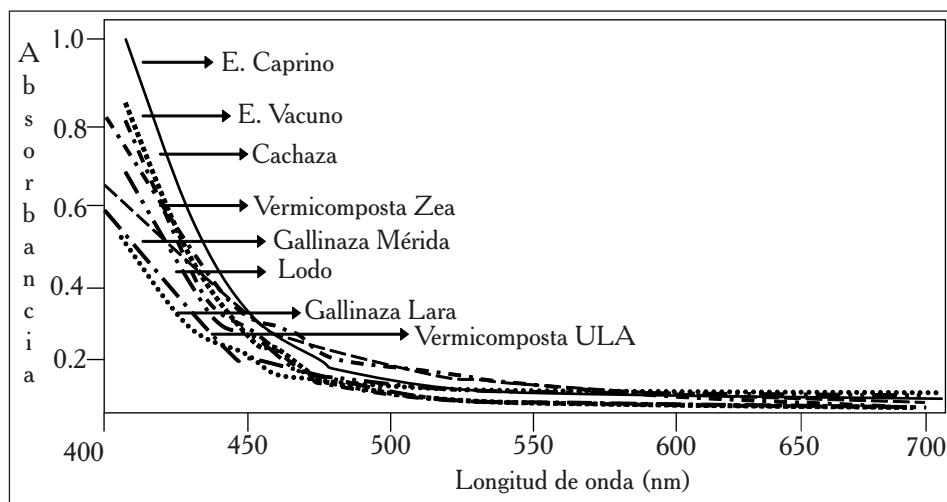
Se ha conseguido que existe diferencia significativa ($P = 0,05$) en la relación E_4/E_6 de algunos AHs de las enmiendas estudiadas como consecuencia del origen y manejo al cual son sometidas en el proceso de elaboración.

Los valores altos de la relación E_4/E_6 en el lodo, estiércol de caprino y gallinaza Mérida indican un bajo grado de humificación de los AHs, en contraste con los valores para la cachaza; mientras que el resto de las enmiendas orgánicas aún pueden estar en proce-

so de estabilización. Esto indica que los AHs de la cachaza presentan pesos moleculares más altos que el resto de las enmiendas. Por el contrario, el lodo, el estiércol de caprino y gallinaza Mérida manifiestan un bajo grado de condensación aromática y, posiblemente, la presencia de mayores estructuras alifáticas.

En la figura 3, se presentan los espectros de absorción visible de los AHs de las diferentes enmiendas orgánicas estudiadas, en donde se observa que los AHs de estiércol caprino presentan la mayor absorción a 465 nm, seguido de la cachaza; mientras que los demás AHs presentan una absorción similar. Una tendencia análoga fue observada a los 665 nm, para todos los AHs. Éstos, presentaron un espectro visible monótono que decrece en forma exponencial en función de la longitud de onda.

Figura 3
Espectro visible de los ácidos húmicos de las diferentes enmiendas orgánicas estudiadas.



Clasificación de los ácidos húmicos. Con el fin de conocer el tipo de materia orgánica de las enmiendas estudiadas se aplicó el sistema de clasificación de Kumada (1987), con el cual se calcularon los parámetros indicados anteriormente. Los resultados se ilustran en el cuadro 2, donde se indican los valores de $\Delta \log K$, RF y los resultados de la clasificación para cada AH y enmienda orgánica. De acuerdo a la clasificación, el estiércol de caprino, las gallinazas y las vermicompostas pertenecen a los AHs del grupo R_p ; mientras el estiércol de vacuno, la cachaza y el lodo lo hacen al grupo P_1P_0 . Esto indica que las enmiendas del grupo R_p contienen AHs en los primeros estados de humificación de

la materia, donde es posible evidenciar algunos compuestos orgánicos formadores de tejidos vegetales, tales como lignina, polifenoles y aminoácidos.

Estos AHs del tipo R_p , en general, se corresponden con compuestos poco aromáticos, con elevada acidez y contenido de grupos carboxílicos, pocos grupos metóxilos, escasos grupos funcionales y presencia de compuestos nitrogenados. Se asume que esto se debe, posiblemente, a que algunos de estos materiales aún no están maduros; mientras que en la vermicomposta por posible liberación de moléculas, relativamente simples, por las lombrices.

Cuadro 2

Aplicación sistema de clasificación Kumada para los AHs.

