

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



“IDENTIFICACIÓN DE FENOLES SIMPLES ASOCIADOS A LA FRACCIÓN DE
ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DE CARBONES OXIDADOS NATURAL Y
ARTIFICIALMENTE”

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Aura Sánchez, como
requisito para optar al título de
Licenciado en Química.

Caracas, Septiembre de 2014

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado “Identificación de fenoles simples asociados a la fracción de ácidos húmicos extraídos de carbones oxidados natural y artificialmente”. Presentado por la Br. Aura Sánchez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Prof. Grony Garbán
Tutor

Prof. Manuel Martínez
Tutor

Prof. William Meléndez
Jurado

Prof. Luis Gómez
Jurado

A ti, madre.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la Universidad Central de Venezuela, específicamente a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Ciencias de la Tierra, por permitirme formar parte de la población que crece y aprende de su mano.

A mis tutores, Prof. Grony Garbán y Prof. Manuel Martínez, por el apoyo, asesoramiento y la paciencia necesaria para la culminación de este trabajo.

A mi madre, Aurora, por darme todas las herramientas para enfrentar de manera exitosa cada etapa de mi vida personal y académica. Por levantarme en las mañanas y por sus bendiciones en las noches.

A mi compañero de vida, Mark, por ofrecerme un hombro para llorar, una mano para levantarme y una sonrisa para continuar. Gracias, porque fuiste y eres esencial en esta meta cumplida.

A ti Dios, que me permitiste ser atleta exitosa en la carrera de la vida, atravesando la meta en el tiempo necesario para ser vencedora. Gracias.

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la identificación de compuestos fenólicos simples asociados a la fracción de ácidos húmicos extraídos de carbones oxidados natural y artificialmente, procedentes del yacimiento de Fila Maestra, Venezuela. Para ello se evaluó el rango de madurez de dos muestras de carbón, clasificadas preliminarmente como muestra fresca y muestra meteorizada, a través de la determinación del %Humedad, %Cenizas, %Material Volátil, %Carbono Fijo y el grado relativo de oxidación. Estos parámetros geoquímicos permitieron establecer una clasificación de carbón bituminoso con alto contenido de volátiles A. El proceso de oxidación artificial, realizado a la muestra fresca de carbón, por tratamiento con una corriente de aire húmedo en un sistema controlado a 80°C durante 18 días, permitió obtener un carbón oxidado, con un grado relativo de alteración mayor al de la muestra meteorizada. Fueron extraídos con solución alcalina los ácidos húmicos tanto del carbón meteorizado como el oxidado en el laboratorio, para luego identificar los posibles compuestos fenólicos liberados mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Fueron identificados y cuantificados el ácido gálico (143 ppm y 905 ppm) y la vainillina (449 ppm y 1406 ppm) en la fracción de ácidos húmicos del carbón meteorizado y oxidado en el laboratorio, respectivamente. La determinación cuantitativa permitió establecer un mayor contenido de estructuras fenólicas en la muestra oxidada artificialmente. El alto contenido de vainillina en las muestras permite proponer la presencia de vegetación gimnosperma en el material parental del carbón. Mediante comparación con datos publicados y tiempos de retención, pudo establecerse la existencia de compuestos fenólicos como ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido siríngico, tanto en el carbón oxidado como en el meteorizado, aunque con mayor concentración siempre en la muestra oxidada.

Palabras Claves: *Carbón, oxidación, ácidos húmicos, fenoles.*

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	5
3.1. Carbón.....	5
3.2. Sustancias húmicas (SH).....	10
3.3. Compuestos fenólicos.....	14
3.4. Técnicas cromatográficas para identificación y cuantificación de compuestos fenólicos	16
3.4.1. Cromatografía de gases (CG).....	16
3.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencias (HPLC).....	17
4. ANTECEDENTES.....	21
5. ZONA DE ESTUDIO.....	28
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	32
6.1. Descripción de las muestras.....	32
6.2. Tratamiento de las muestras.....	33
6.3. Análisis inmediatos.....	34
6.3.1. Humedad (ASTM D-3173).....	34
6.3.2. Cenizas (ASTM D-3174).....	34
6.3.3. Material Volátil (ASTM D-3175).....	35
6.3.4. Carbono fijo.....	36
6.4. Determinación del grado relativo de oxidación (NTC 5556).....	36
6.5. Oxidación de la muestra de carbón fresco (AAS-1).....	38
6.6. Extracción de ácidos húmicos de AAS-2 y AAS-3.....	38
6.7. Extracción de compuestos fenólicos.....	39

6.8.	Identificación y cuantificación mediante HPLC.....	40
6.9.	Identificación tentativa complementaria de compuestos fenólicos.....	41
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1.	Análisis Inmediatos.....	42
7.2.	Determinación del grado relativo de oxidación.....	44
7.3.	Oxidación de la muestra de carbón fresco (AAS-1).....	44
7.4.	Extracción de ácidos húmicos de AAS-2 y AAS-3.....	46
7.5.	Identificación y cuantificación mediante HPLC.....	48
7.6.	Identificación teórica complementaria de compuestos fenólicos.....	54
8.	CONCLUSIONES.....	59
9.	RECOMENDACIONES.....	61
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
11.	ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Evolución de la materia orgánica.....	6
Figura 2. Clasificación de las sustancias húmicas por procedimientos de extracción.....	11
Figura 3. Modelo de la estructura de los ácidos húmicos Propuesta por Stevenson.....	12
Figura 4. Modelo de la estructura de ácidos fúlvicos propuesta por Buffie.....	12
Figura 5. Representación de la fórmula estructural del fenol.....	14
Figura 6. Instrumentación general de un equipo de HPLC.....	18
Figura 7. Patrones aplicados en el análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos fenólicos de Banach-Szott.....	25
Figura 8. Ubicación de la sección tipo de la Formación Quebradón.....	29
Figura 9. Ubicación de la zona de estudio, Fila Maestra.....	30
Figura 10. Talud de la mina en Fila Maestra.....	30
Figura 11. Mantos de carbón expuestos en Fila Maestra.....	31
Figura 12. Capa de carbón fallada en la mina.....	31
Figura 13. Tipo de muestra de carbón fresco.....	32
Figura 14. Tipo de muestra de carbón meteorizado.....	33
Figura 15. Procedimiento experimental de extracción de ácidos húmicos.....	38
Figura 16. Sistema HPLC Agilent Serie 1200.....	40
Figura 17. Cromatograma de patrones de ácido gálico y vainillina.....	49
Figura 18. Cromatograma de patrón de ácido salicílico.....	50
Figura 19. Cromatograma del extracto fenólico de la muestra AAS-2.....	50
Figura 20. Cromatograma del extracto fenólico de la muestra AAS-3.....	51

Figura 21.	Gráfico del porcentaje de variación de los tiempos de retención experimentales con respecto a los tiempos de retención de Banach-Szott.....	55
Figura 22.	Identificación tentativa, cromatograma del extracto fenólico de AAS-2.....	57
Figura 23.	Identificación tentativa, cromatograma del extracto fenólico de AAS-3.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cambios composicionales de los carbones conforme aumenta su rango.....	9
Tabla 2. Clasificación de los carbones según la ASTM.....	9
Tabla 3. Composición química de carbón fresco y oxidado.....	10
Tabla 4. Identificación de las muestras.....	32
Tabla 5. Parámetros para determinación del grado relativo de oxidación de carbón.....	37
Tabla 6. Cantidad de ácidos húmicos empleada en la hidrólisis.....	40
Tabla 7. Análisis inmediato de las muestras.....	42
Tabla 8. Grado de oxidación relativo de las muestras de carbón.....	44
Tabla 9. Proceso de oxidación de AAS-1.....	45
Tabla 10. Rendimiento de extracción de AH y porcentaje de residuo insoluble.....	46
Tabla 11. Análisis cualitativo de patrones de fenoles por HPLC.....	49
Tabla 12. Cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC.....	52
Tabla 13. Variación de los tiempos de retención de los patrones En función de los reportados por Banach-Szott.....	55
Tabla 14. Valores teóricos de los tiempos de retención calculados a partir de la ecuación de la curva (Figura 21).....	56
Tabla 15. Tiempos de retención de compuestos fenólicos identificados tentativamente.....	57

1. INTRODUCCIÓN

El carbón es una roca sedimentaria originada por la transformación de materia orgánica mediante procesos diagenéticos que pueden durar millones de años. No todos los carbones poseen las mismas características, la materia orgánica de origen, las condiciones de formación y el tiempo de maduración del mismo son algunas de las variables que determinan sus propiedades. La explotación y uso del carbón ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de la humanidad por ser una fuente abundante y segura de energía. Las reservas de carbón son extensas y están presentes en muchos países; la seguridad brindada por su estabilidad al transportar, almacenar y utilizar lo han convertido en uno de los mayores recursos energéticos del mundo [1].

En Venezuela la explotación de carbón comenzó en el año 1850 en las minas de Naricual (Estado Anzoátegui), pero su verdadera importancia surgió a mediados del siglo XX cuando la explotación tomó vida comercial, convirtiéndose así en el país con las segundas mayores reservas de carbón en Sudamérica [1]. Venezuela cuenta con yacimientos carboníferos que agrupan a los carbones de la categoría sub-bituminoso a lignitos, con un alto contenido de volátiles [2]. La mayor parte del carbón producido en Venezuela es de tipo energético, y debido a que el consumo nacional es muy limitado, un alto porcentaje del producto es destinado a la exportación [1]. Parte de las divisas que ingresan al país por este concepto deberían ser invertidas en investigación con el fin de obtener derivados de mayor valor agregado a partir del carbón. En ese orden de ideas se han propuesto varias líneas de investigación y de desarrollo tecnológico orientadas hacia ese fin.

Entre las propuestas que han surgido en el país para redirigir el uso del carbón se encuentra la generación de electricidad, mediante la construcción de plantas carboeléctricas. Igualmente se propone el uso de tecnologías como la licuefacción del

carbón para la producción de gasolinas, aceites, ceras y otros productos. En adición a las anteriores, se encuentra la posibilidad de recolectar el gas metano presente en los yacimientos de carbón con el fin de utilizarlo como fuente de energía. Finalmente, una de las aplicaciones más promisorias que ha sido desarrollada en las últimas décadas, el uso de las sustancias húmicas extraídas del carbón para fines agrícolas [1].

Mediante la aplicación de tratamientos previos, sustancias derivadas del carbón pueden ser empleadas en la agricultura. Cuando el carbón aflora a la superficie terrestre es sometido a nuevas condiciones de presión, temperatura y reactividad, las cuales propician cambios químicos que alteran los carbones por oxidación, y dan así origen a las sustancias húmicas regeneradas.

Las sustancias húmicas representan los constituyentes más activos de la materia orgánica del suelo, en término de sus funciones ambientales y agroecológicas, y son consideradas tradicionalmente como una fuente de nutrientes de liberación lenta para plantas y una reserva de coloides orgánicos con un papel principal en la regulación de procesos de nutrición de vegetales, movilidad de iones tóxicos y en la agregación, estructura y capacidad de retención hídrica del suelo. Desde el punto de vista ambiental existe un interés en el estudio de estas sustancias, pues son fuente de conocimiento ambiental (evaluación del impacto ambiental) y actúan como constituyentes activos del suelo [3].

Los fertilizantes son sustancias agregadas al suelo para aportar los nutrientes necesarios, con la finalidad de brindar un mejor crecimiento a las plantas. Sin embargo, se ha demostrado que, a largo plazo, contribuyen al agotamiento de la capacidad regeneradora natural del suelo [4]. En la actualidad, el empleo de los ácidos húmicos como sustituyente de los fertilizantes químicos es un gran avance en el mundo de la agricultura. Estos ácidos poseen una estructura molecular que brinda una importante

aplicabilidad en la producción de cultivos y sus propiedades le permiten ser utilizados como acondicionadores y estimulantes para el crecimiento de las plantas [5]. Los ácidos húmicos activan los procesos bioquímicos en plantas, tales como la respiración (fotosíntesis), con lo que se incrementa el contenido de clorofila, la adsorción de nutrientes, el crecimiento de organismos del suelo, el desarrollo de las raíces, la calidad y el rendimiento de muchas plantas [4] [6].

Una interrogante sujeta al uso de los ácidos húmicos como fertilizantes es el contenido de ácidos fenólicos asociados a éstos. Los compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios, y en plantas superiores actúan en contra del ataque de patógenos y han sido implicados como agentes alelopáticos [7] [8]. Pero también son compuestos tóxicos que, dependiendo de su concentración, podría perjudicar a las plantas. El proceso de oxidación de carbón implica la incorporación de grupos funcionales a la estructura molecular, ruptura y formación de nuevos enlaces, y el camino de la oxidación (natural o artificial) puede influir en el tipo de sustancias que son generadas y en la concentración de las mismas. En consecuencia a lo anteriormente expuesto, en la presente trabajo de investigación se realiza un estudio comparativo de caracterización de los compuestos fenólicos asociados a los ácidos húmicos extraídos de carbones venezolanos oxidados natural y artificialmente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Comparar la identidad y concentración de los compuestos fenólicos simples asociados a la fracción de ácidos húmicos extraída de carbones oxidados natural y artificialmente.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar el grado de oxidación de las muestras de carbón alterado naturalmente y en el laboratorio, utilizando técnicas fotolorimétricas.
2. Extraer y cuantificar los ácidos húmicos de los carbones alterados.
3. Identificar y cuantificar los fenoles simples extraídos de los ácidos húmicos de los carbones oxidados (natural y artificialmente), empleando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
4. Interpretar los resultados de concentración e identidad de los fenoles extraídos de carbones alterados en función de la forma de oxidación.

3- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A continuación se desarrollan algunos conceptos fundamentales para la comprensión del presente trabajo de investigación. Se inicia con una descripción del origen del carbón y sus características para posteriormente describir el proceso de oxidación del mismo y las sustancias húmicas como productos de oxidación. Seguidamente se presentan aspectos relacionados a los compuestos fenólicos y las técnicas de análisis de los mismos, finalizando con la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

3.1. Carbón

El carbón mineral es definido como una roca sedimentaria combustible, compuesta por más de 50% en peso y 70% en volumen de materia orgánica [9]. Proviene de la fosilización de restos orgánicos vegetales, está localizado generalmente bajo una capa de arena, lutita o arcilla, y es utilizado como combustible fósil debido a su alto contenido de carbón [10].

El carbón es formado a partir de la litificación (compactación de sedimentos y transformación en roca sedimentaria) de restos orgánicos. Diversos materiales orgánicos de naturaleza vegetal como hojas, maderas, raíces y esporas, provenientes de los abundantes bosques, fueron depositados en las aguas colindantes a las orillas costeras o muchas veces pantanosas. Estos restos orgánicos sufren una lenta descomposición por la acción de bacterias anaerobias, las cuales transforman los componentes vegetales en la turba (materia orgánica producto de la degradación bacteriana). Posteriormente se produce una compactación, debido a la presión de las capas sucesivas, que junto con la temperatura, culmina en un enriquecimiento en carbono y la pérdida de nitrógeno, oxígeno y humedad [10] [11] [12].

La evolución de la materia orgánica para la generación del carbón, ocurre en dos etapas (Figura 1). La primera es llamada diagénesis temprana o sindiagénesis, donde comienzan a depositarse los restos orgánicos y la actividad microbiana se convierte en el principal agente de transformación de la materia orgánica. Los microorganismos anaeróbicos degradan, mediante procesos enzimáticos las biomoléculas, generando nuevos constituyentes denominados geopolímeros [13]. La segunda etapa es la catagénesis de la materia orgánica, en ella ocurren una serie de cambios producto del incremento de la temperatura, presión y tiempo. Esta etapa es llevada en períodos de tiempos más largos que la etapa anterior, y es en ella donde comienza la etapa de carbonificación o madurez térmica del carbón. El resultado de este proceso implica pérdida de agua, pérdida de grupos funcionales oxigenados, sulfurados y nitrogenados, polimerización, craqueo y aromatización progresiva [14].