Enmienda	$\Delta \log K$	RF	Clasificación
Estiércol de Vacuno	0,663	23,622	P_1P_0
Estiércol de Caprino	0,837	8,819	R_p
Gallinaza Lara	0,719	12,815	R_p
Gallinaza Mérida	0,732	18,511	R_p
Vermicomposta ULA	0,747	14,27	R_p
Vermicomposta Zea	0,925	6,178	R_p
Cachaza	0,533	16,311	P_1P_0
Lodo	0,516	8,167	P_1P_0

Respecto a los AHs del grupo P_1P_0 , estas enmiendas presentan bajo grado de complejidad, poco aromáticos, presencia de algunos grupos metóxilos y carboxílicos, lo que les confiere cierta acidez, poca diversidad de grupos funcionales y moderado contenido de compuestos nitrogenados.

Caracterización por espectroscopia de infrarrojo. Aunque esta técnica no proporciona datos cuantitativos, se han determinado con éxito estructuras que indican las transformaciones de la materia orgánica durante el proceso de maduración y estabilización. Con estos análisis espectroscópicos, es posible comparar entre la madurez de una enmienda orgánica y el grado de descomposición de los componentes biodegradables durante el proceso de maduración.

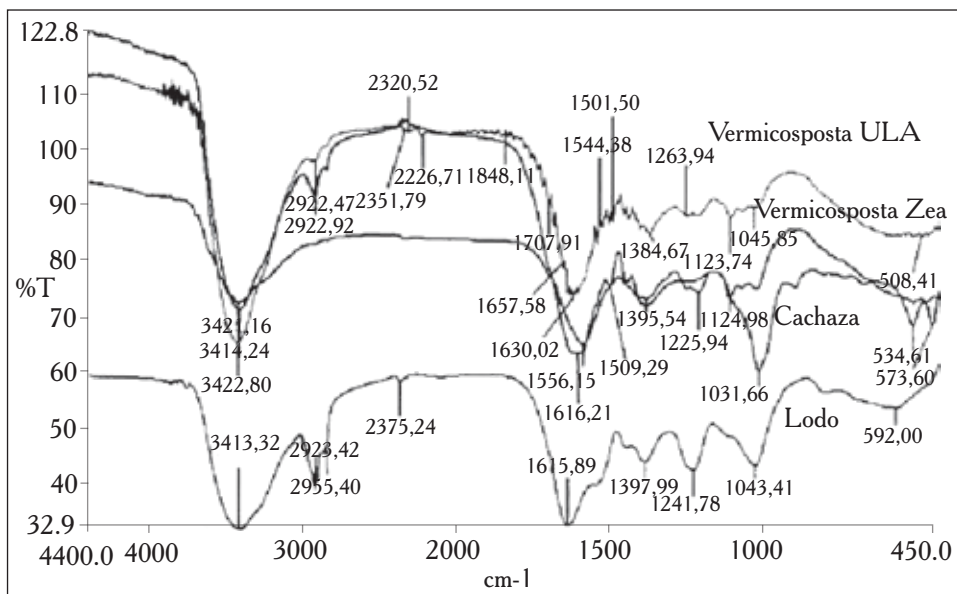
En general, los espectros de infrarrojo con transformadas de Fourier (IRTF), de los AHs de las enmiendas orgánicas estudiadas son similares, especialmente en bandas de alcoholes, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, grupos cetónicos e insaturaciones alifáticas y aromáticas.

En la figura 4, se presentan los espectros IRTF de los AHs de la cachaza, lodo, vermicomposta ULA y vermicomposta Zea; en éstos, se aprecia la presencia de las vibraciones correspondientes al alargamiento O-H de alcoholes o fenoles en asociación polimérica (3,400 - 3,200 cm^{-1}); sin embargo, dicha banda también se asocia con amidas secundarias, cuya banda aparece entre 3,500 y 3,310 cm^{-1} , consecuencia de la vibración N-H. La presencia de una banda entre 1,650 y 1,550 cm^{-1} evidencia la existencia de grupos COO^- ; la banda se encuentra en todos los AHs antes señalados. No obstante, también aparece la vibración de estiramiento O-H de alcoholes terciarios (1,410-1,310 cm^{-1}), así como vibraciones de flexión en el plano de O-H en alcoholes o fenoles, cercana a 1,400 cm^{-1} . En ninguno de los casos se presentó la señal de absorción de cetonas; sin embargo, en las vermicompostas, se observó una ancha banda de absorción a 1,596 cm^{-1} que se asocia con vibraciones $\text{C}=\text{C}$, típica de hidrocarburos aromáticos y de grupos carboxílicos.