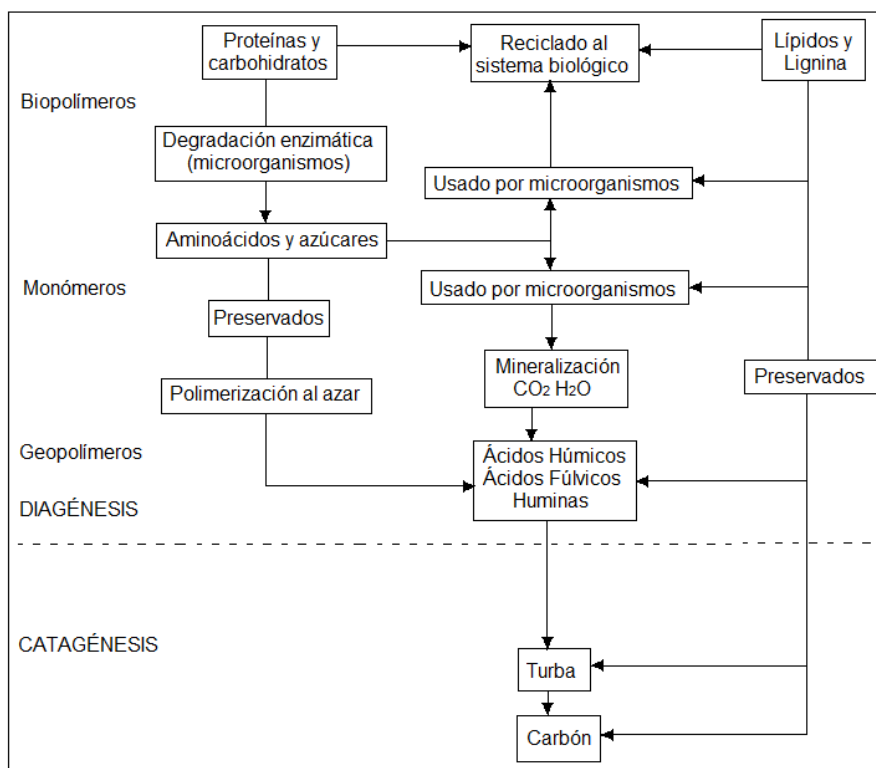


Figura 1. Evolución de la materia orgánica [14]

El carbón no solo está compuesto por carbono, existen otros elementos en este mineral que de alguna u otra forma alteran su comportamiento como combustible. Estos componentes son [10] [11] [15]:

- *Carbono*: Es el componente químico mayoritario; se encuentra formando núcleos aromáticos policondensados y se considera la base de la estructura orgánica del carbón. Su contenido varía entre un 60 y 95%.
- *Hidrógeno*: Su contenido es bajo, entre 1 y 8%; se encuentra unido al carbón en mayor proporción que al oxígeno y nitrógeno. Los enlaces carbono-hidrógeno y carbono-carbono son los responsables del alto contenido energético del carbón.
- *Nitrógeno*: Está presente en las estructuras orgánicas principalmente como heterociclos aromáticos y aminas. Su contenido oscila entre 1,5 y 2%.
- *Oxígeno*: Se halla en la estructura carbonosa esencialmente formando fenoles, alcoholes, éteres y en grupos carboxilo con una concentración de 6 a 15%, y su aumento reduce el poder calorífico ya que favorece la conservación de humedad.
- *Azufre*: Se encuentra en la matriz orgánica del carbón formando estructuras del tipo tioéteres, tioles y tiofenos. También puede existir en forma inorgánica, principalmente como piritita (sulfuro ferroso).
- *Componentes minerales*: La matriz mineral del carbón está constituida por minerales de arcilla, piritita y cuarzo. La presencia del cuarzo y las arcillas es de origen fortuito, por lo que son consideradas como impurezas del carbón. Por el contrario, la piritita es el producto directo de la reducción llevada a cabo bajo las condiciones de acumulación y formación de turba. Químicamente hablando, la materia mineral la constituyen elementos como aluminio, titanio, sodio, magnesio, hierro, silicio, calcio y potasio.

Las concentraciones de los elementos mayoritarios (C, H, N, O) en general, varían según el rango evolutivo del carbón (Tabla 1). Así los carbones menos evolucionados (lignitos) son ricos en oxígeno (25%-30%) y pobres en carbono (50%-60%), mientras los

de mayor rango (antracitas) están constituidos en más del 95% por carbono, y el contenido de hidrógeno y oxígeno es muy bajo (1% y 2%, respectivamente) [11].

Los cambios físicos y químicos en la materia orgánica durante el proceso de soterramiento, ocurren de manera gradual y se vuelven más intensos a medida que los parámetros temperatura y presión se incrementan. Estos cambios generan diferencias de aspecto, textura, composición y propiedades, y de esta manera surgen las distintas clases de carbones. Según la *American Society for Testing Materials* (ASTM) [16], el carbón se divide en cuatro tipos (Tabla 2).

En orden creciente de evolución se encuentra en primer lugar el **lignito**, que presenta un bajo contenido de carbono fijo y alto contenido de humedad. Es un carbón de baja calidad ya que la gran cantidad de agua que posee (40%) impide utilizarlo como combustible [17] [18]. Seguidamente se ubica el carbón de tipo **sub-bituminoso**, el cual es de color negro y se desmorona por acción del aire y de la humedad. Contiene gran cantidad de material volátil y es excelente para generar gases y alquitranes por destilación [18]. En el siguiente escalón se sitúa el carbón **bituminoso**, el cual se utiliza en la obtención de coque, un material poroso necesario en la producción de acero; y también se conoce como carbón térmico, usado en la producción de vapor para generación de energía [1]. Finalmente se encuentra la **antracita**; esta clase de carbón es la de mayor rango. Tiende a ser de color gris plomo y brillante, homogénea, posee alto contenido de carbono, se enciende lentamente y arde a altas temperaturas [18].

Tabla 1. Cambios composicionales de los carbones conforme aumenta su rango [11].

Variedad	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno	Oxígeno
Turba	50-60	8-18	4	20-35
Lignito	60-72	6-9	2-3	12-20
Sub-bituminoso	72-80	5-7	1,5	5-12
Bituminoso	80-95	1-5	1-1,5	2-5
Antracita	>95	1	1-1,5	2

Tabla 2. Clasificación de los carbones según la ASTM [16].

Clase	Grupo	Carbono fijo ¹	Materia volátil ²	Poder calorífico	
				BTU/lb	KJ/Kg
Antracita	1. Meta-antracita	>98	<2		
	2. Antracita	92-98	2-8		
	3. Semi-antracita	86-98	8-14		
Bituminoso	1. Bajo cont. volátiles	78-86	14-22		
	2. Med. cont. volátiles	69-78	22-31		
	3. Alto cont. volátiles (A)	<69	>31	≥14000	≥32.564
	4. Alto cont. volátiles (B)			13000-14000	30.238-32.564
	5. Alto cont. volátiles (C)			11500-13000	26.749-30.238
Sub-bituminoso	1. Sub-bituminoso A			10500-11500	24.423-26.749
	2. Sub-bituminoso B			9500-10500	22.097-24.423
	3. Sub-bituminoso C			8300-9500	19.306-22.097
Lignito	1. Lignito A			6300-8300	14.654-19.306
	2. Lignito B			<6300	14.654

¹ % referido a una base exenta de volátiles.

² % sobre base seca.

La oxidación del carbón es un proceso que puede ocurrir de forma natural, por la acción de la humedad y el oxígeno de la atmósfera, o artificialmente mediante un proceso controlado en el laboratorio. En ambos casos la oxidación trae consigo un cambio en la composición del carbón ya que a medida que avanza tiene lugar el enriquecimiento en oxígeno y empobrecimiento en hidrógeno, carbono y nitrógeno (Tabla 3).

Tabla 3. Composición química de carbón fresco y oxidado [18].

Elemento	Carbón fresco	Carbón oxidado
C	61,85	49,86
H	4,13	3,83
O	7,37	15,10
N	1,37	1,16
S	4,58	3,98
Cenizas	20,70	26,02

Algunos de los cambios asociados al proceso de oxidación se traducen en aumento de la concentración de oxígeno, aumento de la hidrofiliidad y aumento del número de grupos funcionales éter, peróxido, carbonilo, carboxilo, fenólicos y quinonas en la estructura del carbón [18]. En el proceso de litificación, se pierden cadenas alifáticas laterales, grupos funcionales como carboxilo y fenólicos, aumentando así el contenido de carbono y la aromaticidad [11]. La oxidación natural o en el laboratorio reintegra estos grupos funcionales regenerando así las sustancias húmicas.

3.2. Sustancias húmicas (SH)

Las sustancias húmicas son los principales componentes de la materia orgánica natural en el suelo y agua, así como en depósitos geológicos, tales como los sedimentos lacustres, turbas, carbones pardos y lulitas [19]. La SH son macromoléculas constituidas por átomos de carbono alifáticos y aromáticos, sustituidos principalmente por grupos oxigenados (carboxilo, hidroxilo, carbonilo) y nitrogenados (aminas y amidas) [20]. Proviene de la degradación química y biológica de la materia orgánica y la actividad sintética de microorganismos. El material alterado química y biológicamente puede ser sometido a reacciones de policondensación, y estas reacciones traen como consecuencia la formación de materiales más complejos denominados sustancias húmicas. Estas sustancias están formadas por una mezcla heterogénea producto de las policondensaciones de sustancias complejas. Su clasificación, debido a la complejidad de sus estructuras, se basa en términos de origen o de procedimientos de extracción

(Figura 2). Operacionalmente las sustancias húmicas, de acuerdo a su solubilidad relativa en solventes diversos, se clasifican en ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas [20].

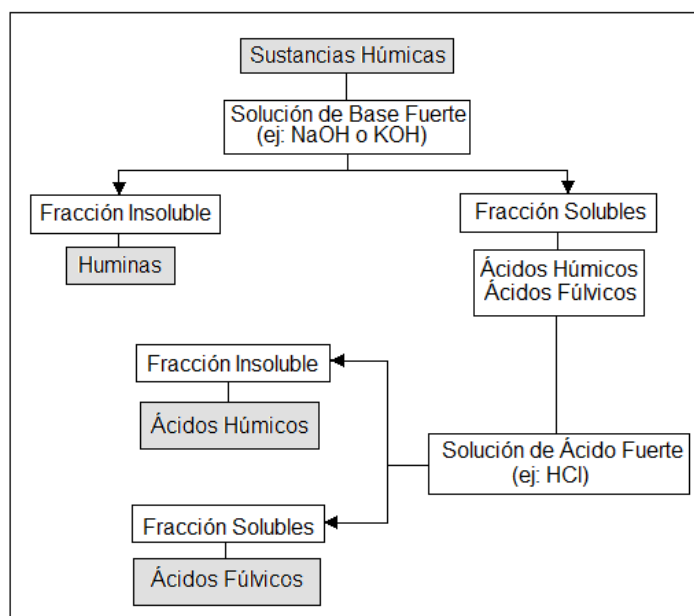


Figura 2. Clasificación de las sustancias húmicas por procedimiento de extracción

Los *ácidos húmicos* son polímeros complejos de alto peso molecular con núcleos vecinos (grupos radicales) que permiten capturar iones del medio circundante o una mayor polimerización (Figura 3). Desde el punto de vista operacional pueden ser definidos como compuestos solubles en soluciones bases fuertes (NaOH o KOH) y precipitan en presencia de un ácido fuerte (HCl). Existen dos tipos de AH, los pardos y los grises. Los primeros son poco estables y presentan un bajo contenido de nitrógeno en forma amínica ($-\text{NH}_2$); los segundos se forman por la acción de microorganismos del suelo, tienen mayor contenido de nitrógenos y forman complejos órgano-minerales (arcillas-humus) muy estables [21] [22] [23].

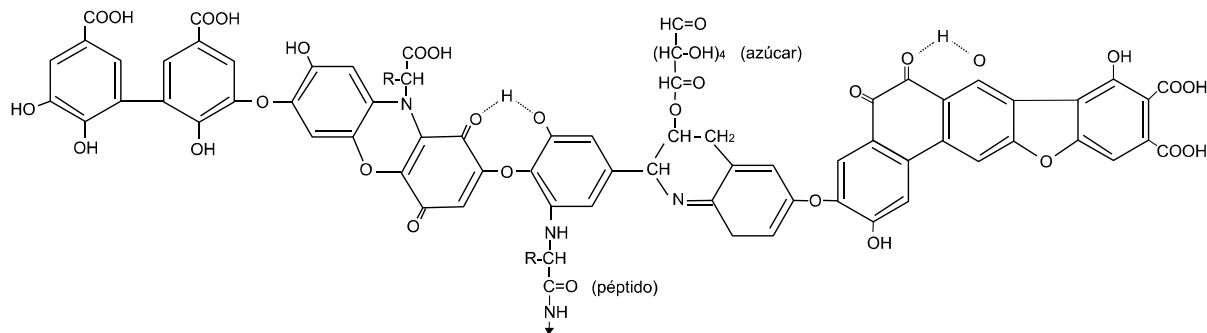


Figura 3. Modelo de la estructura de los ácidos húmicos propuesta por Stevenson (1982) [21].

Los *ácidos fúlvicos* están formados, principalmente, por ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Figura 4). Operacionalmente se definen como la fracción presente en las sustancias húmicas que es soluble en soluciones de bases fuertes y ácidos fuertes [22] [24].

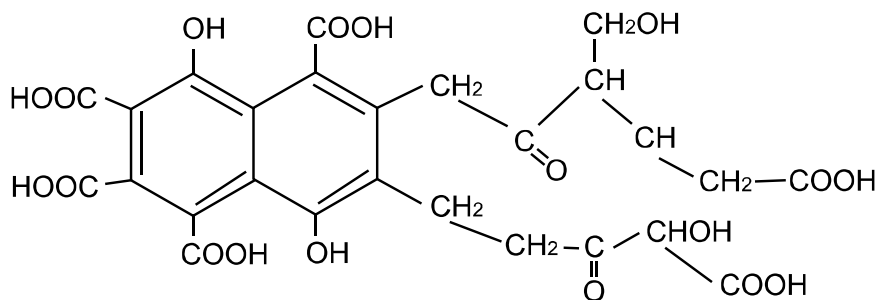


Figura 4. Modelo de la estructura de los ácidos fúlvicos propuesta por Buffie (1987) [24].

Las *huminas* están formada por polímeros de alto peso molecular. Son muy resistentes al ataque microbiano. Se producen por condensaciones de sustancias orgánicas, pero también pueden producirse por transformaciones de sustancias no húmicas del suelo como ácidos orgánicos, azúcares aminados, etc. Estos compuestos no pueden ser extraídos ni por acción de soluciones básicas ni por soluciones ácidas fuertes [19] [23].

La mayoría de la información sobre los AH, AF y huminas, se refiere a propiedades promedios. Las propiedades exactas y la estructura de una muestra de sustancias húmicas, depende de la fuente (agua o suelo) y de las condiciones específicas de extracción. Sin embargo, las propiedades promedio de los AH, AF y huminas de diferentes fuentes son notablemente similares [19]

Naturalmente, los ácidos húmicos están presentes en carbones de bajo rango evolutivo y carbones meteorizados. Estos ácidos también pueden obtenerse de la oxidación artificial de carbones, los cuales son llamados ácidos húmicos regenerados (AHR) pues provienen de un proceso regenerativo que abarca la incorporación de los grupos funcionales perdidos en el proceso de litificación. Los ácidos húmicos están constituidos por carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre en diferentes proporciones [20] y la heterogeneidad en su composición representa un desafío para los investigadores. A pesar de la complejidad de su estructura se conoce una serie de propiedades de estos ácidos que los hacen altamente atractivos en el área industrial. Estas sustancias actúan en las plantas promoviendo la absorción de los nutrientes, aumentando el crecimiento, estimulando la germinación, y a su vez manteniendo el pH de los suelos, aumentando la capacidad de retención de agua de los mismos y ayudando a la fijación de los abonos [25] [26], por lo que el uso de los ácidos húmicos en los cultivos representa una acción favorable para la industria agrícola. Asimismo, las propiedades de los ácidos húmicos como la capacidad de quelación, capacidad de intercambio iónico, efecto floculante y absorción de compuestos orgánicos los involucra en tratamientos de aguas residuales.

3.3. Compuestos fenólicos

Uno de los compuestos que constituyen los ácidos húmicos son las sustancias fenólicas. Los fenoles son compuestos aromáticos que contienen grupos hidroxilo ligados directamente al anillo aromático (Figura 5). Generalmente los fenoles son nombrados como derivados del miembro más sencillo de la familia, que es el fenol, pero en ocasiones, son denominados hidroxicompuestos. Los fenoles abundan en la naturaleza y funcionan como intermediarios en síntesis industriales de diversos productos como adhesivos y antisépticos. Por otra parte, poseen algunas características semejantes a los alcoholes debido al grupo hidroxilo (-OH). Sin embargo, las propiedades de estos compuestos son bastante diferentes y por tal razón deben estudiarse como una familia distinta.

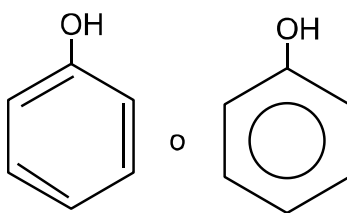


Figura 5. Representación de la fórmula estructural del fenol

La mayor parte de los derivados fenólicos se obtienen a partir del fenol, que a su vez se sintetiza a partir de benceno, considerándose el fenol uno de los principales compuestos aromáticos sintéticos. A pesar de que compuestos como fenol y metilfenoles pueden obtenerse del alquitrán de la hulla, las reacciones de síntesis son su principal fuente de producción [27]. Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión con puntos de ebullición bastante elevados. Generalmente son incoloros, sin embargo, el grupo nitro es capaz de darles coloración, además se oxidan con facilidad y por tal razón tienden a encontrarse coloreados.

A diferencia de los alcoholes, los compuestos fenólicos poseen características ácidas. Tal acidez le confiere la solubilidad en soluciones básicas diluidas y permite la separación de un componente fenólico de una matriz por medio de un proceso de extracción ácido-base.

La toxicidad de los compuestos fenólicos es conocida desde hace muchos años debido a su utilización como desinfectante [27]. La presencia de compuestos fenólicos en aguas puede llegar a afectar a comunidades y poblaciones acuáticas. Para los seres humanos, los fenoles son corrosivos cutáneos y se absorben con facilidad por la piel y las mucosas, provocando un cuadro general caracterizado por fallo hepático y renal. El efecto crónico se presenta a largo plazo debido a la permanencia de los compuestos fenólicos en los organismos y la toxicidad aguda se presenta en períodos cortos de tiempo, caracterizada por una intoxicación que produce la muerte del organismo.

La gama de aplicabilidad de los compuestos fenólicos los hace cada vez más atractivos en la industria. Entre los usos más frecuentes se encuentran [27]:

- Conservantes para madera: la acción fungicida permite aplicarlos como conservantes de madera.
- Plásticos, resinas y plastificantes: el fenol y sus derivados sencillos se emplean para fabricación de resinas para revestimientos.
- Colorantes: la formación de complejos en reacciones de copulación genera sustancias coloreadas.
- Detergentes: se utilizan en la fabricación de detergentes por su actividad superficial.
- Desinfectantes: la actividad desinfectante es debida a su acción superficial y coagulante.
- Medicamentos, perfumes y sabores.

- Explosivos: algunos fenoles tienen propiedades detonantes.