En los espectros IRTF del lodo y vermicomposta Zea se presentaron señales características de la presencia de hidrocarburos alifáticos, incluyendo posibles sustituciones metílicas múltiples; además, probablemente hidrocarburos alifáticos de cadena larga con sustituciones. Cabe destacar la presencia de posibles compuestos cíclicos (2,960-2,900 cm^{-1}), grupos carbonil-amida entre (2,990-2,850 cm^{-1}) y presencia de acetileno o sustitución nitrilo (1,485-1,345 cm^{-1}).

Figura 4

Espectros IRTF de los AHs de la cachaza, lodo, vermicomposta ULA y Zea.



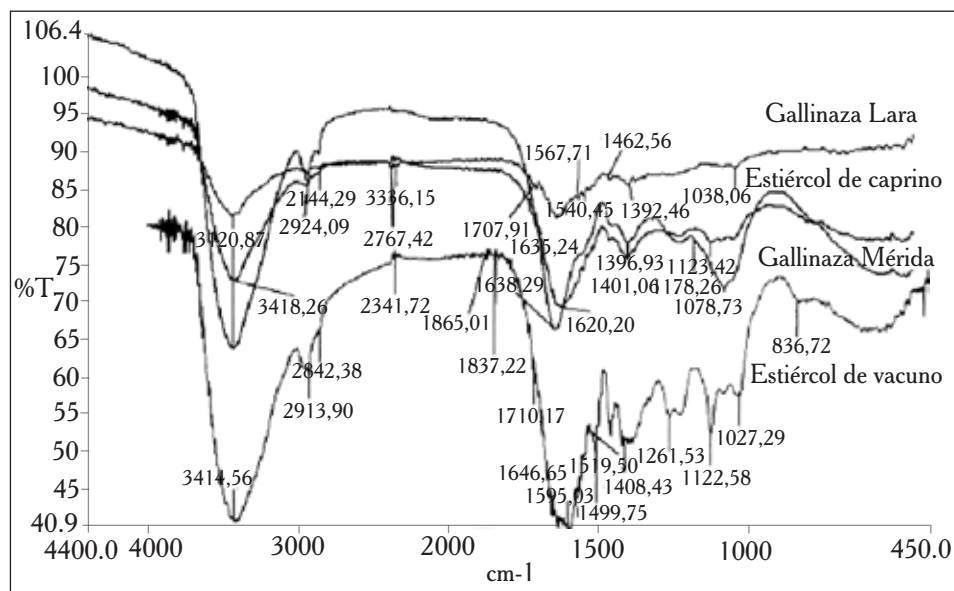
En los espectros IRTF de los AH de las vermicompostas ULA y Zea se observó, básicamente, la presencia de grupos alifáticos (C=C aromáticos) y carbonilos pertenecientes a ácidos (1,450-1,600 y 1,690-1,760 cm^{-1} , respectivamente); además, se aprecia cierta tendencia aromática e insaturaciones (1,500-1,600 cm^{-1}) asociada a C=C. No obstante, se observó una ligera diferencia con los espectros del lodo y la cachaza, en la señal a 1,515 cm^{-1} , la cual pertenece a anillos aromáticos con sustituciones orto y para, que corresponde a la señal típica de la lignina.

Estos espectros presentaron bastante similitud, excepto en la región entre 1,600-1,300 cm^{-1} , donde las diferencias observadas en las señales deben ser fundamentalmente debidas al origen de los materiales. Sin embargo, en general —en la región de las bandas características— los espectros de los AHs estudiados, son ligeramente similares para la cachaza y el lodo y entre las gallinazas evaluadas.

Para los espectros IRTF de los AHs del estiércol de caprino, estiércol de vacuno, gallinaza Lara y gallinaza Mérida se observó una banda entre 3,240 y 3,200 cm^{-1} , típica de grupos OH o amonio (figura 5). Excepto en la gallinaza Lara, se observó una banda entre 2,920 y 2,850, posiblemente debida al estiramiento asimétrico de CH_2 y simétrico de los grupos O- CH_3 . En todos los casos, se observa una señal a 1,620 cm^{-1} , probablemente correspondiente a sales de ácidos carboxílicos.

Figura 5

Espectros IRTF de los AH de la gallinaza Mérida y Lara, estiércol vacuno y caprino.



En 1,400-1,420 cm^{-1} se observa una banda de absorción bastante amplia (excepto en la gallinaza Lara), característica de estiramiento de anillos aromáticos (ortodisustituídos), la cual coincide sobre el estiramiento de fenoles e inflexión de C-H, $-\text{CH}_2$ y grupos $-\text{CH}_3$. En éstos, AHs se confirma la presencia de grupos carboxílicos (1,725-1,688 cm^{-1} y la señal a 1,400 cm^{-1}). La banda observada entre 2,965 y 2,880 cm^{-1} indica la probabilidad de la presencia de estructuras alifáticas (C-H) o sales de ácidos carboxílicos, unido a di o poli hidroxí compuestos.

De acuerdo a la figura 5, las señales entre 1,181-1,161 cm^{-1} observadas para el estiércol de caprino, estiércol de vacuno y la gallinaza Mérida, estarían asociadas a la presencia de lignina, la cual podría presentar sustituciones aromáticas en el anillo de grupos metoxi, aldehídos aromáticos y cetonas. Al comparar los espectros IRTF de los AHs de las gallinazas estudiadas, se observa que la señal entre 3,500 y 3,300 está asociada a posibles compuestos hidroxílicos y aminos es de menor intensidad, posiblemente debido al tratamiento de secado que sufren estas enmiendas en las plantas de producción. Se plantea que las amplias bandas de absorción podrían ser debidas a bandas más estrechas, correspondientes a componentes individuales presentes en los AHs. Entre 1,665-1,635 cm^{-1} se observaron señales de compuestos aromáticos o alifáticos, así como grupos C=O correspondientes a cetonas (1,850-1,690 cm^{-1}).

Posiblemente, la presencia del máximo entre 1,700-1,600 cm^{-1} se deba a la vibración de los enlaces C=O y OH de grupos carboxilos o ésteres de arilo, así como amidas primarias. En este caso, se observa bien definida la banda de estiramiento asimétrico del enlace C-H. En términos generales, se puede decir que la gallinaza Mérida y el estiércol de caprino presentan grupos funcionales similares y su carácter aromático es análogo.

En los AHs de las gallinazas Lara y Mérida y los estiércoles de vacuno y caprino, presentan compuestos carbonílicos insaturados (1,470-1,420 cm^{-1}) y sustituciones alcohoxi o haloalcohoxi (1,850-1,690 cm^{-1}). Se observó una banda (1,720-1,695 cm^{-1}) característica de disulfuros de carbono S=C=S, así como carbonatos (1,315-1,280 cm^{-1}), posiblemente debido a la presencia de restos de materiales con carbonatos en las plantas de producción, tales como cales o cáscaras de huevos en las gallinazas. Se obtuvieron señales correspondientes a sulfonas alifáticas O=S=O (1,230-1,160 cm^{-1}), sales de azufre (1,410-1,340 cm^{-1}) y compuestos nitro aromáticos (2,325-2,020 cm^{-1}).

Cabe resaltar que en el estiércol de vacuno, se obtuvo una señal a 1,123 cm^{-1} , característica de anillos aromáticos con sustituciones orto y para, con estiramiento C-O-C, que no se observa en los AHs de las enmiendas restantes; además, la banda cercana a 1,650 cm^{-1} observada en los AHs del estiércol de vacuno, corresponde al enlace C=C aromático conjugado con C=O y/o COO; dicha señal se asocia a cetonas insaturadas.

Caracterización por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, ^1H -RMN. El análisis de los AHs extraídos mediante el uso de la técnica de ^1H -RMN permitió obtener mayor información sobre los grupos funcionales presentes en los mismos; aunque la señal del agua no pudo ser eliminada completamente del espectro.

Los espectros ^1H -RMN de la gallinaza Mérida, gallinaza Lara, estiércol de vacuno y caprino se muestran en la figura 6. Se observa que los espectros ^1H -RMN de la gallinaza

Lara y Mérida son similares, mientras que los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los AHs del estiércol de vacuno y caprino, presentan características espectrales diferentes, especialmente entre 2,8 y 4,2 ppm. Dichas señales, de acuerdo a su posición en los espectros, pueden ser atribuidas a los siguientes grupos funcionales:

1. Señales entre 0,1-1,6 ppm se corresponden a estructuras alifáticas de grupos metil y metilenos ($\text{CH}_3\text{-C}$ y $\text{-CH}_2\text{-C}$, $\text{-CH}_2\text{-[C=C]}$).

2. Entre 1,6 y 3,0 ppm corresponderían a protones de grupos metilenos y metinos en carbonos alfa de anillos aromáticos, carboxílicos y grupos carbonilos.