Debido al gran uso de estos compuestos, se ha vuelto de interés el análisis y caracterización de los mismos en distintas áreas de investigación. Entre las técnicas más destacadas para la determinación de fenoles, se encuentran la Cromatografía de Gases y la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

3.4. Técnicas cromatográficas para identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

3.4.1. Cromatografía de Gases

Los métodos cromatográficos permiten la determinación individual de cada fenol y en general son más sensibles y selectivos que la espectrofotometría UV-VIS. La cromatografía de gases es una técnica ampliamente empleada para determinación de fenoles, debido a la eficacia en la separación, rapidez del análisis y sensibilidad. Aunque la baja presión de vapor de los fenoles dificulta su análisis por ésta técnica, existen muchos métodos para su determinación por cromatografía de gases. En esta técnica la muestra es volatilizada e inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil (gas inerte) que no interactúa con el analito, a diferencia de otras cromatografía; su función es únicamente la de transportarlo a través de la columna. La retención del analito en la columna se produce por la interacción con la fase estacionaria. En la cromatografía gas-sólido los fenómenos de adsorción física generan un patrón de retención que permite la separación de cada componente de la muestra. Mientras que en la cromatografía gas-líquido, la distribución del analito entre la fase móvil (gas inerte) y la estacionaria (líquido soportado en fase sólida inerte) es la responsable de la separación [28].

3.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia se ha utilizado ampliamente para la determinación de fenoles [27]. En HPLC el analito pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar se introduce en pequeñas cantidades y sus componentes interactúan y se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria. El requerimiento de altas presiones para alcanzar el caudal de eluyente adecuado trae como consecuencia que el equipo necesario para HPLC sea más sofisticado y costoso que el utilizado para otras cromatografías [28].

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia son (Figura 6) [28]:

- *Recipiente para la fase móvil:* un equipo moderno de HPLC contiene uno o varios recipientes con capacidad de 200 a 1000 mL. Los recipientes están conectados a un desgasificador para eliminar los gases disueltos en los solventes.
- *Sistema de bombeo:* un sistema de bombeo óptimo debe cumplir con requisitos como generación de presiones por encima de 6.000 psi, flujo libre de pulsaciones, intervalo de caudales de 0,1 a 1 mL/min, control y reproducibilidad del caudal.
- *Sistema de inyección de muestra:* utiliza bucles de muestras, algunos son intercambiables desde 5 a 500 μ L.
- *Columna:* generalmente son tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque se pueden encontrar de paredes de vidrio resistentes.
- *Rellenos:* existen dos tipos de rellenos, pelicular y de partícula porosa. El primero es empleado ampliamente en las precolumnas y no en las columnas analíticas. Las

partículas porosas son de diámetros entre 3 y 10 μm de materiales como sílice, alúmina, resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico.

- **Detectores:** en HPLC no existen detectores tan universalmente aplicables como en cromatografía de gases. Los detectores se basan en respuestas a una propiedad de la solución (índice de refracción, constante dieléctrica o densidad) o en una propiedad de soluto (absorbancia en UV, fluorescencia) que no son inherentes a la fase móvil.

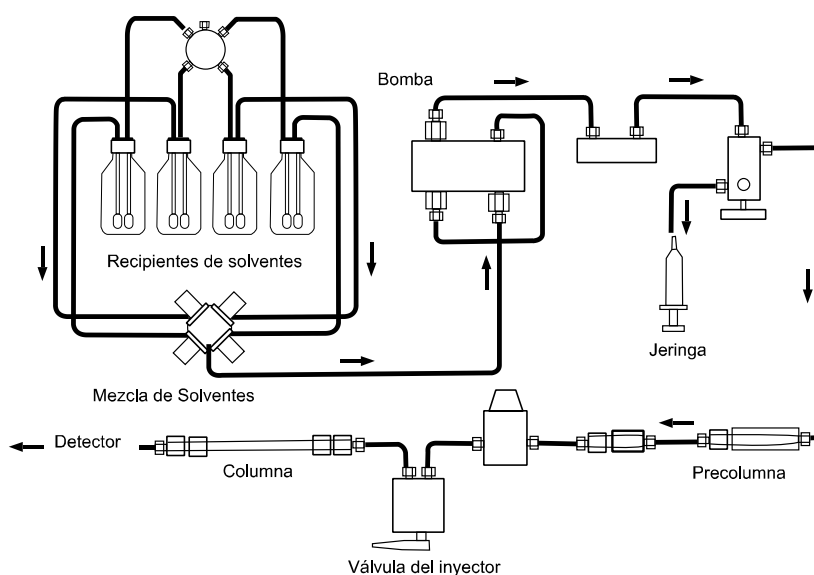


Figura 6. Instrumentación general de un equipo de HPLC [29]

La cromatografía líquida de alta eficiencia se aplica en diferentes modalidades, dependiendo de las características del análisis. Existen cuatro tipos de cromatografía líquida de alta eficiencia [30], cromatografía de reparto, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión.

La *cromatografía líquida de reparto* involucra una fase estacionaria líquida, que puede estar dispersa sobre un material inerte, o unida químicamente al mismo. La muestra a analizar se dispersa en la fase móvil y se reparte entre la fase móvil y la

estacionaria de acuerdo a su coeficiente de partición. El efecto que se logra es que la fase estacionaria es despojada poco a poco del soluto por la fase móvil, resultando un cambio en los tiempos de retención de cada analito en la columna. En cromatografía de reparto se puede trabajar en fase normal, empleando una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar o poco polar; o en fase inversa, que sería utilizar una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar.

En *cromatografía de adsorción*, la separación es llevada a cabo con una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida, la cual adsorbe reversiblemente las moléculas de soluto. La fase estacionaria puede ser polar, cuando la fase móvil es no polar, o no polar cuando sea utilizada una fase móvil polar. Las moléculas del soluto compiten con las moléculas de solvente por los sitios de adsorción mediante una serie de equilibrios. Con la finalidad de que sea adsorbida una molécula de soluto, una molécula de solvente debe ser desplazada. Si se asume que el adsorbente posee una superficie polar, los componentes no polares tendrán poca afinidad por la superficie y no competirán con el solvente, lo que se traduce en que no serán retenidos en la columna.

La *cromatografía líquida de intercambio iónico* involucra un proceso de sustitución de especies iónicas por otras. La fase estacionaria consiste en una matriz rígida, cuya superficie lleva una carga neta (positiva o negativa) que genera los sitios de intercambio, y un contra-ión intercambiable. El sitio de intercambio atraerá y mantendrá al contra-ión de la matriz y a los contra-iones en solución, la atracción entre los iones definirá la retención en la columna.

La *cromatografía de exclusión molecular*, separa sustancias de acuerdo al tamaño y forma de sus moléculas. Las moléculas pequeñas quedan en los poros de la fase estacionaria y las moléculas grandes pasan libremente a través de la columna. Así, las moléculas de mayor tamaño serán eluidas más rápidamente.

La técnica de HPLC se utiliza para la determinación de muestras complejas de fenoles, pero debido a que las concentraciones en algunas muestras son bajas, es necesario llevar a cabo un proceso previo de extracción o destilación [27]. Se han empleado varias fases estacionarias; sin embargo, las que han dado mejores resultados son las de fases inversa y otras poco utilizadas de fase normal [27]. Los detectores más utilizados para un análisis de fenoles por HPLC es el detector ultravioleta, por su respuesta selectiva a 254 nm y 280 nm [27]. La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia permite la determinación de fenoles a bajas concentraciones, siendo posible disminuir los límites de detección a niveles de $\mu\text{g/L}$ e incluso ng/L [27].

4. ANTECEDENTES

A continuación se presentarán en orden cronológico algunos trabajos relacionados con la extracción y caracterización de las sustancias húmicas provenientes de carbones, técnicas de oxidación de carbones e identificación de fenoles en sustancias húmicas.

Schwartz *et al.* (1968), realizaron un estudio para la extracción de ácidos húmicos de una fuente natural, como leonardita (forma oxidada del lignito), y de carbones artificialmente oxidados. Encontraron que, el rendimiento de los ácidos húmicos extraídos de ambas fuentes aumentaba de 8% a alrededor de 20% cuando se empleaba una solución básica de una sal de sulfito (preferiblemente una sal de metal alcalino como sodio o potasio) en lugar de la tradicional extracción con hidróxido de sodio. Además, los ácidos húmicos extraídos con la solución de sulfito presentaron la propiedad de permanecer en solución con pH alrededor de 4,5, lo que aumenta su aplicabilidad en el mundo de la agricultura [31].

Kögel *et al.* (1985), caracterizaron la lignina de las capas de humus de suelos de bosques a través de sus productos de oxidación con óxido cúprico empleando HPLC. Para el análisis utilizaron como muestras los restos de angiospermas y gimnospermas, en los que identificaron 8 compuestos fenólicos. Los productos de oxidación estuvieron dominados por la presencia de compuestos de tipo aldehído (65,6 - 72,5%) [32].

Calemma *et al.* (1993), desarrollaron y patentaron un proceso para la producción de ácidos húmicos regenerados a partir de carbón empleando una oxidación continua, con oxígeno o aire en fase seca, en un lecho fluidizado. Utilizaron carbones de tipo lignito, sub-bituminoso y bituminoso que fueron sometidos a dos etapas de oxidación, una

preliminar y una posterior oxidación del carbón pre-tratado. La oxidación preliminar, fue una oxidación bajo leves condiciones de presión, temperatura y tiempo de reacción que elimina la cantidad de hidrógeno reactivo en 5 hasta 25% de su valor inicial, y la segunda oxidación fue en condiciones más fuertes para producir los ácidos húmicos. Emplearon diferentes valores en los parámetros temperatura, presión de oxígeno y tiempo de reacción para determinar las condiciones óptimas para la producción de ácidos húmicos. Encontraron un mayor rendimiento en la producción bajo las siguientes condiciones: para la primera etapa, temperaturas de 150–200°C, presión parcial de oxígeno entre 0,21 y 6 atm, y tiempo de reacción de 10-120 min. La segunda etapa mostró mejores rendimientos bajo condiciones de temperatura entre 180-300°C, presión parcial de oxígeno de 0,21-6 atm y tiempo de reacción entre 30 y 600 minutos [33].

Contreras, (1997), realizó un estudio de los ácidos húmicos extraídos de un carbón sub-bituminoso venezolano, bajo condiciones variables de temperatura y tiempo, así como de los ácidos húmicos regenerados obtenidos a partir de la oxidación del carbón con permanganato de potasio en medio alcalino bajo condiciones variables de temperatura, tiempo y relación carbón/KMnO₄. Los Ácidos Húmicos (AH) y los Ácidos Húmicos Regenerados (AHR) fueron caracterizados por medio de técnicas espectroscópicas de RMN ¹H y FT-IR, y el análisis elemental. Concluyó que el aumento en la temperatura y el tiempo incrementan el rendimiento de extracción, así para 80°C y 24h obtuvo 2,35% mientras que para 26°C y 6h 1,10%. También determinó que la relación carbón/KMnO₄ y la temperatura de oxidación, influyen en el porcentaje de extracción de ácidos húmicos regenerados, argumentando que el exceso de oxidante y altas temperaturas favorecen la ruptura de los ácidos húmicos regenerados y los hace susceptible a una degradación oxidativa, disminuyendo el porcentaje de extracción. La caracterización de los AH y AHR demostró que están constituidos por grupos ácidos carboxílicos, sistemas aromáticos y poliaromáticos, y cadenas alifáticas. Adicionalmente

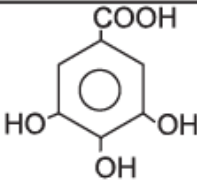
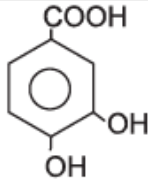
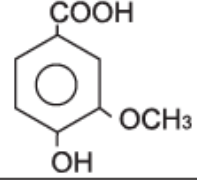
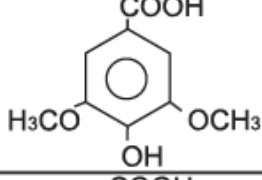
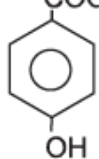
encontró que el contenido de oxígeno en los AHR es mayor que en los AH, debido a la cantidad de grupos funcionales ácidos regenerados en la oxidación [18].

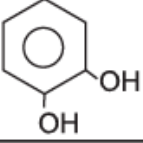
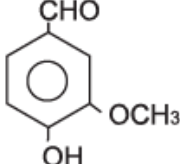
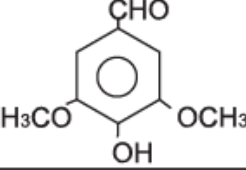
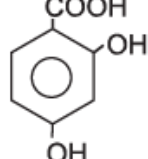
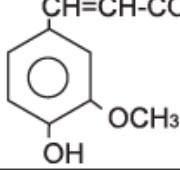
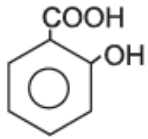
Olivella *et al.* (2002), realizaron el estudio de la fracción de ácidos húmicos de leonarditas encontradas en Torrelapaja, España, utilizando cromatografía de gases (CG-MC) y técnicas espectroscópicas (XPS, XANES), para caracterizar la estructura del carbón y la naturaleza de los compuestos de azufre que se encuentran presentes en este. En este trabajo se encontraron en la estructura de ácidos húmicos de la leonardita, productos de los compuestos como el tiofeno, metiltiofeno y benzotiofenos. Además encontraron compuestos benzocarboxílicos y derivados fenólicos provenientes de la lignina, demostrando así que la predominancia de las formas oxidadas de azufre está ligada a la naturaleza oxidada de la leonardita estudiada [34]

Fong *et al.* (2006), realizaron un estudio para caracterizar los ácidos húmicos derivados de carbón natural y carbón tratado con ácido nítrico, para evaluar sus propiedades como acondicionadores de suelos. Establecieron que utilizar extractantes y concentraciones diferentes influye en el rendimiento de extracción y las características de los ácidos húmicos, variando el contenido de cenizas, su acidez total, la presencia de fenoles y grupos carboxílicos. Los ácidos húmicos con alto contenido de grupos funcionales ácidos y bajo contenido de cenizas son eficientes para la actividad biológica de las plantas y el suelo. El estudio develó que el tratamiento de carbón con ácido nítrico mejoró las características de los ácidos húmicos y el rendimiento de la extracción para ser empleados en la agricultura [35].

Banach-Szott, (2007), definió cualitativa y cuantitativamente los compuestos fenólicos presentes en los extractos de ácidos fúlvicos y húmicos aislados de suelo forestal. Empleando HPLC, determinó la identidad y concentración de 11 compuestos fenólicos (Figura 7), entre ellos compuestos de tipo vanílicos (vainillina y ácido

vainillínico), siríngicos (siringaldehído y ácido sirínico) y cinamílicos (ácido ferúlico y cafeico), los cuales empleó como un parámetro de humificación del material vegetal. Dentro de sus análisis encontró que los extractos de ácidos húmicos y fúlvicos difieren cualitativa y cuantitativamente en su contenido fenólico. Además, el parámetro de humificación fue más alto para el extracto de ácidos fúlvicos que para el de ácidos húmicos y éste valor decrece con la profundidad de la muestra [36].

No.	Compuesto	Fórmula Química
1.	Ácido Gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico)	
2.	Ácido Protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico)	
3.	Ácido Vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico)	
4.	Ácido Sirínico (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico)	
5.	Ácido p-Hidroxibenzoico (ácido 4-hidroxibenzoico)	

No.	Compuesto	Fórmula Química
6.	Ácido Cafeico (3,4-dihidroxi-trans-cinámico)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ 
7.	Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído)	
8.	Siringaldehído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído)	
9.	Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	
10.	Ácido Ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-trans-cinámico)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ 
11.	Ácido Salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico)	

Modificado al idioma español de Banach-Szott, 2007 [36].

Figura 7. Patrones aplicados en el análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos fenólicos de Banach-Szott [36].

Kucerík *et al.* (2008), analizaron la influencia de la oxidación de lignito con aire sobre el rendimiento y características físicas y químicas de los ácidos húmicos regenerados (AHR). Determinaron que el tamaño de las partículas del carbón juega un papel importante en la producción de los ácidos húmicos. Partículas de tamaños entre 0,5-

0,125 mm arrojaron el mayor rendimiento de extracción (23%); partículas de 1-0,5 mm generaron el menor rendimiento (12%) y partículas menores a 0,125 mm un rendimiento de 22%. Emplearon dos procesos de oxidación con aire, en condiciones estáticas y fluidas; y compararon el rendimiento de extracción con los obtenidos en el análisis anterior. Para la oxidación en lecho fluidizado emplearon partículas de 0,5-1mm, y obtuvieron una disminución en el rendimiento de extracción de AHR (-15%) a las 24h de oxidación con un posterior incremento (hasta 75%) transcurrido un tiempo de 120h. En la oxidación estática observaron el mismo comportamiento pero con diferencias en los rendimiento (desde una disminución de -22%, hasta un aumento 17%). A pesar de tener valores de rendimiento distintos las características químicas, determinadas por Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y Cromatografía Líquida de Exclusión Molecular (HPSEC) de los ácidos húmicos generados en todos los casos, fueron muy similares. En análisis de FT-IR mostró un aumento muy pequeño en el número de enlaces de tipo éster a temperaturas mayores a 80°C, lo cual produjo un aumento significativo en peso molecular según el análisis de HPSEC. Concluyendo con esto que los parámetros estudiados (temperatura, tamaño de partícula y método de oxidación) influyen significativamente en el porcentaje de extracción de AHR, no siendo así para sus características químicas [37].

Banach-Szott *et al.* (2008), determinaron el contenido de compuestos fenólicos en extractos de ácidos fúlvicos e hidrolizados de ácidos húmicos, de muestras orgánicas y minerales de suelos forestales de Eslovaquia, en función de su grado de madurez y propiedades. Los compuestos fenólicos fueron identificados utilizando HPLC, demostrando que las fracciones de ácidos fúlvicos mostraron un mayor contenido de aldehídos y ácidos fenólicos, en comparación con los hidrolizados de ácidos húmicos [38].