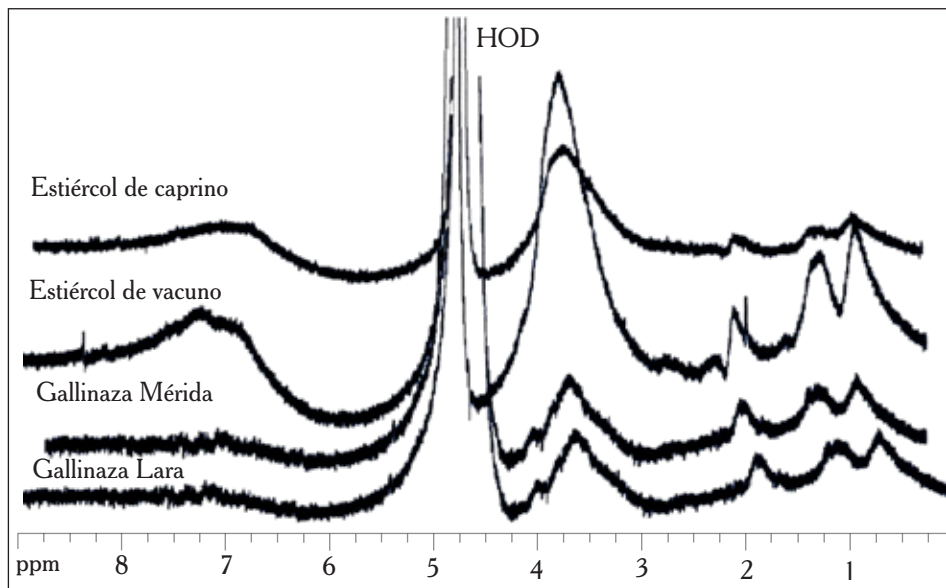
3. Entre 3,3 y 5,5 se asocian a protones en carbono de grupos metil, metileno o metino enlazados directamente al oxígeno o nitrógeno, incluyendo carbohidratos y protones de aminoácidos, especialmente en los estiércoles de vacuno y caprino.

4. Por último, entre 5,5 y 9,0 ppm, se corresponden con protones unidos a carbonos insaturados y protones aromáticos. Del mismo modo, entre 6,5 y 7,5 ppm se observa con mayor claridad señales de protones de sustituciones aromáticas tipo fenoles.

En términos generales, posiblemente se encuentren protones de carbohidratos o macromoléculas que contengan azúcares, debido a que en los espectros $^1\text{H-RMN}$ se observan diferentes desplazamientos químicos de los protones, de los posibles anillos existentes, muy similares al desplazamiento típico de los azúcares.

Figura 6

Espectros $^1\text{H-RMN}$ de gallinaza Mérida y Lara y el estiércol de vacuno y caprino.



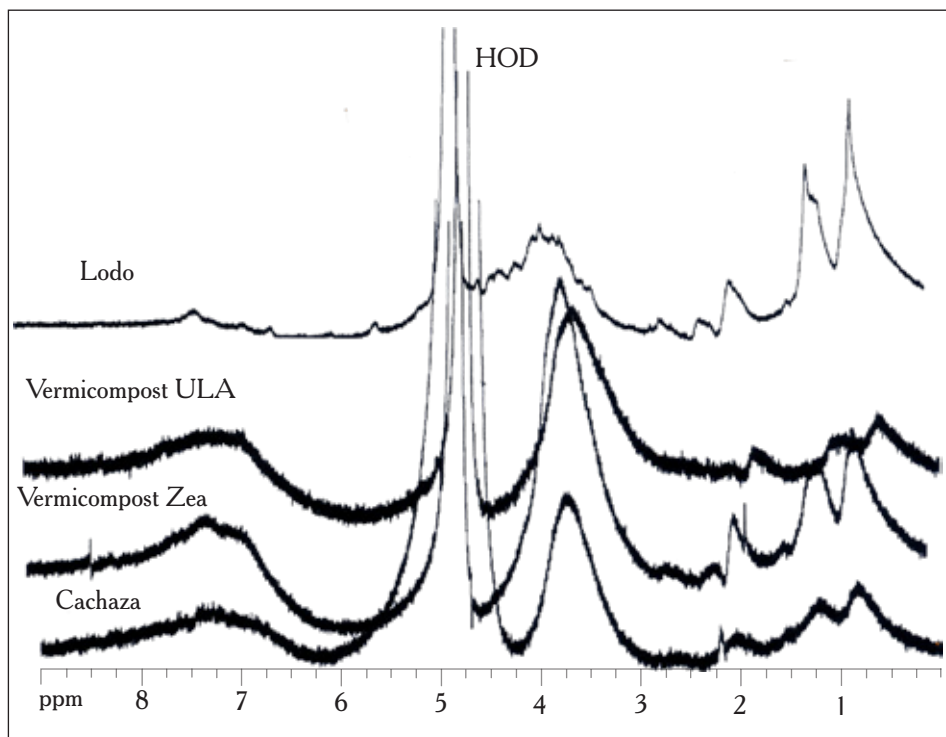
En todos los espectros ^1H -RMN de los AHs de las enmiendas orgánicas estudiadas, la señal del agua se encuentra entre 4,2-5,8 ppm; la misma, puede ser eliminada si se trabaja con espectroscopia ^{13}C -RMN en estado sólido la que, al mismo tiempo, permite obtener mejores señales espectrales por efecto de concentración.