Asing *et al.* (2009), realizaron un estudio comparativo de las características químicas de los ácidos húmicos extraídos de muestras de carbones sub-bituminosos de Mukah,

Sarawak; productos comerciales de ácidos húmicos, provenientes de leonardita; turbas humificadas y varios tipos de abono. Encontraron una variación de 1,5% a 11,1% del contenido de ácidos húmicos en las muestras de carbón sub-bituminoso, mientras que en el compost se encontró de 4,2% a 16,5%. La turba humificada y la leonardita comercial contenían 31,6% y 58,5% respectivamente. Determinaron la acidez total de los ácidos húmicos en el compost a través de titulación empleando hidróxido de bario ($\text{Ba}(\text{OH})_2$), la cual varió entre 5,6 y 9,5 meq/g. Para los grupos carboxílicos realizaron una titulación con acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{OOC})_2$), obteniendo un rango de 1,9 a 3,5 meq/g. Los grupos fenólicos fueron determinados por la diferencia entre la acidez total y los grupos carboxílicos, arrojando resultados de 3,5 a 6,2 meq/g. El análisis por FT-IR de los ácidos húmicos extraídos de los carbones, la leonardita y el compost, demostró la presencia de los principales grupos estructurales, tales como H enlazado a OH, carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), componentes alifáticos CH_2 y CH_3 y los enlaces carbono-carbono de los anillos aromáticos. [39]

Oduber, (2013), realizó una caracterización geoquímica de las sustancias húmicas extraídas de lignitos de la Formación Uramaco (Plioceno), Venezuela, con la finalidad de determinar el contenido de compuestos parcialmente tóxicos, específicamente compuestos fenólicos. Determinó un aumento en el contenido de carbono total en los ácidos húmicos en comparación a los ácidos fúlvicos, debido al alto grado de polimerización que poseen. Posteriormente realizó un análisis por FT-IR donde demostró un menor contenido de grupos carboxílicos y fenólicos en los ácidos húmicos, resultando así las fracciones de ácidos fúlvicos con mayor acidez total. Identificó y cuantificó, mediante HPLC, el ácido gálico y la vainillina en los extractos de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, obteniendo un mayor contenido de estructuras fenólicas en las fracciones de ácidos fúlvicos. Con estos análisis concluyó que la fracción de ácidos húmicos extraída de lignitos, es ideal para emplearse como fertilizante orgánico debido que se encuentra en gran proporción y posee mucha menor cantidad de compuestos fenólicos que los ácidos fúlvicos [40].

5. ZONA DE ESTUDIO

La localidad tipo de la Formación Quebradón se encuentra en la Quebrada Quebradón, cerca de Batatal, estado Miranda (Figura 8) [41]. El espesor de esta formación en su sección tipo es de 1.070 m, disminuye a 750 m en el este y aumenta a 1.370 m en el oeste. Esta formación se extiende a lo largo del borde norte de la cuenca de Guárico, desde Sabana de Uchire hasta las cercanías de San Carlos hacia el oeste. De acuerdo a Macsotay (1997) [41], diferentes investigaciones han reportado edades para esta formación, quedando restringida a Oligoceno terminal-Mioceno medio.

La formación Quebradón consiste predominantemente en lutitas mal estratificadas, poco consolidadas y fácilmente erosionables, de color variable entre azul-gris, marrón rojizo y gris oscuro a negro, en partes carbonáceas, con lignitos delgados intercalados localmente. Se encuentran interestratificadas areniscas de color marrón claro de grano fino a grueso, usualmente impuras. Se reportan también areniscas con cementos calcáreos, conteniendo minerales ferromagnesianos, plagiocasa, filita y minerales opacos. En la parte media de la sección se observan algunas capas gruesas de conglomerado. En el área occidental de los afloramientos (estado Cojedes, Guárico noroccidental y Aragua), la formación desarrolla un miembro basal arenoso denominado Miembro Galera, el cual presenta un espesor en su sección tipo de 800 m. [41].

La importancia económica de esta formación radica en la explotación rudimentaria de algunos horizontes de carbón en las minas de Taguay y en el aprovechamiento del miembro Galera (miembro basal dominante arenoso) en la construcción de la represa del río Tiznado, en el estado Guárico [41].

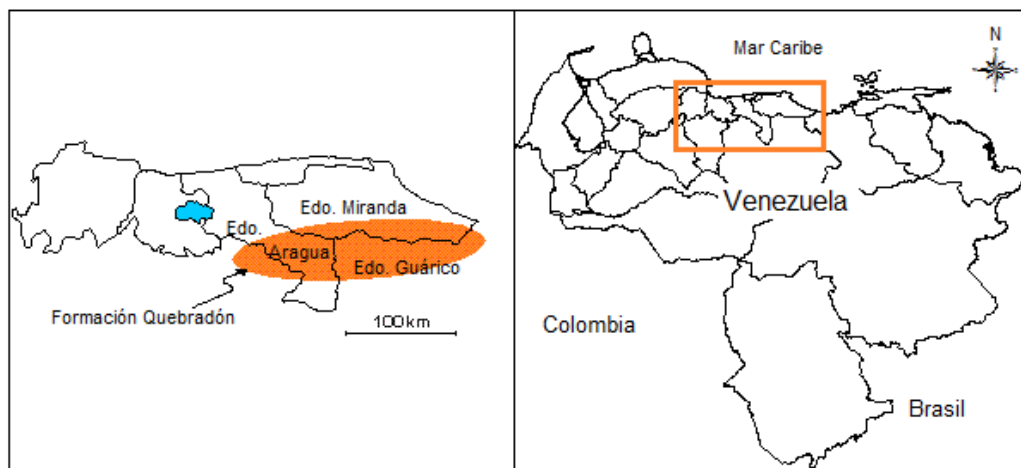


Figura 8. Ubicación de la sección tipo de la Formación Quebradón [41]

La cadena montañosa de Fila Maestra alcanza alturas entre 500 y 700 m sobre el nivel del mar, y está conformada por rocas sedimentarias pertenecientes a las formaciones Naricual y Quebradón [42]. Moreno *et al.* (1995) [42] demostraron que el carbón de Fila Maestra durante su formación tuvo aporte tanto de materia orgánica rica en precursores de n-alcanos livianos como de materiales vegetales leñoso (precursores de n-alcanos de alto peso molecular). La mayor contribución de este último material le confiere al carbón de Fila Maestra un carácter predominantemente húmico.

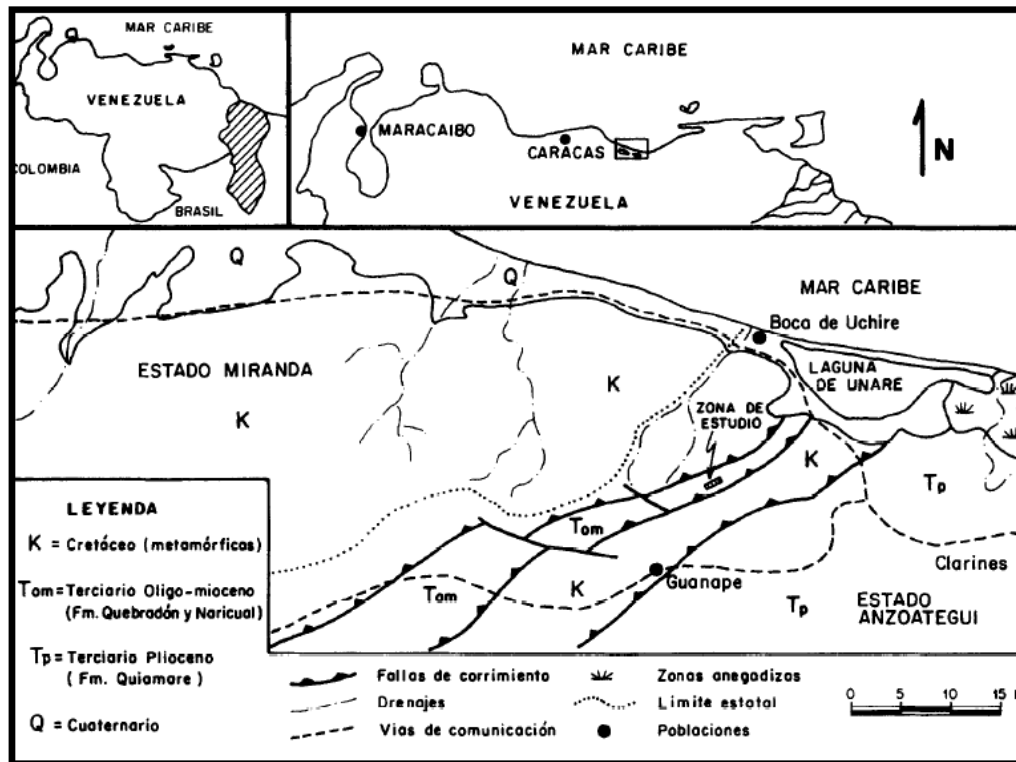


Figura 9. Ubicación de la zona de estudio, Fila Maestra [42].



Figura 10. Talud de la mina en Fila Maestra.



Figura 11. Mantos de carbón expuestos en el talud de Fila Maestra.



Figura 12. Capa de carbón fallada en la mina.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1. Descripción de las muestras

La recolección de las muestras se realizó en el mes de enero del año 2012 en el yacimiento de Fila Maestra. Fueron tomadas dos muestras del mismo manto de carbón observando sus características físicas. Estas características no demuestran convincentemente el grado de meteorización, pero dan un indicio del mismo. De esta manera las muestras fueron clasificadas preliminarmente como *carbón fresco* y *carbón meteorizado* (Tabla 4) y fueron tomados alrededor de 2 Kg de cada una de ellas.

Tabla.4 Identificación de las muestras

Tipo de Muestra	Rotulación
Carbón Fresco	AAS-1
Carbón Meteorizado	AAS-2

La muestra AAS-1 (Figura 13) presentó un color negro más brillante y una mayor compactación aparente. Mientras que la muestra AAS-2 (Figura 14) mostró desmoronamiento con mayor facilidad y una coloración negra más opaca y algunas zonas de coloración terrosa.



Figura 13. Tipo de muestra de carbón fresco



Figura 14. Tipo de muestra de carbón meteorizado

6.2. Tratamiento de las muestras

Con la finalidad de garantizar la representatividad de las muestras, éstas fueron sometidas a un proceso de preparación. Inicialmente se limpiaron y secaron, fueron pulverizadas empleando un pulverizador Shatterbox, seguidamente se tamizaron con tamices de 60 y 120 mallas para obtener muestras con un diámetro de partícula entre 0,25 y 0,125 mm [43]. Según Kúcerik *et al.* (2008) [37], este tamaño de partículas de carbón genera un mayor rendimiento en la extracción de ácidos húmicos. Posteriormente a las muestras AAS-1 y AAS-2 se les realizaron los análisis inmediatos y la determinación del grado de oxidación. La muestra AAS-1 fue sometida a un proceso de oxidación artificial monitoreado con la norma NTC 5556 [44], la muestra obtenida a partir de la oxidación de AAS-1 fue nombrada como AAS-3. Finalmente, las muestras AAS-2 (carbón meteorizado) y AAS-3 (carbón oxidado artificialmente) fueron sometidas a un proceso de extracción de ácidos húmicos, extracción de fenoles e identificación de los mismos mediante HPLC.

6.3. Análisis inmediatos

Para la determinación de componentes que permiten clasificar el carbón estudiado según los rangos propuestos en la *American Society for Testing Materials* (ASTM), se realizaron los análisis de humedad, cenizas, materiales volátiles y carbono fijo.

6.3.1. Humedad (ASTM D-3173)

Se pesó 1,000 g de ambas muestras pulverizadas y se llevaron a la estufa por 1 hora a 105°C en crisoles de porcelana previamente pesados. Posteriormente se pesaron los residuos en frío y se llevaron a la estufa nuevamente hasta alcanzar peso constante. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra. El contenido de humedad fue determinado por pérdida de peso empleando la siguiente fórmula.

$$\%Hum = \frac{(P_o - P_f) * 100}{P_o}$$

Donde: %Hum: Porcentaje de Humedad.

P_o: Peso inicial de la muestra.

P_f: Peso final de la muestra.

6.3.2. Cenizas (ASTM D-3174)

Se pesó 1,000 g de ambas muestras pulverizadas y se llevaron a la mufla a 750°C por 4 horas, posteriormente los residuos se pesaron en frío y se llevaron a la mufla nuevamente hasta obtener peso constante. Este procedimiento se realizó por triplicado

para cada muestra, la determinación de cenizas se realizó por pérdida de peso utilizando la siguiente expresión.

$$\%Cen = \left[\frac{P_{0BLH} - (P_{0BLH} - P_f)}{P_0} \right] * 100$$

Donde: %Cen: Porcentaje de Cenizas.

P_{0BLH} : Peso inicial de la muestra (base libre de humedad).

P_0 : Peso inicial de la muestra.

P_f : Peso final de la muestra.

6.3.3. Material Volátil (ASTM D-3175)

Se pesó 1,000 g de ambas muestras de carbón y se colocaron dentro de un crisol de porcelana, se llevaron a la mufla a 950°C por 7 minutos; una vez transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar las muestras y se pesaron. La determinación se realizó por triplicado para cada muestra y el contenido de material volátil fue calculado de la siguiente manera:

$$\%M.V = \frac{(P_0 - P_f)}{P_0} * 100$$

Donde: %M.V: Porcentaje de Material Volátil.

P_0 : Peso inicial de la muestra.

P_f : Peso final de la muestra.

6.3.4. Carbono Fijo

Para cada muestra fue calculado por triplicado el carbono fijo, por diferencia con base en el 100% de la muestra y el porcentaje de los tres ensayos anteriores.

$$\%C.F. = 100\% - (\%Hum + \%Cen + \%M.V.)$$

Donde: %C.F: Porcentaje de Carbono Fijo.

%Hum: Porcentaje de Humedad.

%Cen: Porcentaje de Cenizas.

%M.V: Porcentaje de Material Volátil.

6.4. Determinación del grado relativo de oxidación (NTC 5556)

Con el propósito de caracterizar las muestras de carbón y monitorear el avance del proceso de oxidación artificial de la muestra AAS-1, se empleó la metodología extraída de la Norma Técnica Colombiana 5556 [44], para la determinación del grado relativo de oxidación. Esta metodología es una traducción al español idéntica a la norma ASTM D5263-93 (01), que consiste en un ensayo rápido, sencillo, reproducible y económico. Para aplicarla se pesó 1,000 g de cada muestra de carbón en vasos de precipitado de 400mL. Cada muestra se trató con 100 mL de NaOH 1M y una gota de un agente surfactante (jabón comercial). Las soluciones se calentaron a 98°C durante 3 minutos con agitación constante. Transcurrido este tiempo se llevó hasta ebullición por 3 minutos, agitando ocasionalmente. Las suspensiones obtenidas fueron filtradas y posteriormente se midió el porcentaje de transmitancia de cada una, a 520 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20. Para calibrar el 100% de transmitancia se utilizó un blanco de NaOH 1M que fue tratado de igual forma que la muestra. Este análisis está basado en que el carbón

oxidado es parcialmente soluble en soluciones alcalinas, dando como resultado una solución coloreada (marrón). La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de carbón oxidado.

Esta determinación se realizó por triplicado para cada muestra. Para la obtención del grado relativo de oxidación de la muestra, se determinó la transmitancia a un paso óptico de 17mm a partir de las siguientes expresiones.

$$A_{17} = A_x (17\text{mm} / b_x)$$

$$T_{17} = (10^{-A_{17}}) * 100$$

Donde: A_{17} : Absorbancia a 17mm de paso de luz.

T_{17} : Transmitancia (calculada) a 17mm de paso de luz.

A_x : Absorbancia obtenida experimentalmente a 520nm.

b_x : Paso óptico utilizado experimentalmente (mm).

Obtenido el valor de T_{17} , se determinó el grado relativo de oxidación del carbón según la tabla siguiente (Tabla 5):

Tabla 5. Parámetros para determinación de grado relativo de oxidación de carbón [44]

Transmitancia a 520nm, paso de luz de 17 mm	Interpretación
>90	Carbón no oxidado
80-90	Carbón posiblemente oxidado
<80	Carbón oxidado

6.5. Oxidación de la muestra de carbón fresco (AAS-1)

Para el proceso de oxidación artificial, se emplearon 4 cápsulas de porcelana con 25 g de carbón esparcido en cada una, para un total de 100 g de carbón. Estas cápsulas fueron introducidas en un horno con regulación de temperatura al cual se le hizo pasar una corriente de aire húmedo. La oxidación se llevó a cabo a 80°C durante 18 días, y su progreso fue monitoreado empleando la Norma Técnica Colombiana 5556 [44]. A partir de este proceso se obtuvo una muestra de carbón oxidada, la cual se denominó AAS-3.

6.6. Extracción de ácidos húmicos de AAS-2 y AAS-3

La extracción de ácidos húmicos a partir de las muestras de carbón, fue llevada a cabo de acuerdo al diagrama que se muestra en la Figura 15.

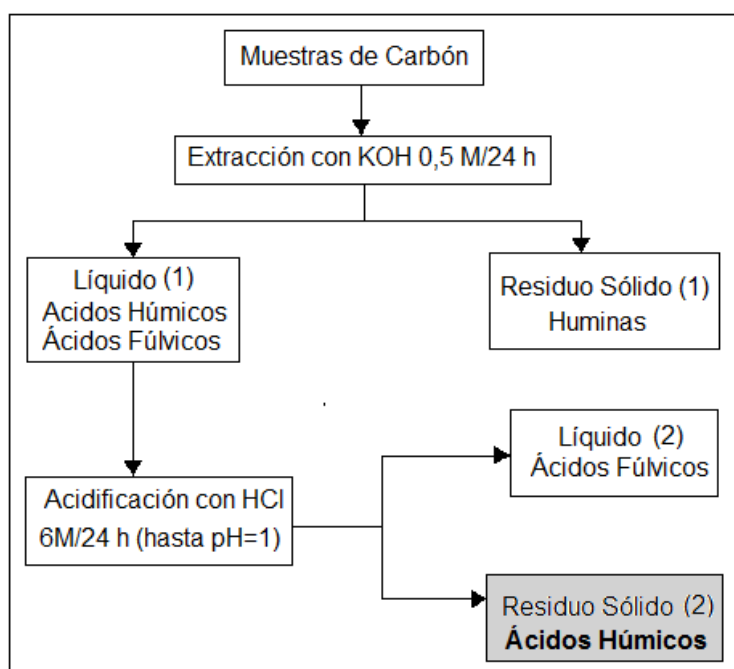


Figura 15. Procedimiento experimental de extracción de ácidos húmicos

Las muestras de carbón alterado fueron sometidas a un proceso de extracción con KOH 0,5 M, el cual es mejor agente extractante que el NaOH, según Fong *et al* (2006) [35]. Inicialmente, 3 alícuotas de la muestra AAS-2 (de 30g cada una), fueron tratadas con 150 mL de agente extractante. En vista de que la relación carbón/extractante (1:5 en p/v) no rindió los valores adecuados de extracción de ácidos húmicos, se pesaron adicionalmente 4 alícuotas más de 10g de AAS-2 y se trataron con 150 mL solución de KOH 0,5M. Para la extracción de ácidos húmicos de AAS-3, se tomaron 8 alícuotas de 10g y cada una fue tratada con 150 mL de extractante.

En el proceso de extracción, cada réplica fue agitada durante 1 hora y se dejó reposar por 24 horas. La suspensión obtenida fue filtrada por succión, con ayuda de una bomba de vacío obteniendo una solución coloreada (marrón). La solución obtenida fue acidificada con HCl 6M hasta alcanzar pH 1 y se dejó reposar por un tiempo de 24 horas. Finalmente se obtuvo un precipitado color marrón, correspondiente a los ácidos húmicos.

Los ácidos húmicos fueron purificados empleando la metodología de Ramírez *et al.* (2011) [45], en la cual el sólido (ácidos húmicos) es tratado con HCl 0,06 M durante 12h y lavado con agua desionizada, posteriormente centrifugado y secado al aire para su cuantificación.

6.7. Extracción de compuestos fenólicos

Una alícuota de los ácidos húmicos (Tabla 6) obtenidos de la extracción descrita en el ítem anterior, fue tratada con 10 mL de HCl 6M durante 16h en un sistema de reflujo a 120 °C, esto se realizó con la finalidad de obtener los ácidos húmicos hidrolizados solubles en ácido. Una vez obtenida los compuestos hidrolizados, la solución fue tratada con acetato de etilo para extraer los compuestos fenólicos en tres extracciones de 30 mL

cada una. El solvente de la capa orgánica producto de la extracción, fue volatilizado por completo y el residuo se re-disolvió en metanol grado HPLC hasta completar una solución de 5 mL, obteniendo de esta forma un extracto fenólico listo para el análisis cualitativo y cuantitativo.

Tabla 6. Cantidad de ácidos húmicos empleada en la hidrólisis

Muestra	AH $\pm$ 0,001 g
AAS-2	0,447
AAS-3	1,502

6.8. Identificación y cuantificación mediante HPLC

El análisis cromatográfico de las muestras fue llevado a cabo empleando un sistema HPLC Agilent Serie 1200 (Figura 16) con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos con detección múltiple de longitudes de onda. La columna utilizada fue una Columna Zorbax-eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm – 5 micrómetros). La fase móvil consistió de un eluente A: H₂O:CH₃CN:CH₃COOH (84:14:2) y un eluente B: CH₃CN. Las muestras estuvieron conformadas por 1 mL de extracto fenólico (ver 5.8) y 1 mL del eluente A. La detección se realizó a 254 nm.



Figura 16. Sistema HPLC Agilent Serie 1200

Para los análisis cualitativos y cuantitativos fueron empleados los patrones ácido gálico, ácido salicílico y la vainillina. La identificación se realizó a partir de la comparación de tiempos de retención de los picos observados en las muestras con los tiempos de retención de estos compuestos patrones. Los compuestos identificados satisfactoriamente fueron cuantificados a través de una curva de calibración externa.

6.9. Identificación tentativa complementaria de compuestos fenólicos

En vista de que la metodología de identificación de compuestos fenólicos, fue una recreación de la investigación de Banach-Szott [36], se realizó una comparación teórica empleando los tiempos de retención del cromatograma de compuestos fenólicos utilizados por la autora, y los tiempos de retención de los picos obtenidos experimentalmente, para establecer una lista de posibles compuestos presentes en las muestras de carbón estudiadas. Esto se realizó con la finalidad de complementar de manera tentativa la información de identificación de fenoles, ya que no se contó con los patrones suficientes para caracterizar los mismos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis inmediatos

La Tabla 7 muestra los valores promedio de porcentaje de humedad (%Hum), porcentaje de material volátil (%M.V.), porcentaje de cenizas (%Cen) y porcentaje de carbono fijo (%C.F.).

Tabla 7. Análisis Inmediato de las muestras

Parámetro	AAS-1 (*)	AAS-2 (*)
%Hum	4,8 ± 0,1	4,26 ± 0,09
%M.V.	54 ± 1	52 ± 1
%Cen	3,52 ± 0,08	2,37 ± 0,06
% C.F.	37 ± 1	42 ± 2

(*) Valores promediados de tres réplicas

%Hum: %p/p de Humedad

%M.V: %p/p de Material Volátil

%Cen: %p/p de Cenizas

%C.F: %p/p de Carbono Fijo

Los valores de porcentaje de humedad, material volátil y cenizas son ligeramente mayores en la muestra AAS-1, en comparación a la muestra AAS-2. Por su parte, el contenido de carbono fijo es mayor para AAS-2 que para AAS-1, esto es consecuencia de los 3 primeros parámetros mostrados en la Tabla 7, pues el carbono fijo se determina por la diferencia de %Hum, %M.V y %Cen con base en 100% (ítem 6.3.4).

Los resultados de estos análisis permiten clasificar a ambas muestras de carbón como bituminoso con alto contenido volátil A, según la ASTM (Tabla 2). Las muestras fueron tomadas del mismo manto, por lo que se asume que la materia orgánica que le dio origen

al carbón fue la misma. Sin embargo, en la Tabla 7 se observan ligeras variaciones en los parámetros geoquímicos.

El aumento en el contenido de humedad de la muestra AAS-1, puede atribuirse a una mayor cantidad de grupos funcionales oxigenados que aumentan la polaridad [46]. Los grupos funcionales oxigenados incrementan la adsorción de moléculas de agua a la macro estructura mediante interacciones dipolo-dipolo, produciendo así un aumento en el porcentaje de humedad. La meteorización del carbón causa incremento en la adsorción de agua, más no hay una correlación entre el incremento de humedad y el grado de oxidación [46]. Por tal razón, a pesar de que los carbones oxidados tienden a poseer mayor contenido de humedad asociado, el aumento en el porcentaje de humedad de AAS-1 no es indicativo de que ésta se encuentre más oxidada que AAS-2.

En su investigación, Moreno (1990) [47], determinó las muestras de Carbón de Fila Maestra como carbón sub-bituminoso A, reportando una humedad de 7%, cenizas 15%, material volátil 36% y carbono fijo 42%. Por otra parte, Moreno *et al.* (1995) [42], clasificaron el carbón de la Capa 4 de Fila Maestra como bituminoso de alto contenido volátil B y C; La muestra que estudiaron reportó un porcentajes de humedad de 9,3%, y de cenizas 2,5%. Los contenidos de humedad y cenizas para ambas investigaciones difieren entre sí y con respecto a las muestras de este trabajo, por tal motivo las clasificaciones resultan diferentes. Los porcentajes de humedad y cenizas de AAS-1 y AAS-2 son menores que los de la literatura referente. Sin embargo las muestras entran dentro del mismo tipo de carbón (bituminoso) que refieren Moreno *et al* (1995) [42]. La diferencia entre las clasificaciones encontradas en la literatura y en este trabajo, puede deberse al espesor de la secuencia de carbón, ya que los carbones más profundos experimentaron una mayor madurez térmica.

7.2. Determinación del grado relativo de oxidación

La Tabla 8 presenta la transmitancia medida (T) y la calculada a un paso óptico de 17mm (T_{17}), tal como lo establece la Norma Técnica Colombiana 5556 (NTC 5556) [44]. El valor de T_{17} fue interpretado empleando la Tabla 6, obteniendo así que ambas muestras de carbón se encuentran oxidadas. La NTC 5556 establece que a menor transmitancia mayor es el grado de oxidación, por lo que se puede asumir que la muestra AAS-2 se encuentra ligeramente más oxidada que la muestra AAS-1.

Tabla 8. Grado relativo de oxidación de las muestras de carbón

Muestra	T (%)	T_{17}
AAS-1	39 ± 1	$20,2 \pm 0,9$
AAS-2	28 ± 1	$11,5 \pm 0,7$

El grado relativo de oxidación, bajo la metodología de la NTC 5556, depende de la intensidad del color producido por los ácidos húmicos en solución alcalina [44]. Una coloración más intensa es asociada a una menor transmitancia y a su vez a un grado relativo de oxidación mayor. La poca diferencia entre los parámetros geoquímicos determinados en el ítem 6.2, y entre los valores de T_{17} , reiteran que las muestras AAS-1 y AAS-2 son de niveles de meteorización similares entre sí, a pesar de que las características físicas de las muestras de carbón parecían indicar que existía una diferencia más significativa.

7.3. Oxidación de la muestra de carbón fresco (AAS-1)

El proceso de oxidación se llevó a cabo durante 18 días, durante los cuales fue medido el grado relativo de oxidación de la muestra para monitorear el avance. En la Tabla 9 se

aprecia el progreso de la oxidación de la muestra AAS-1. El análisis realizado para el monitoreo del proceso permite establecer que al lograr un porcentaje de transmitancia de aproximadamente cero en el día 18 de la oxidación, está garantizado que la muestra está lo suficientemente oxidada como para detener el proceso.

Tabla 9. Proceso de oxidación de AAS-1

Temperatura ± 1 (°C)	Tiempo (Días)	%Transmitancia	T ₁₇ (*)
80	0	39 $\pm$ 1	20,2 $\pm$ 0,9
	10	2,7 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,1
	13	1,7 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1
	18	0	$\approx$ 0

(*) T₁₇ involucra una función logarítmica, cuando %T es cero, T₁₇ tiende a 0

La oxidación del carbón a baja temperatura ($T < 100^\circ\text{C}$) es considerada un fenómeno que ocurre principalmente en la superficie interna de los poros del carbón. Este proceso involucra el consumo de oxígeno, la formación de complejos sólidos oxigenados, la descomposición térmica de dichos complejos y generación de gases y sólidos productos de la oxidación [48]. La literatura reporta que a medida que el proceso de oxidación avanza, los complejos y productos sólidos disminuyen el consumo de oxígeno debido a la acumulación de los mismos sobre la superficie del carbón. En la Tabla 9 se aprecia que el valor de T₁₇ en los últimos 8 días de oxidación no varía significativamente, lo que se traduce en una disminución del proceso de oxidación debido al decrecimiento en la interacción del oxígeno del aire con los sitios reactivos del carbón por la acumulación del producto.

Según Haihui *et al.* (2003) [48], numerosos investigadores han reportado, dentro de los productos de oxidación de carbón, especies aromáticas y alifáticas con grupos funcionales de tipo hidroxilo (-OH), carbonilo (-CO), carboxilo (-COOH) y éter (-COC-). Particularmente, para carbones de tipo bituminoso con alto contenido de volátiles, se ha

reportado la formación de grupos como carbonilo y éteres posterior a la oxidación a temperaturas de 100°C [48] [49]. Una vez que transcurre el tiempo suficiente la oxidación progresa hasta penetrar en lo más profundo de la estructura del carbón para formar ácidos húmicos [50].

7.4. Extracción de ácidos húmicos de AAS-2 y AAS-3

Tal como fue explicado en el ítem 6.6, la extracción de ácidos húmicos fue llevada a cabo en las muestra de carbón AAS-2 y AAS-3. A partir de este proceso se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10. Rendimiento de extracción de AH y porcentaje de residuo insoluble.

Muestra	%AH (p/p)	%Residuo insoluble (p/p)
AAS-2	0,35± 0,06	97,85 ± 0,06
AAS-3	3,8± 0,7	93,7 ± 0,7

AAS-2 muestra de carbón meteorizado

AAS-3 muestra de carbón producto de la oxidación de AAS-1

Las sustancias húmicas están compuestas por ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas. En la Tabla 10 se muestra el porcentaje promedio de residuo insoluble obtenido de la extracción de ácidos húmicos, en este residuo se encuentran las huminas.

El residuo insoluble representa más del 90% de la muestra de carbón. La literatura refiere que la fracción de huminas corresponde a más del 50% [51], debido a que se encuentra constituida por ácidos húmicos tan íntimamente unidos a la parte mineral del suelo que no se puede separar de ella, así como también por sustancias húmicas de alta condensación y contenido de carbono mayor al 60%. El porcentaje de ácidos fúlvicos no fue determinado debido a que dicha fracción no fue aislada para esta investigación.

El mayor porcentaje de extracción de AH corresponde a la muestra de carbón AAS-3 (3,8%). La cantidad de ácidos húmicos depende de la naturaleza de la materia orgánica que dio origen al carbón y del método de extracción, entre otros. Debido a que las muestras de carbón fueron tomadas del mismo manto y han sido sometidas al mismo proceso de extracción, la diferencia en el rendimiento de ácidos húmicos es debida probablemente al proceso de oxidación artificial al cual fue sometida la muestra AAS-1 para generar la AAS-3. El rendimiento porcentual de AAS-3 supera en aproximadamente 10 veces el rendimiento obtenido para AAS-2. Este resultado viene dado por la formación de ácidos húmicos regenerados en la oxidación debido a la incorporación de grupos oxigenados a la macro estructura del carbón [50].

El rendimiento de extracción de ácidos húmicos depende del agente extractante y su concentración, como lo establecen Fong *et al* (2006) [35]. Según este investigador el KOH 0,5 M genera un rendimiento de extracción alrededor del 16%; en este caso se obtuvo un rendimiento promedio de 3,8% en la muestra AAS-3. Las diferencias pueden venir dadas por el rango evolutivo de los carbones estudiados en cada caso, ya que mientras menor es el rango, mayor es el contenido de sustancias húmicas presentes.

Los contenidos de AH en la bibliografía, señalan rangos muy diversos dependiendo de la fuente de extracción. Para carbón de Fila Maestra, Contreras (1997) [18] encontró rendimientos de extracción de ácidos húmicos (AH) que varían desde 1,10 % a 2,35%, para carbones oxidados de manera natural; mientras que para carbones oxidados con permanganato de potasio reporta rendimientos de extracción de ácidos húmicos regenerados (AHR) entre 0,87% y 14%. Jiménez (1999) [26], estudió el rendimiento de extracción de AH para carbones de tipo bituminosos de alto volátil A y C, obtuvo valores de 2,57% y 3,55% respectivamente; mientras que al someter estas muestras a oxidación con ácido nítrico, y otros agentes obtuvo rendimientos de hasta 81% de extracción de AHR. Adicionalmente estudió un carbón de tipo Sub-bituminoso B, cuyo porcentaje de

extracción de AH fue de 46,5%, concluyendo que los carbones de alto rango (bituminoso) no son los más apropiados para la extracción de ácidos húmicos a menos que se sometan a un proceso oxidativo agresivo, mientras que los de bajo rango (sub-bituminoso) presentan altos contenidos de AH. Olivella *et al* (2002) [34], para carbones de Aragon, España, para muestras de leonardita (forma oxidada de lignito) obtuvieron 79% AH. Para el caso de Asing *et al.* (2009) [39], encontraron que en muestras de carbones sub-bituminosos de diferentes procedencias, el contenido de AH varía de 1% a 11%.

Los carbones tratados en esta investigación fueron clasificados como bituminosos alto volátil A, y los porcentajes de extracción de AH y AHR son comparables con los de Jiménez (1999) [26], concluyendo así que el proceso oxidativo, a pesar de aumentar aproximadamente diez veces el rendimiento de extracción de ácidos húmicos de AAS-3 en comparación a la muestra AAS-2, no fue lo suficientemente agresivo como para emplearlo como metodología para producción de ácidos húmicos regenerados.

6.5. Identificación y cuantificación mediante HPLC

Posterior a la hidrólisis ácida, los fenoles fueron extraídos de los ácidos húmicos hidrolizados tal como se describió en el ítem 5.7. El pH de los extractos fenólicos se encontró entre 4 y 5 para ambas muestras, corroborando así que son muestras admitidas para la columna analítica ($\text{pH}_{\text{admitido}} = 2-8$). Para la identificación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras, se realizó la inyección de tres patrones, bajo las condiciones descritas en el ítem 5.8.

Se prepararon soluciones de alrededor de 500 ppm de cada patrón, empleando como solvente el eluyente A de la fase móvil (ver 5.9). Para la vainillina y el ácido gálico se realizaron diluciones de las soluciones madre. El ácido salicílico no fue detectado a esta concentración, razón por la cual fue necesario preparar un patrón de mayor

concentración, en este caso aproximadamente 2000ppm. Los patrones inyectados, sus concentraciones y tiempos de retención (t_R), se describen en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis cualitativo de patrones de fenoles por HPLC

Patrón	Concentración (mg/L)	t_R (min)
Ácido Gálico	97 ± 2	1,779
Vainillina	288 ± 5	9,253
Ac. Salicílico	2036 ± 4	22,357

Los cromatogramas obtenidos durante la inyección de los patrones mencionados en la Tabla 11, se muestran en las Figuras 17 y 18.