De acuerdo a los espectros ^1H -RMN de las gallinazas, éstas presentan una baja concentración de protones aromáticos, posiblemente debido a la ausencia de compuestos precursores aromáticos en la dieta de los animales. En el caso de los espectros de ^1H -RMN de los estiércoles de vacuno y caprino se observa, con mayor detalle, los protones en estructuras alifáticas de grupos metílicos, las cuales se consiguen entre 0,6 y 1,1 ppm; asimismo, en estas últimas enmiendas, probablemente existan protones aromáticos y no olefínicos en la zona comprendida entre 5,0 y 7,0 ppm.

Finalmente, la presencia de protones con mayor carácter aromático sólo se señalan en los espectros ^1H -RMN del estiércol de caprino y vacuno; en este último, se ve una señal aguda entre 8,2-8,4 ppm, la cual podría estar ligada a la presencia de amidas alifáticas, resultado congruente con los grupos funcionales presentes en el espectro IRFT del estiércol de vacuno.

En los espectros ^1H -RMN de los AHs del lodo, cachaza y las vermicompostas ULA y Zea (figura 7), se observaron señales de los grupos alifáticos $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$, así como de estructuras alifáticas heteroatómicas $[-\text{CH}_2-(\text{O})]$ entre 3,8-4,2 ppm. En el espectro ^1H -RMN de la cachaza, se observaron protones en grupos metílicos en estructuras insaturadas tipo $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$ en la región comprendida entre 1,8-2,5 ppm, donde también se observó el doblete del $-\text{CH}_2$; mientras que en el lodo, el espectro presenta protones alifáticos tipo metílicos (0,8-1,2 ppm). También se observaron los protones de grupos alifáticos unidos a heteroátomos de oxígeno (2,2-3,8 ppm). En el espectro ^1H -RMN de los AHs de la vermicomposta ULA, las señales espectrales fueron similares a las visualizadas por espectros de los AH de la cachaza y estiércol de caprino. Se infiere que tiene fuerte carácter aromático (6,4-8,0 ppm) y presencia de protones de grupos metílicos y metilenos (2,0-3,0 ppm).

Figura 7

Espectros ^1H -RMN del lodo, cachaza, vermicomposta ULA y Zea.

Por último, el espectro ^1H -RMN de los AHs de la vermicomposta Zea, presentó señales espectrales muy similares al espectro de los AHs del estiércol de vacuno; aunque en este caso, dichas señales se observan con mejor resolución. Cabe destacar que en la producción de vermicomposta Zea, precisamente se usa el estiércol de vacuno como uno de los principales sustratos. En este caso, se observó claramente la presencia de protones de los grupos metílicos y metilenos (2,0-3,0 ppm); además, se presenta un fuerte carácter aromático (6,4-8,2 ppm) y, posiblemente, protones de grupos carboxílicos en la región comprendida 2,0-3,0 ppm y 8,4 ppm.

Discusión

Relación E_4/E_6 . Mathur *et al.* (1993) afirman que la relación E_4/E_6 en el extracto acuoso se incrementa con el tiempo de compostaje y se aplica a lo observado en los materiales menos polimerizados (como el lodo, estiércol de caprino y las vermicompostas ULA y Zea); mientras los más polimerizados son la cachaza y el estiércol de vacuno.

En el caso de los AHs del estiércol de caprino, GM y lodo, el valor de la relación E_4/E_6 es mayor a siete, lo que infiere que en ellos predominan estructuras menos polimerizadas y complejas. Resultados similares presentan Paolini (1980), Mathur *et al.* (1993), Senesi y Brunetti (1996), en AHs de suelos y enmiendas orgánicas. Por otra parte, los AHs de la cachaza, el estiércol de vacuno y GL presentaron los valores de la relación E_4/E_6 más bajos, por lo que en ellos predominan pesos moleculares elevados; resultados similares presentan Busato *et al.* (2010), al evaluar residuos industriales de caña de azúcar, los cuales señalan que este material presenta un alto grado de aromaticidad y/o de peso molecular.