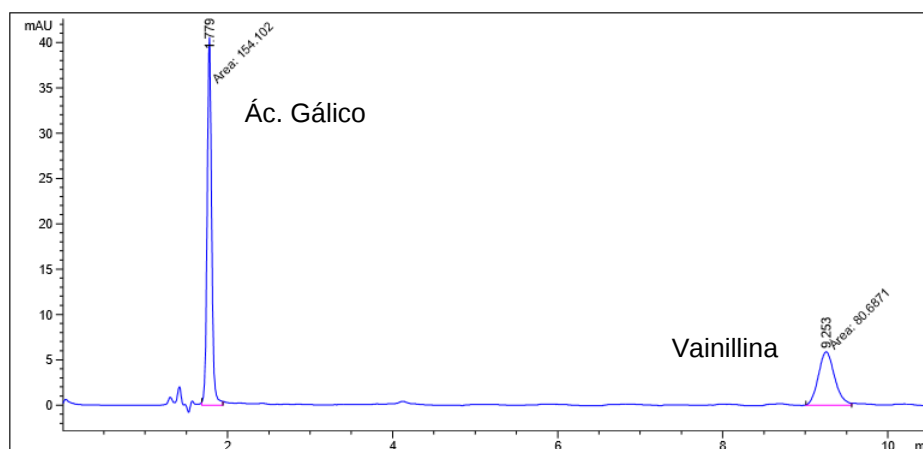


Figura 17. Cromatograma de patrones de ácido gálico y vainillina

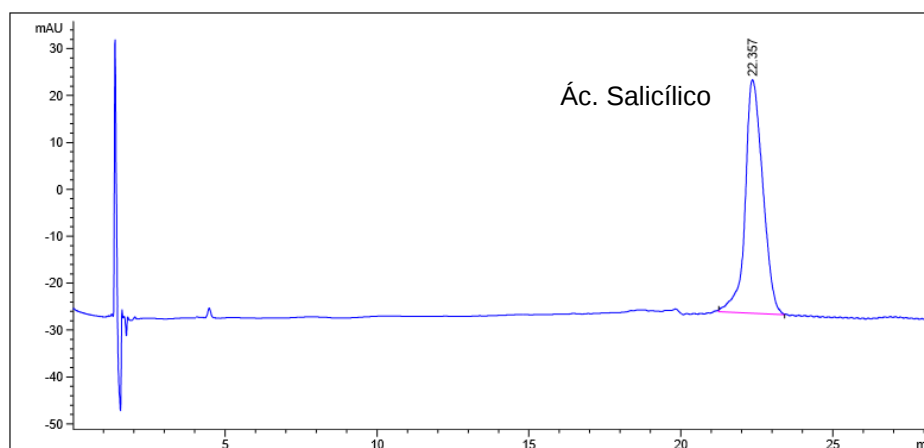


Figura 18. Cromatograma de patrón de ácido salicílico

A través de los cromatogramas fueron identificados los tiempos de retención de los patrones, y posteriormente se procedió a la inyección de los extractos obtenidos de los ácidos húmicos hidrolizados bajo las mismas condiciones, obteniendo los cromatogramas expuestos en las Figuras 19 y 20.

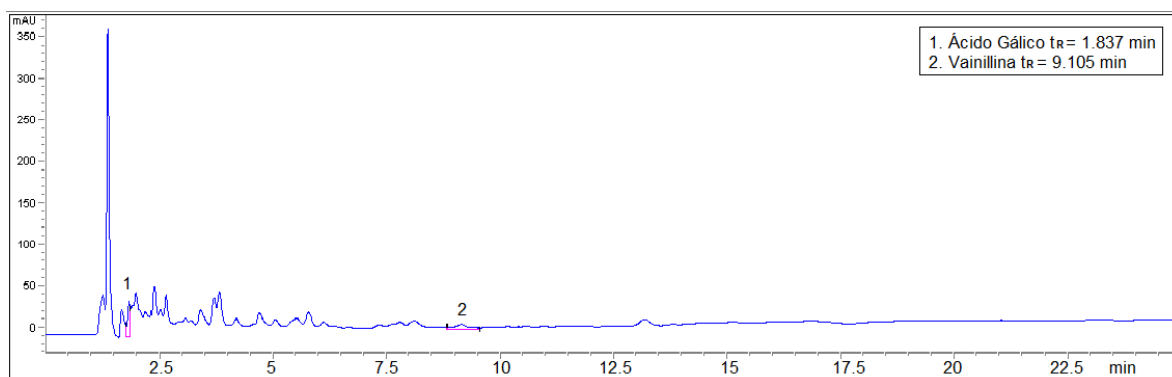


Figura 19. Cromatograma del extracto fenólico de la muestra AAS-2.

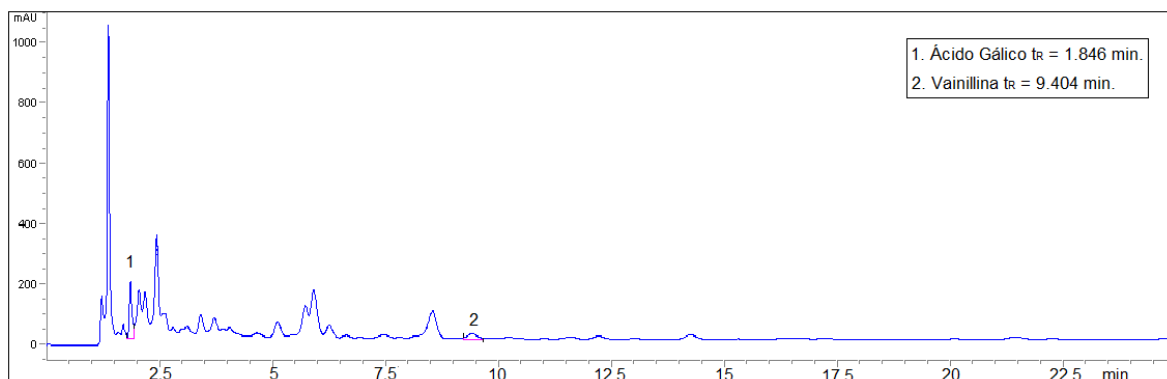


Figura 20. Cromatograma del extracto fenólico de la muestra AAS-3

En los cromatogramas de ambas muestras, se pudieron identificar las señales para los picos correspondientes al ácido gálico y la vainillina. En ninguna de las muestras se observó el pico correspondiente al ácido salicílico. Esto puede deberse a que se encuentra ausente o a que su concentración en la muestra es menor al límite de detección bajo las condiciones de trabajo. También es importante mencionar que en las muestras existen señales definidas de compuestos fenólicos que no pudieron ser identificados debido a la ausencia de patrones adecuados.

Una vez identificados los picos correspondientes a los patrones mostrados en la Tabla 11, se procedió a realizar la cuantificación de los mismos a través de una curva de calibración externa (Anexo 14 y 15), elaborada a partir de patrones de ácido gálico y vainillina en diferentes concentraciones (Anexo 13). Obtenidas las curvas de calibración externa se realizaron los cálculos pertinentes para la cuantificación de los compuestos fenólicos de las muestras estudiadas. Los resultados de dicha cuantificación se encuentran reflejados en la Tabla 12.

Tabla 12. Cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC

Muestra	Ácido Gálico		Vainillina	
	mg/L	mg fenol/ Kg AH (*)	mg/L	mg fenol/ Kg AH (*)
AAS-3 (**)	905 ± 3	3013 ± 11	1406 ± 14	4682 ± 48
AAS-2 (**)	143 ± 2	1598 ± 24	449 ± 2	5017 ± 44

(*)Cantidad de mg de compuesto fenólico por cada Kg de Ácido Húmico

(**) Valores promediados de tres réplicas.

Las concentraciones de ácido gálico y vainillina fueron calculadas empleando la ecuación de la curva de calibración, utilizando los valores de área de cada pico cromatográfico (Anexo 12). Se observó una notable diferencia entre los valores de concentración de vainillina y ácido gálico de AAS-3 con respecto a AAS-2. La primera mostró un aumento considerable en la concentración de ambos compuestos fenólicos. La determinación de la concentración de las especies está afectada por diferentes parámetros, desde la cantidad de muestra tomada para el análisis hasta la extracción de los ácidos húmicos y de los compuestos fenólicos. Debido a que la cantidad de ácidos húmicos utilizada en la hidrólisis fue diferente para cada muestra, se calculó la cantidad de compuesto fenólico por kilogramo de ácido húmico. A través de este parámetro se pudo hacer una comparación más efectiva entre las concentraciones de ácido gálico y vainillina asociadas a las muestras de carbón. Para el cálculo de este parámetro se emplearon los valores de concentraciones de ácido gálico y vainillina, el volumen de solución de extracto fenólico y la masa de ácidos húmicos sometida a hidrólisis (Anexo 16).

El parámetro mg fenol/Kg AH (Tabla 12) demostró que la oxidación de la muestra AAS-3 generó un aumento en la concentración de ácido gálico de casi el doble. El ácido gálico es producto de la hidroxilación del ácido p-hidroxibenzoico, por lo que el mayor contenido de éste en la muestra AAS-3 reitera el mayor grado de oxidación de la misma. Por su parte, el parámetro mg fenol/Kg A.H de la vainillina, revela valores muy similares en ambas muestras, demostrando que el proceso de oxidación no afectó significativamente

la concentración de este compuesto. La muestra AAS-3 presenta una ligera disminución de la cantidad de vainillina en comparación a la muestra AAS-2, esto puede deberse a la transformación de la misma en ácido vanílico producto del proceso de oxidación artificial.

La composición cualitativa de los compuestos fenólicos depende del tipo de materia orgánica y de su grado de descomposición [36]. La lignina y sus productos de degradación, son la fuente más importante de los compuestos fenólicos que participan en la formación de las sustancias húmicas [39]. El grado de la transformación de la lignina puede monitorearse mediante el análisis de los compuestos fenólicos en las fracciones del humus. Un indicador del grado de descomposición puede ser el contenido de compuestos de tipo vanílicos, cinamílicos y siríngicos. En la Tabla 12 se aprecia el alto contenido de vainillina, compuesto de tipo vanílico, lo cual puede hacer referencia a un alto grado de descomposición de la lignina en las muestras; sin embargo, este resultado no es concluyente sin el análisis del resto de los compuestos fenólicos que pudieran indicar dicha descomposición [53] [54].

Los aldehídos y ácidos fenólicos liberados de la lignina en forma de compuestos vanílicos, cinamílicos y siríngicos son obtenidos respectivamente de los alcoholes de tipo coniferílicos, cumarílicos y sinapílicos. La proporción entre estos tres alcoholes en la lignina depende de la especie de vegetación [38]. La lignina de la vegetación gimnosperma muestra un alto contenido de compuestos de tipo vanílico, por los que el alto contenido de vainillina en las muestras estudiadas hace referencia a la presencia de este tipo de vegetación en el material parental del carbón. [38] [55].

En la literatura se encuentran reportes de que el ácido gálico y la vainillina poseen una solubilidad baja a 20 °C (1g/100 mL). Estos compuestos fenólicos son clasificados con una nocividad leve; sin embargo, su lixiviación al medio ambiente puede presentar efectos secundarios [56] [57].

6.6. Identificación teórica complementaria de compuestos fenólicos

Para la caracterización de compuestos fenólicos en los extractos de ácidos húmicos hidrolizados, se recreó el procedimiento experimental de Banach-Szott [36]. Las características de la columna cromatográfica influyen en la resolución y el tiempo de ejecución de la elución, de tal manera que, en un sistema isocrático (sin gradiente de elución) un aumento en la longitud de la columna, manteniendo el flujo constante, no modifica los valores del factor de retención pero genera aumento en tiempo de la corrida y en la resolución [58]. Por otra parte, en sistemas con gradientes de elución la modificación en el tamaño de la columna en un factor x debe venir acompañada por una modificación en el mismo factor x en el tiempo del gradiente, garantizando de esta manera que los valores del factor de retención de cada especie permanezca constante [58]. En el sistema empleado en este trabajo, se utilizó una columna cromatográfica de 150mm de longitud, mientras que en la investigación de Banach-Szott se empleó una columna de 250mm. Al modificar el tamaño de la columna y no modificar el tiempo del gradiente de elución, se producen cambios en los factores de retención que se ven reflejados en la variación de los tiempos de retención de los compuestos fenólicos. Algunas especies muestran una disminución en su tiempo de retención, mientras que otras presentan un aumento con respecto al reporte de Banach-Szott [36].

A pesar de la variación en la longitud de la columna y su influencia en el gradiente de elución y factor de retención, los compuestos fenólicos utilizados como patrones en esta investigación presentaron el mismo orden de elución que el de Banach-Szott [36], pero mostraron tiempos de retención diferentes. Tomando en cuenta la diferencia en los tiempos de retención de cada especie, se calculó el porcentaje de variación de los mismos (Tabla. 13).

Los tiempos de retención muestran una disminución para el ácido gálico y la vainillina, mientras que para el ácido salicílico se muestra un aumento. A simple vista no se aprecia una tendencia en el porcentaje de variación, por lo que se procedió a realizar un gráfico del porcentaje de variación en función del tiempo de retención reportado por Banach-Szott [36], con la finalidad de establecer una tendencia matemática al comportamiento observado (Figura 21).

Tabla 13. Variación de los tiempos de retención de los patrones en función de los reportados por Banach-Szott [36].

Compuesto	$t_{R(B-S)}$ (min) (*)	t_{Rexp} (min)	% variación (**)
Ac. Gálico	3,125	1,779	-43,1
Vainillina	10,625	9,253	-12,9
Ac. Salicílico	21,094	22,357	6,0

(*) $t_{R(B-S)}$ tiempos de retención reportados por Banach-Szott [36] (Ver Anexo 17)

(**) Valores en negativo representan disminución y en positivo aumento.

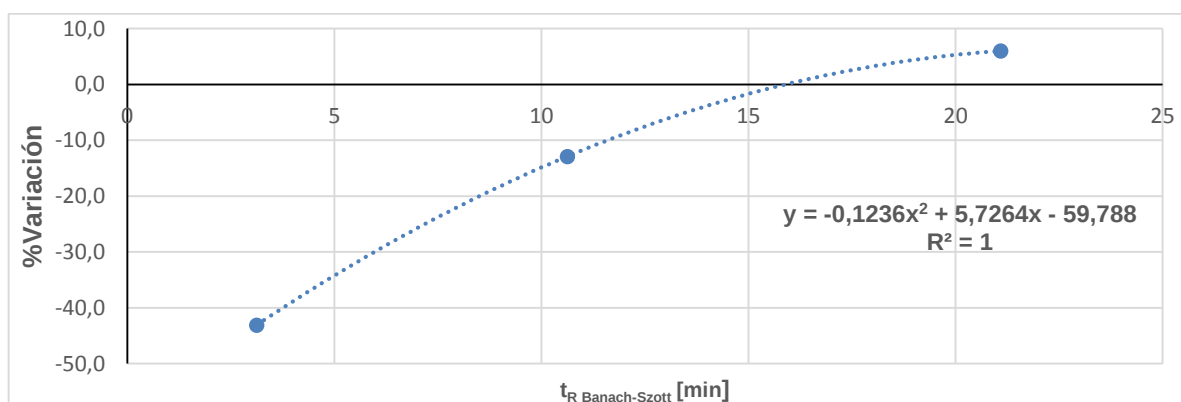


Figura 21. Gráfico del porcentaje de variación de los tiempos de retención experimentales con respecto a los tiempos de retención de Banach-Szott [36]

Los valores de porcentaje de variación de los tiempos de retención experimentales, en el intervalo de tiempo comprendido entre la elución del ácido gálico y la elución del ácido salicílico, muestran una tendencia polinómica de segundo orden. Asumiendo que el

comportamiento sea aplicable a este período de tiempo bajo las condiciones experimentales de este trabajo, se puede calcular con la ecuación de la curva los valores teóricos de los tiempos de retención de los patrones fenólicos que no fueron identificados experimentalmente (Tabla 14).

Tabla 14. Valores teóricos de los tiempos de retención, calculados a partir de la ecuación de la curva (Figura 21).

Compuesto	$t_{R(B-S)}$ (min)	% Variación (*)	$t_{teórico}$ (min) (**)
Ác. Protocatecuico	4,531	-36,4	2,883
Ác. Vanílico	8,281	-20,8	6,556
Ác. Sirínigico	8,594	-19,7	6,901
Ác. p-hidroxibenzoico	9,062	-18,0	7,427
Ác. Cafeico	9,844	-15,4	8,329
Siringaldehido	13,281	-5,5	12,547
Ác. 2,4-dihidroxibenzoico	14,062	-3,7	13,542

$t_{R(B-S)}$: Tiempos de retención reportados por Banach-Szott [36]

(*) Calculados a través de la ecuación cuadrática del gráfico (Figura 21)

(**) Calculado con base en %Variación y $t_{R(B-S)}$:

Empleando los tiempos de retención teóricos de la Tabla 14, se evaluaron los cromatogramas de las muestras para buscar señales representativas (Figuras 22 y 23). Se encontraron picos cromatográficos con tiempos de retención similares a los calculados, especialmente para la muestra AAS-3, la cual mostró mayor número de compuestos fenólicos que la muestra AAS-2 (Tabla 15), lo que se atribuye al proceso de oxidación artificial ya que esta muestra presentó un mayor grado de oxidación relativa (Tabla 9) y un mayor rendimiento de extracción de ácidos húmicos (Tabla 10).