Aunque el sistema de clasificación de Kumada tiende a agrupar una amplia gama de tipos de materia orgánica, debido a su limitado número de clases, permitió describir las enmiendas estudiadas en torno a su estado de madurez (R_p), grado de complejidad y aromaticidad, acidez total y contenido de grupos carboxílicos y carbonilos, contenido de grupos hidroxilos y metoxilos, contenido de grupos funcionales en general y contenido de nitrógeno total.

Caracterización por espectroscopia de infrarrojo. Los resultados obtenidos en los diferentes espectros IRTF de los AHs de las enmiendas evaluadas, se puede decir (a excepción de la cachaza), que los grupos funcionales identificados son comunes en la mayoría de las enmiendas estudiadas. Asimismo, la diferencia fundamental entre los espectros se encuentra en la región de la banda característica. Por otra parte, de acuerdo a la clasificación de Stevenson y Goh (1971), todos los ácidos húmicos estudiados clasifican como tipo III; es decir, no se presenta la banda de absorción a $1,720\text{ cm}^{-1}$ completamente separada, ni las bandas a $1,600$ y $1,200\text{ cm}^{-1}$; por el contrario, se acentúa la absorción a $1,540\text{ cm}^{-1}$ y se evidencia la presencia de grupos que demuestran la presencia de hidratos de carbonos y proteínas. Resultados similares señalan Inbar *et al.* (1989) en composta de lodos y estiércol de ganado.

Finalmente, en ninguno de los espectros de los AHs evaluados se observó la banda característica de n-alcenos (mayor a siete átomos de carbono), la cual se presenta a los 720 cm^{-1} . Lo que evidencia la presencia de estructuras aromáticas sustituidas o policíclicas. Resultados similares obtienen López *et al.* (1999) y Rivero *et al.* (1998) al caracterizar AHs de suelos venezolanos.

Caracterización por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, $^1\text{H-RMN}$. Los análisis de $^1\text{H-RMN}$, confirmaron la presencia de grupos funcionales alifáticos y metílicos de grupos funcionales ácidos, alcoholes y amidas, así como la presencia de estructuras aromáticas en algunos AHs, confirmando los resultados obtenidos por IRFT. Resultados que se concuerdan con los obtenidos en la clasificación de Kumada (1987), antes señalada.

El estudio de ciertos parámetros como los evaluados, suministran información exhaustiva de los cambios que se dan en las enmiendas orgánicas durante el proceso de maduración. Una de las grandes ventajas de esta técnica, es que permite identificar si los grupos carboxílicos están vinculados al núcleo aromático o cadenas alifáticas en los AHs (Zbytniewski y Buszewski, 2005).

Conclusiones

En los valores de la relación E_4/E_6 de los AHs de las diferentes enmiendas estudiadas, se observa que los mayores valores corresponden a los AHs del lodo, estiércol de caprino y la gallinaza Mérida; mientras que las relaciones E_4/E_6 menores pertenecen a la cachaza; es decir, los materiales menos polimerizados son el lodo, estiércol de caprino y las vermicompostas ULA y Zea; mientras los más polimerizados son la cachaza y el estiércol de vacuno.

El sistema de clasificación de AHs propuesto por Kumada, permitió determinar que las gallinazas Mérida y Lara, las vermicompostas ULA y Zea y el estiércol de caprino presentan compuestos poco aromáticos con alta acidez y presencia de grupos carboxílicos y compuestos nitrogenados.

En los espectros de infrarrojo con transformadas de Fourier, se observó que los AHs de las enmiendas orgánicas estudiadas, en general, presentan poco carácter aromático; además, dejan de manifiesto la presencia de amidas, lo que se correlaciona con los contenidos de nitrógeno, especialmente en el estiércol de vacuno.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones demuestran que sólo los estiércoles de caprino, las vermicompostas ULA y Zea y en menor proporción la cachaza, presentan protones aromáticos.

Posiblemente, la cachaza sea la única enmienda que presente carbonos aromáticos, ya que su bajo valor de E_4/E_6 así lo indica, lo que se corresponde con el espectro $^1\text{H-RMN}$, aunque en el espectro IRTF, la banda a $1,600\text{ cm}^{-1}$ no está bien separada.

La información espectral puede ser usada como herramienta, de fácil aplicación y rápida para evaluar el comportamiento de las enmiendas orgánicas en cuanto a su calidad y estabilidad, con aplicación práctica no sólo en laboratorios de investigación, sino también en laboratorios de servicio.