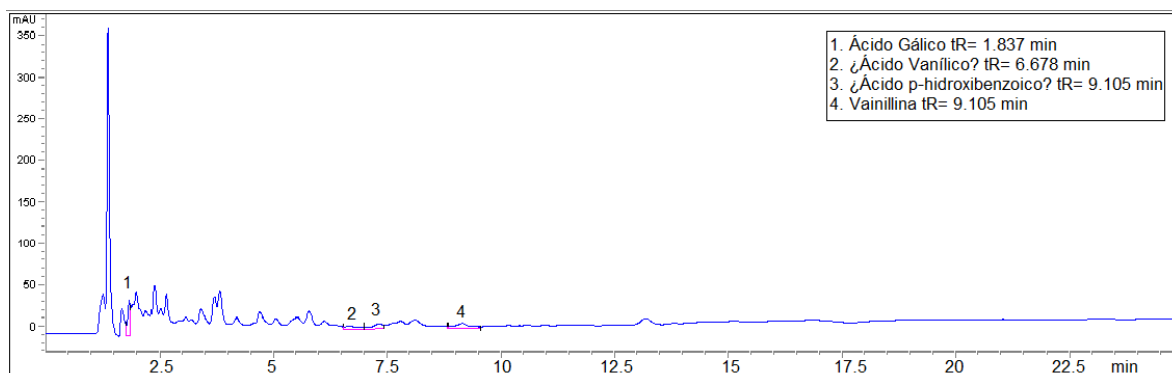


Figura 22. Identificación tentativa, cromatograma del extracto fenólico de AAS-2

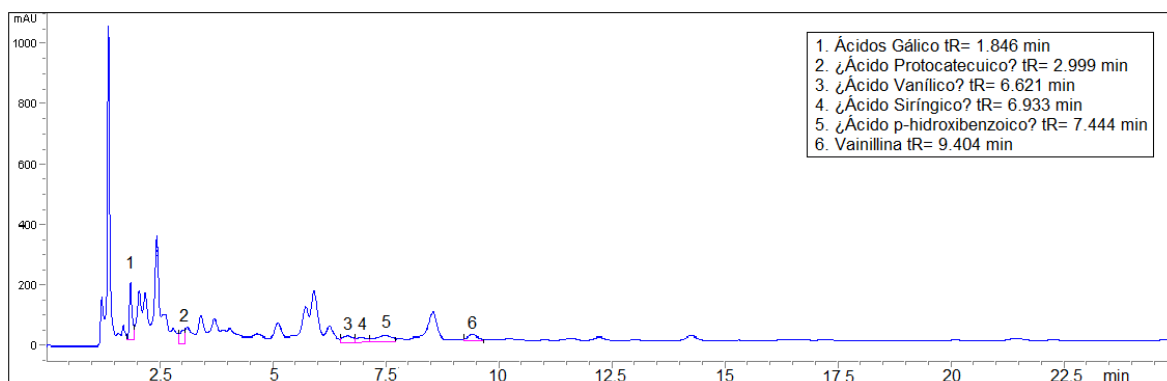


Figura 23. Identificación tentativa, cromatograma del extracto fenólico de AAS-3

Tabla 15. Tiempos de retención de compuestos fenólicos identificados tentativamente.

Compuesto	t _{teórico} (min)	t _R (min) en AAS-2	t _R (min) en AAS-3
Ác. Protocatecuico	2,883	NE	2.999
Ác. Vanílico	6,556	6.678	6.621
Ác. Siríngico	6,901	NE	6.933
Ác. p-hidroxibenzoico	7,427	7.342	7.444
Ác. Cafeico	8,329	NE	NE
Siringaldehido	12,547	NE	NE
Ác. 2,4-dihidroxibenzoico	13,542	NE	NE

NE: NO Encontrado

Para la muestra AAS-3 se encontraron señales cromatográficas que hacen referencia a la posible existencia de especies como ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido siríngico y ácido p-hidroxibenzoico (Figura 23). Mientras que para la muestra AAS-2 se encontraron picos con tiempos de retención similares a los del ácido vanílico y ácido p-hidroxibenzoico (Figura 22). La muestra oxidada de manera artificial posee mayor número de especies fenólicas identificadas teóricamente. El grado de madurez de la materia orgánica está conectada a la disminución del contenido de aldehídos y ácidos fenólicos en los extractos de ácidos húmicos [38]. Por tal razón, la disminución en el número de especies fenólicas presentes en la muestra AAS-2 con respecto a AAS-3, hace referencia a que es una muestra de carbón con materia orgánica de mayor grado de madurez. Sin embargo, este análisis es netamente teórico y no posee contundencia debido a la falta de patrones fenólicos para comprobar la existencia o no de las especies mencionadas en este ítem.

7. CONCLUSIONES

- Se evaluó el rango de madurez de las muestras de carbón a través de la determinación de porcentaje de humedad, cenizas, material volátil y carbono total, obteniendo que las mismas pueden ser clasificadas, según la norma ASTM D388, como carbón bituminoso con alto contenido de volátiles A.
- Fue estudiado el rango de oxidación relativa de las muestras AAS-1 y AAS-2, por extracción alcalina, obteniendo un valor de T_{17} menor a 80 (20,2% y 11,5%, respectivamente), lo que se indica que ambas muestras se encuentran altamente oxidadas, según criterios de la norma NTC 5556.
- Se determinó el grado de oxidación relativa de la muestra AAS-3 producto de la oxidación con aire húmedo a 80°C durante 18 días, y se obtuvo un valor de T_{17} de cero, indicando que el proceso de oxidación fue exitoso y la muestra se encuentra más oxidada que AAS-2.
- Se extrajeron y cuantificaron los ácidos húmicos naturales de AAS-2 y los regenerados de AAS-3, encontrando un incremento en el rendimiento de extracción de AAS-3 (3,8%) con respecto a AAS-2 (0,35%), debido al alto grado de alteración que presenta la primera.
- Se identificó y cuantificó el ácido gálico y la vainillina en los extracto fenólicos de los ácidos húmicos naturales y regenerados de las muestras de carbón, a través de la técnica de HPLC, obteniendo que la vainillina se encuentra en mayor concentración que el ácido gálico, sugiriendo presencia de vegetación gimnosperma en el material orgánico parental del carbón. El mayor contenido de

ácido gálico en la muestra AAS-3, en comparación a la muestra AAS-2, es consistente con un mayor grado de alteración debido a la hidroxilación del ácido p-hidroxibenzoico.

- A través del análisis comparativo con la investigación de Banach-Szott [19], se hizo referencia a la posible existencia de otras especies fenólicas en las muestras estudiadas. Fueron detectadas señales similares a las del ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido sirínico y ácido p-hidroxibenzoico. A su vez, se observó un mayor número de compuestos fenólicos presentes en la muestra AAS-3, adjudicándole así un carácter más oxidado con respecto a la muestra AAS-2, lo que se encuentra respaldado por los resultados de grado de oxidación relativa y porcentajes de extracción de ácidos húmicos calculados para dicha muestra.

8. RECOMENDACIONES

- Utilizar un compuesto patrón durante la fase de extracción de los compuestos fenólicos en los ácidos húmicos, para optimizar el proceso y los cálculos de extracción a través de un porcentaje de recuperación.
- Emplear una mayor cantidad de muestras de carbón en la fase inicial de extracción para obtener mayor cantidad de ácidos húmicos y así una mayor cantidad de extracto fenólico, para determinar con mayor exactitud la presencia de algunos compuestos fenólicos.
- Aislar la fracción de ácido fúlvicos para comparar el contenido de especies fenólicas en las mismas y así obtener un estudio más amplio de las sustancias húmicas extraídas de carbón.
- Realizar el estudio de HPLC de las muestras empleando una gama más amplia de patrones, para obtener un análisis cualitativo y cuantitativo más detallado de los compuestos fenólicos presentes.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ministerio del Poder Popular para las Industrias Básicas y Minería. (2010). *El Carbón*. Paréntesis, análisis y reflexiones sectoriales 5 ed. 26pp. [En línea] <www.cvgminerven.gob.ve>

- [2] PDVSA, INTEVEP. (1997). *Museo geológico virtual de Venezuela, Módulo: Minerales de Venezuela*. [En Línea] <www.pdvsa.com/lexico>

- [3] Almendros, G. (2008). *Revisión analítica de sustancias húmicas en suelos y compost*. II CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE ECO-BIOLOGÍA DEL SUELO Y EL COMPOST. España. 239-253 pp.

- [4] Fraume, N. (2007). *Diccionario Ambiental*. ECOE Ediciones. 203-204 pp.

- [5] Peña, E.; Havel, J.; Patocka, J. (2004). *Humic Substances-Compound of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine*. Journal of applied biomedicine. Vol. 1, 13-24 pp.

- [6] Elizarrás, E; Serratos, J; López, E; Román, L. (2009). *La aplicación de ácidos húmicos sobre características productivas de Clitoria ternatea L en la región centro-occidente de México*. Avance en Investigación Agropecuaria. Vol. 13, No. 3, 3-10 pp.

- [7] Levin, D.A. (1976). *The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores*. Ann Rev. Ecol. Syst. Vol. 7, 121-159 pp.

- [8] Harbone, J. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press Inc. New York and London. 318 pp.

- [9] Schopft, J. M. (1956). *A Definition of Coal*. Economy Geology, Vol. 51, 521-527 pp.
- [10] Danús, H.; Vera, S. (2010). *Carbón, protagonista del pasado, presente y futuro*. RIL Editores. Chile. 231 pp.
- [11] Martínez, M. (2001). *Geología y Geoquímica del Carbón Mineral*. Curso de Extensión. Coordinación de Extensión, Facultad de Ciencias, U.C.V. 111 pp.
- [12] *Lignito*. (2013). [En línea]. <www.uciencia.uma.es>
- [13] Tissot, B.; Welte, H. (1984). *Petroleum formation and occurrence*. Second Edition. Springer-Verlag. 699 pp.
- [14] Hunt, J. (1995). *Petroleum Geochemistry and Geology*. Second Edition. W.H Freeman and Company. 743 pp.
- [15] Molina O. (1987). *Estudio y Caracterización Preliminar del Carbón de Guasare*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. U.C.V.
- [16] American Society for Testing and Materials (ASTM D-388-12). *Standard classification of coals by rank*.
- [17] Azcarate, B.; Mingorance, A. (2007). *Energías e Impacto Ambiental*. 2 ed. Colección Milenium, Equipo Sirius. 28 pp.
- [18] Contreras, G. Eliasara, M. (1997). *Caracterización química y espectroscópica de ácidos húmicos derivados de carbones venezolanos*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Caracas. 95 pp

- [19] Perdue, M. (2007). *Natural Organic Matter Research*. [En línea <www.humicsubstances.org>]
- [20] López, L.; Mogollón J. (1989). *Las Sustancias Húmicas*. Sociedad Venezolana de Química, Vol. 2, No. 1 ,15-19 pp.
- [21] Stevenson, F. (1982). *Humus Chemistry: genesis, composition, reaction*. Editorial John Wiley and Sons. New York. 497 pp
- [22] Fassbender, H. (1975). *Química de suelos, con énfasis en suelos de Latino América*. Editoria IICA. Costa Rica. 401 pp.
- [23] Núñez, J (2000). *Fundamentos de edafología*. EUNED, 2da Edición. Costa Rica 189 pp.
- [24] Buffle, J. (1977). *Humic Substances in water and their interaction with minerals ions*. Techniques et sciences municipals. Vol. 72, 3-10pp.
- [25] Giner, J.F.; Archiniega, L. (2004). *Las Sustancias Húmicas: Incidencias en la Fertilidad de los Cultivos*. Agrícola Vergel. Vol. 269, 264-269 pp.
- [26] Jiménez, J.A. (1999). *Extracción de Ácidos Húmicos y Ácidos Fúlvicos de Carbones de Bajo Rango Procedentes de la Costa Atlántica y Posterior Aplicación de Ácidos Húmicos a Suelos Pobres en Materia Orgánica*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Revista Científica. No. 1, 143-155 pp.

- [27] Silva, V.; María, E. (2000). *Preconcentración Selectiva de Fenoles Contaminantes Prioritarios y Determinación por Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 209 pp.
- [28] Skoog, D. Holler, J. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5 ed. Editorial McGrawHill. 1028 pp.
- [29] Rouessac, F.; Rouessac, A. (2003). *Análisis Químico*. 5ta. Edición. McGrawHill. Madrid. 441 pp.
- [30] Hamilton, R.J; Sewell, P.A. (1982). *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*. London Chapman & Hall. 2-11.pp.
- [31] Schwartz, N.; Township, L.; County, M. (1968). *Production of Humic Acid*. (Patent 3,398,186). New York.
- [32] Kögel, I.; Bochter, R. (1985). *Characterization of Lignin in Forest Humus Layers by High Performance Liquid Chromatography of Cupric Oxide Oxidation Products*. Soil Biology & Biochemistry. Vol. 17, No. 5, 637-640 pp.
- [33] Calemma, V.; Milanese, S.; Piccolo, V.; Rausa, R.; (1993). *Process for Producing Regenerated Humic Acids from Coal*. (Patent 5,248,814). Milan.
- [34] Ollivella, M.; Del Río, J.; Palacios, J.; Vairavamurthy, M.; De las Heras F. (2002). *Characterization of humic acid from leonarite coal; an integrated study of PY-GC-MS, XPS and XANES techniques*. Journal of Analytical and applied pyrolysis. Vol. 63, 59-68 pp.

- [35] Fong, S.; Seng, L.; Chong, W.N.; Asing, J.; Faizal, M.; Satirawaty, A. (2006). *Characterization of the Coal Derived Humic Acids from Mukah, Sarawak as Soil Conditioner*. Journal of the Brazilian chemical Society. Vol. 17, No. 3, 582-587 pp.
- [36] Banach-Szott, M. (2007). *Content of Phenolic Compounds in Humus Acids of Forest Soil*. Polish Journal of Soil Science. Vol. 40, No. 1, 67-79 pp.
- [37] Kucerik, J.; Cihlár, Z.; Vlcková, Z.; Drastic, M. (2008). *Regenerated Humic Acids Obtained by the Air Oxidation of South Moravian Lignite. Part I. Production and Characterization*. Petroleum & Coal. Vol. 50, No. 3, 49-55 pp.
- [38] Banach-Szott, M.; Debska, B. (2008). *Content of phenolic compounds in fulvic and humic acids from forest soils*. Polish Journal of Environmental Studies. Vol. 17, No. 4, 463-472 pp.
- [39] Asing, J.; Wong, N.; Lau, S. (2009). *Optimization of extraction method and characterization of humic acid derived from coals and composts*. J.Trop. Agric. And Fd. Sc. Vol. 37, No. 2, 211-223 pp.
- [40] Oduber, F. 2013. *Caracterización geoquímica de las sustancias húmicas extraídas de lignitos de la formación Uramaco, Estado Falcón, Venezuela*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Caracas. 99 pp.
- [41] Macsotay, O (1997). *QUEBRADON, Formación*. [En línea] <www.pdv.cm>
- [42] Moreno, O., Martínez, M., Escobar, M. (1995). *Geoquímica orgánica de los carbones de Fila Maestra, Estado Anzoátegui, Venezuela*. Journal of South American Earth Sciences. Vol 8, No. 2, 201-208 pp.

- [43] Folk, R.J. 1978. *Petrology of Sedimentary Rocks*. Hemphill Pub. Co. Austin Texas, USA. 182pp.
- [44] Norma Técnica Colombiana 5556. (2007). *Determinación del Grado Relativo de Oxidación de Carbón Bituminoso por Extracción Alcalina*. ICONTEC, Bogotá, D.C.
- [45] Ramírez, V.; Rodríguez, F.; Torres, L.; (2011). *Caracterización y evaluación de ácidos húmicos como biosurfactante, con uso potencial en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos*. Redisa, IV Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos, IBSN: 978-60-7607-015-4. México, DF. 571-571 pp.
- [46] Martínez, M.; Escobar, M. (1995). *Effect of coal weathering on some geochemical parameters*. Org. Geochem. Vol. 23, No. 3, 253-261 pp.
- [47] Moreno, O. (1990). *Caracterización geoquímica del carbón de Fila Maestra, Estado Anzoategui*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Caracas.
- [48] Haihui, W.; Bogdan, Z.; Kennedy, E. (2003). *Coal oxidation at low temperatures: oxygen compsumtion, oxidation products, reaction mechamism and kinetic modelling*. Progress in energy and combustion science. Vol. 29, 487-513 pp.
- [49] Gethner, JS. 1985. *Thermal and oxidation chemistry of coal at low temperatures*. Fuel. Vol. 64, 1443-1446 pp.
- [50] Berkowitz, N. 1979. *An introduction to coal technology*. New York: Academic Press, 95-130 pp.

- [51] Ramos, R. (2000). *Aplicación de sustancias húmicas comerciales como productos de acción bioestimulantes. Efectos frente al estrés salino*. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante, España. 335 pp.
- [52] Chen, Y; Senesi, N; Schnitzer, M. (1977). *Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios*. Spil Sci. Soc. Am. J. 41, 352-358 pp.
- [53] Kögel, I. (1986). *Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers*. Soil. Biol. Biochem., Vol.18, 589-594 pp.
- [54] Peuravouri, J. (2006). *Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids*. Fuel Processing Technology. Vol. 87, 829-839 pp.
- [55] Allar, B. (2005). *A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit Bound lipid, carbohydrate and amino acid distributions*. Geoderma, Vol. 130, 77-96 pp.
- [56] Ficha de Seguridad (2013). [En línea] <www.insht.es>
- [57] Ficha de Seguridad (2013). [En línea] <www.acofarma.es>
- [58] Snyder, L., Kirkland, J., Dolan, J. 2009. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3era Edición, Editorial Wiley. 404-433 pp.

10. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de datos para análisis inmediatos de las muestras AAS-1 y AAS-2.

Muestra	Peso inicial $\pm 0,0001$ g		Peso final $\pm 0,0002$ g		
	%H y %Cen	%M.V	%H	%Cen	%M.V
AAS-1 (1)	1,0025	1,0007	0,9533	0,0352	0,4538
AAS-1 (2)	1,0007	1,0008	0,9533	0,0346	0,4460
AAS-1 (3)	1,0024	1,0053	0,9551	0,0362	0,4692
AAS-2 (1)	1,0008	1,0070	0,9585	0,0236	0,4888
AAS-2 (2)	1,0045	1,0035	0,9614	0,0237	0,4669
AAS-2 (3)	1,0009	1,0018	0,9582	0,0238	0,4922

Anexo 2. Tabla de datos para cálculo de grado de oxidación relativa de AAS-1 y AAS-2.