Literatura citada

- Busato, J. G.; Zandonadi, D. B.; Barros, L.; Rocha, A. y Canellas, L. P. (2010). Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 67(2): 206-212.
- Chefetz, B.; Hatcher, P. G.; Hadar, Y. y Chen, Y. (1996). Chemical and biological characterization of organic matter during composting of municipal solid waste. *J. Environ. Qual.* 25: 776-785.
- Chen, Y.; Senesi, N. y Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 41: 352-358.
- Ciavatta, C.; Govi, M.; Vittori, A. L. y Sequi, P. (1990). Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *J. Chromatography*, 509: 141-146.
- Heymann, K.; Mashayekhi, H. y Xing, B. (2005). Spectroscopy analysis of sequentially extracted humic acid from compost. *Spectroscopy Letters*, 38: 293-302.
- Inbar, Y.; Chen, Y. y Hadar, Y. (1989). Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of compost organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 1965-1701.
- Kononova, M. (1966). *Soil Organic Matter*, 2th Ed. Pergamon, Oxford. 404 pp.
- Kononova, M. (1982). Bioquímica del proceso de formación del humus. En: *La materia orgánica del suelo. Su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Editorial, Oikos-Tau. Barcelona (España). p. 63-109.
- Kumada, K. (1987). *Chemistry of soil organic matter*. Elsevier, Tokyo. 241 pp.

- López, L.; Millán, F. y Lo Mónaco, S. (1999). Caracterización de ácidos húmicos extraídos de los suelos de los Llanos, Estado Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*. 25: 41-56.
- Mao, J. D.; Hu, W. G.; Schmidt-Rohr, K.; Davies, G.; Ghabbour, E. A. y Xing, B. (2000). Quantitative characterization of humic substances by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64:873-884.
- Mathur, S. P.; Diné, H.; Owen, G. y Schnitzer, M. (1993). Determination of compost biomaturity. II. Optical density of water extracts of compost as a reflection of their maturity. *Biological Agriculture y Horticulture*, 10: 87-108.
- Meissl, K.; Smidt, E.; Tintner, J.; Binner, E. y Lechner, P. (2008). A new analytical approach to determine compost quality. En: *Compost and digestate: sustainability, benefits, impacts for the environment and for plant production*. Fuchs, J. G.; Kupper, T.; Tamm, L. y Schenk, K. (Eds.). Proceedings of the international congress CODIS Solothurn, Switzerland. 27-29, February p. 39-40.
- Mosquera, C. S.; Bravo, I. y Hansen, E. W. (2007). Comportamiento estructural de los ácidos húmicos obtenidos de un suelo andisol del departamento del Cauca. *Revista Colombiana de Química*, 36 (1):31-41.
- Paolini, J. (1980). Caracterización de las sustancias húmicas extraídas de suelos típicos del bosque húmedo tropical de San Carlos de Río Negro, T.F. Amazonas. *Acta Científica Venezolana*, 31: 415-420.
- Rivero, C.; Senesi, N.; Paolini, J. y D'Orazio, V. (1998). Characteristics of humic acids some Venezuelan soils. *Geoderma*, 81: 227-239.
- Rivero, C. (2001). *La materia orgánica estable del suelo y su caracterización*. *Venesuelos* 9 (1 y 2): 5-15.
- Rupiasih, N. N. y Vidyasagar, P. B. (2007). Humic substances: structure, function, effects and applications. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 5(2): 39-47.
- Sacco, A. P. (2008). *Caracterização e estudo do comportamento térmico de ligninas extraídas de bagaço de cana-de-açúcar e dos resíduos sólidos urbanos*. Universidade Estadual Paulista, Brasil. 121 pp.
- Schnitzer, M. y Khan, S. U. (1972). Humic substances in the environment. *Marcel Dekker*, New York. Pp. 57-60.
- Senesi, N. y Brunetti, G. (1996). Chemical and physico-chemical parameters for quality evaluation of humic substances produced during composting. En: *The Science of Compost*. Bertoldi, M.; Sequi, P.; Lemmes, B. y Papi, T. (Eds.). European Commission International Symposium. Blackie Academic y Professional. Chapman y Hall, London. p. 195-211.
- Stevenson, F. J. y Goh, K. M. (1971). Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 35 (5): 471-483.
- Stevenson, F. J. (1994). *Humus Chemistry. Genesis, composition, reactions*. 2nd Edit. John Wiley y Sons. New York. 496 pp.
- Zbytniewski, R. y Buszewski, B. (2005). Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1: chemical and spectroscopic properties. *Bioresource Technology*, 96: 471-478.

Recibido: Febrero 25, 2011

Aceptado: Octubre 3, 2011