Muestra (*)	Transmitancia ± 1 (%)
AAS-1 (Sol A)	40
AAS-1 (Sol B)	38
AAS-1 (Sol C)	39
AAS-2 (Sol A)	27
AAS-2 (Sol B)	29
AAS-2 (Sol C)	28

(*)Sol: Solución

Anexo 3. Tabla de datos para cálculo de grado de oxidación relativa de AAS-3.

Tiempo (días)	Muestra (*)	%T ± 1
0	AAS-3. (Sol A)	40
	AAS-3. (Sol B)	38
	AAS-3. (Sol C)	39
10	AAS-3. (Sol D)	3
	AAS-3. (Sol E)	3
	AAS-3. (Sol F)	2
13	AAS-3. (Sol G)	1
	AAS-3. (Sol H)	2
	AAS-3. (Sol I)	2
18	AAS-3. (Sol J)	0
	AAS-3. (Sol K)	0
	AAS-3. (Sol L)	0

(*)Sol: Solución

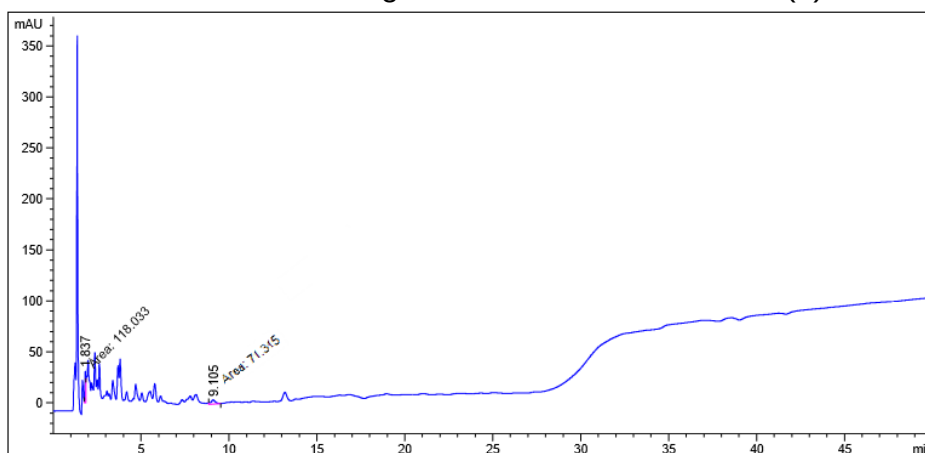
Anexo 4. Tabla de datos para la extracción de los ácidos húmicos de AAS-2 y AAS-3

Muestra	Carbón $\pm 0,001$ (g)	AH $\pm 0,001$ (g)	Huminas $\pm 0,001$ (g)
AAS-2.1	30,846	0,096	30,194
AAS-2.2	30,243	0,108	29,590
AAS-2.3	30,358	0,088	29,724
AAS-2.4	10,065	0,045	9,839
AAS-2.5	10,379	0,043	10,150
AAS-2.6	10,305	0,029	10,090
AAS-2.7	10,461	0,038	10,235
AAS-3.1	10,735	0,421	10,046
AAS-3.2	10,848	0,449	10,128
AAS-3.3	9,022	0,329	8,468
AAS-3.4	9,295	0,316	8,747
AAS-3.5	9,865	0,289	9,329
AAS-3.6	9,200	0,281	8,689
AAS-3.7	9,876	0,455	9,174
AAS-3.8	9,048	0,426	8,396

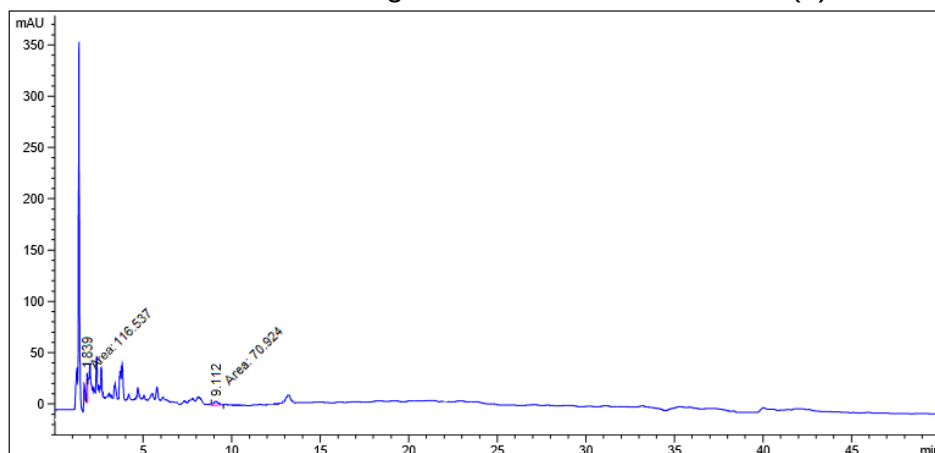
Anexo 5. Tabla de datos de soluciones madre de compuestos
fenólicos para análisis cualitativo

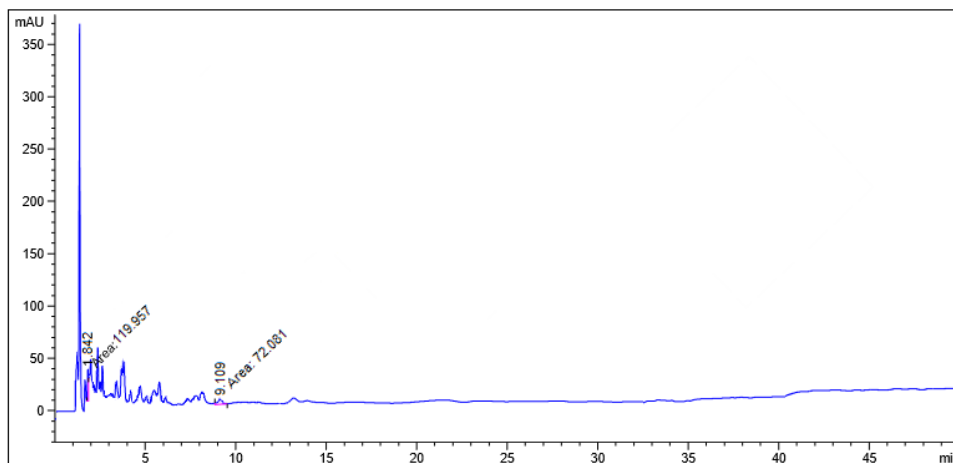
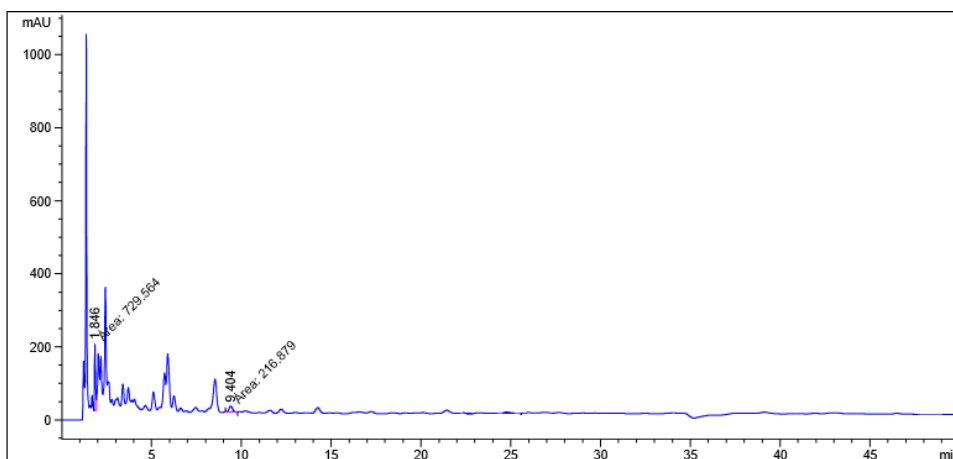
Compuesto	Peso $\pm 0,0001$ g	Concentración (mg/L)
Ácido Gálico	0,0121	484 ± 5
Vainillina	0,0120	480 ± 5
Ácido Salicílico	0,1018	2036 ± 4

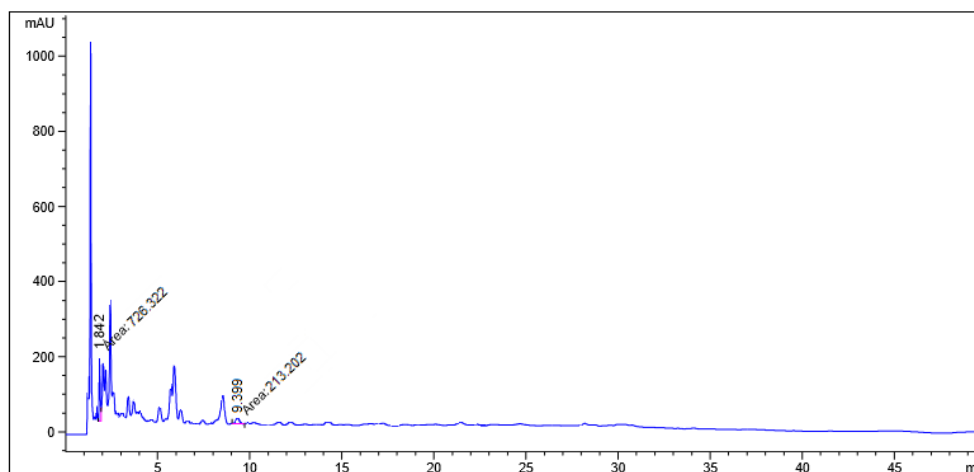
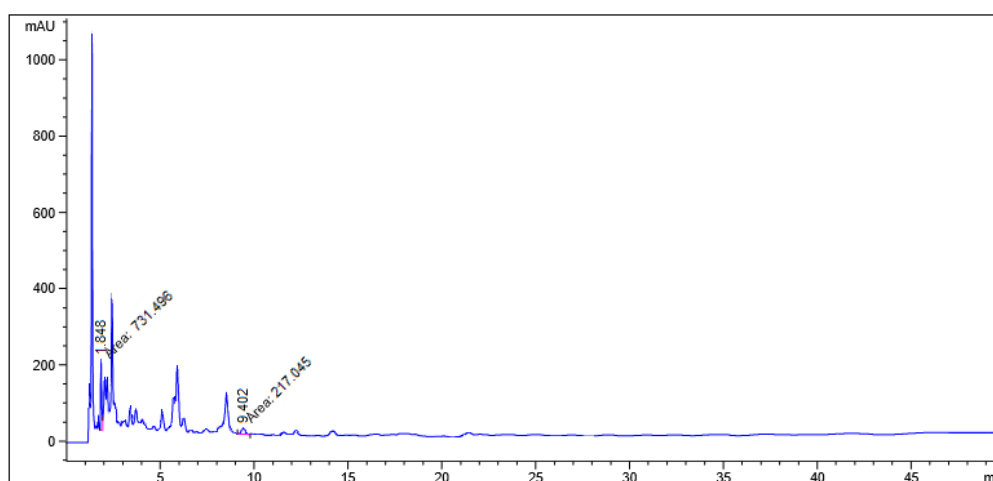
Anexo 6. Cromatograma de la muestra AAS-2 (1)



Anexo 7. Cromatograma de la muestra AAS-2 (2)



Anexo 8. Cromatograma de la muestra AAS-2 (3)**Anexo 9.** Cromatograma de la muestra AAS-3 (1)

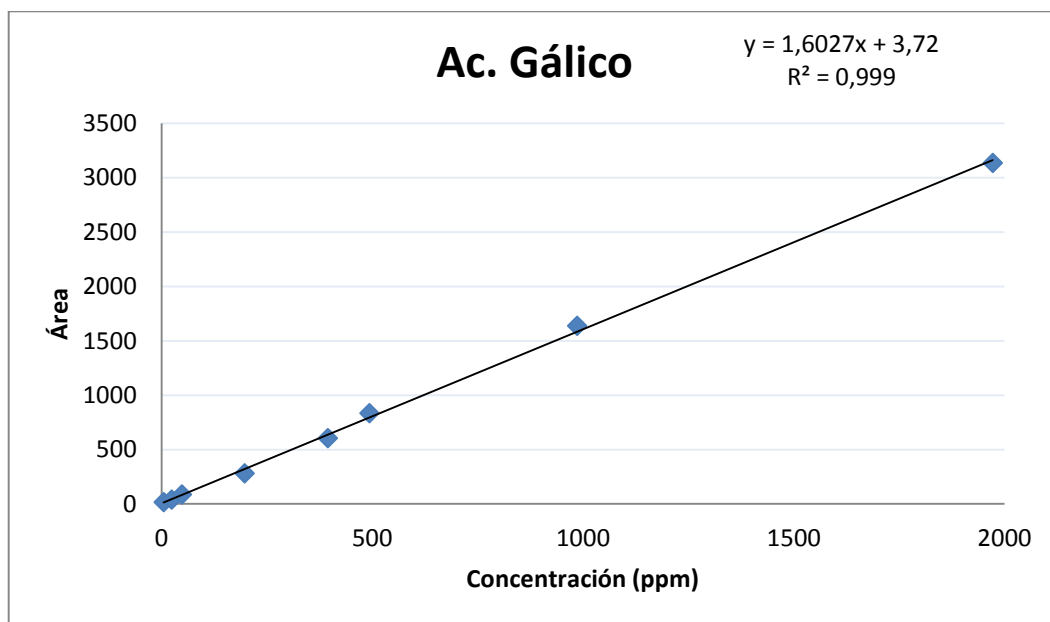
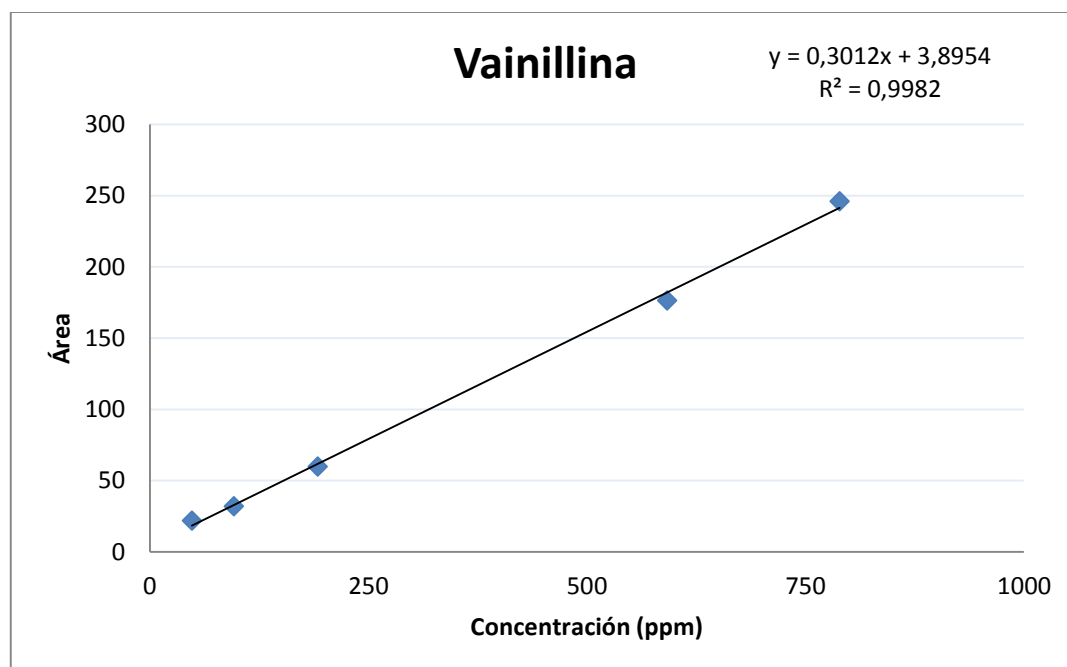
Anexo 10. Cromatograma de la muestra AAS-3 (2)**Anexo 11. Cromatograma de la muestra AAS-3 (3)**

Anexo 12. Tabla de datos para la cuantificación de los compuestos fenólicos

Muestras	Área Ácido Gálico	Área Vainillina
AAS-1 (1)	729,56403	216,87862
AAS-1 (2)	726,32213	213,20175
AAS-1 (3)	731,49562	217,04531
AAS-2 (1)	118,03307	71,31516
AAS-2 (2)	116,53742	70,92438
AAS-2 (3)	119,95723	72,08124

Anexo 13. Concentraciones de los patrones empleados en las curvas de calibración externa del ácido gálico y la vainillina.

Patrón	Ácido Gálico (mg/L)	Vainillina (mg/L)
P1	4,8 ± 0,3	48,0 ± 0,8
P2	24,2 ± 0,4	96 ± 2
P3	48,4 ± 0,8	192 ± 3
P4	197 ± 2	592 ± 5
P5	394 ± 3	789 ± 6
P6	493 ± 4	_____
P7	986 ± 7	_____
P8	1972 ± 6	_____

Anexo 14. Curva de calibración externa del ácido gálico**Anexo 15.** Curva de calibración externa de la vainillina

Anexo 16. Tabla de datos para cálculo de parámetro mg Fenol/Kg AH

Muestra	AH $\pm$ 0,001 (g)	V $\pm$ 0,02 (mL)	[Ác. Gálico] (mg/L)	[Vainillina] (mg/L)
AAS-2	0,447	5	143 $\pm$ 2	936 $\pm$ 10
AAS-3	1,502	5	905 $\pm$ 2	1406 $\pm$ 14

V: Volumen de la solución de extracto fenólico

Anexo 17. Cromatograma modelo de compuestos fenólicos, Banach-Szott [36]